

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE
FOSFATO E ANÁLISE DO SEU EFEITO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana*

NATHÁLIA DUARTE DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2012

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE
FOSFATO E ANÁLISE DO SEU EFEITO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana*

NATHÁLIA DUARTE DA SILVA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho
Co-orientadora: Prof^a. Beatriz dos Santos Ferreira

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
ABRIL – 2012

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE
FOSFATO E ANÁLISE DO SEU EFEITO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana*

NATHÁLIA DUARTE DA SILVA

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 13 de abril de 2012.

Comissão Examinadora:

Prof. José Roberto da Silva (D.Sc. em Biociências e Biotecnologia) - UFRJ

Prof. Fábio Lopes Olivares (D.Sc. em Agronomia) - UENF

Prof. Vanildo Silveira (D.Sc. em Biotecnologia) - UENF

Prof^a. Beatriz dos Santos Ferreira (D.Sc. em Biociências e Biotecnologia) - UFRJ

Prof. Gonçalo A. de Souza Filho (D.Sc. em Biociências e Biotecnologia) - UENF
(Orientador)

Dedico esta dissertação a Deus sobre todas as coisas,
aos meus pais Alcimar e Adriana, aos meus irmãos Glauber, Pedro Igor e Tayná,
e a todos aqueles que me permitiram um dia fazer parte de suas vidas. Obrigada,
pela motivação que me fez chegar até aqui.

*“Só temos consciência do belo, quando conhecemos o feio.
Só temos consciência do bom, quando conhecemos o mau.
Porquanto, o Ser e o Existir, se engendram mutuamente.
O fácil e o difícil se completam.
O grande e o pequeno são complementares.
O alto e o baixo formam um todo.
O som e o silêncio formam a harmonia.
O passado e o futuro geram o tempo.
Eis por que o sábio age, pelo não-agir.
E ensina sem falar. Aceita tudo que lhe acontece.
Produz tudo e não fica com nada.
O sábio tudo realiza - e nada considera seu.
Tudo faz - e não se apega à sua obra.”
Não se prende aos frutos da sua atividade.
Termina a sua obra, e está sempre no princípio.
E por isso a sua obra prospera.”*

Lao – Tsé

AGRADECIMENTOS

Ao meu “Aba - Pai”, que permitiu concretizar mais um sonho, nos momentos fraquezas demonstrou sua força permitindo-me sempre voltar incessantemente o olhar para Cristo, em cujo rosto resplandece a Verdade que me ilumina, mas que é também o Caminho que leva à plenitude sem fim, fazendo-Se caminhante comigo e me sustentando com o seu amor.

À minha mãe Adriana e ao meu pai Alcimar, que me ensinaram a verdadeira arte da vida “AMAR”. Obrigada pela compreensão e respeito às minhas ausências e limitações. Com vocês, pude aprender as melhores qualidades. Mamãe me ensinou a ser guerreira e me disse que desistir jamais. Papai me ensinou que é possível lapidar um diamante e que não existe regra para se amar.

Aos meus irmãos Glauber, Pedro Igor e Tayná, pois juntos pudemos apreender que a diferença nos converge para o essencial, a convivência familiar.

Aos meus sobrinhos Nathalie, Luiza, João Carlos e Vitória, que me proporcionaram em seus sorrisos a alegria de contemplar as suas vidas.

À minha avó Clarinda e à minha tia Jocerema, que ajudaram nos meus estudos e hoje contemplam na eternidade o meu sucesso.

À minha tia Jonaci, que sempre me apoiou e me incentivou para concluir os estudos me tratando como filha.

Ao meu namorado Renato, que com toda paciência me ensinou que a humildade é também uma virtude indispensável, pois nos protege da vaidade que

fecha o acesso à verdade.

A todos os meus amigos e familiares que me ajudaram a compreender que a hora mais escura da noite é justamente aquela que nos permite ver melhor as estrelas.

À minha amiga, irmã e afilhada Paula Cris, por essa linda amizade que pode ser comparada às árvores e às montanhas, que suportam os mais inesperados ventos. Obrigada pela dedicação.

Ao Frederico, com quem pude compartilhar grandes momentos de minha vida. Obrigada, por ter me enxergado melhor do que eu sou.

Ao ser humano incrível que me ensinou a olhar para o horizonte e enxergar além, os primeiros ensinamentos no grupo foi você quem me ensinou. Obrigada, Valéria! Mesmo longe, tornou-se uma grande e inesquecível amiga.

Juntas, resistimos à amargura e vimos que a angústia nunca trará soluções aos nossos problemas. Obrigada, Tamiris.

A Adriane, pelo carinho e confiança de me aceitar em seu trabalho e me fazer enxergar que é possível da fraqueza extrair forças para um dia alcançar a alegria.

Ao trem da alegria “Verônica, Mariana, Josiana, Tiago e Wellington”, pelos grandes momentos vivenciados, pois juntos tivemos a disposição de ir além da superfície.

Aos parceiros do dia a dia, Ana Lídia, Ana Márcia, Charlhes, Cristina, Fernanda, Juliana, Kate, Patrícia e Roberta, obrigada por tornarem meus dias no laboratório agradáveis e divertidos. Sentirei saudades dos nossos momentos de recreação no “almoço”.

Em especial a Aline, José Paulo, Marcus Vinícios e Suzane, pela honra de trabalhar diretamente com vocês e, acima de tudo, pelo grande ensinamento de olhar para as coisas com esperança e de esperar o melhor e não o pior.

Aos professores, técnicos e alunos do LBT, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Hérika, pela dedicação, compreensão e torcida. Valeu!

À Profa. Telma, pelo carinho e compreensão

Aos conselheiros Profa. Rosana Rodrigues e Prof. Vanildo Silveira, por terem aceitado o convite.

Ao Prof. Geraldo Gravina, Leandro Simões e Maurício Couto, pela grande

ajuda com os dados estatísticos.

À Profa. Marília Amorim, pelas grandes contribuições para o trabalho.

Aos membros da banca, Prof. Fábio Olivares e o Prof. José Roberto da Silva, pelas sugestões para o meu trabalho e por terem aceitado participar da minha banca de mestrado.

A você que com paciência e dedicação me ensinou o que é ser um profissional e que a vida é fruto da decisão de cada momento. Obrigada, Profa. Beatriz.

Ao mestre que me ensinou que o segredo do sucesso de qualquer profissão é não só fazer o que se gosta, mas também aprender a gostar do que se faz, e isso exige paciência e disciplina. Obrigada, Prof. Gonçalo.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela oportunidade da realização do Curso.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj), pela bolsa de estudos a mim concedida.

A todos os professores da pós-graduação que me transmitiram seus conhecimentos, mostrando que é possível procurar e se aproximar da verdade, mas não possuí-la totalmente.

SUMÁRIO

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Interação planta-bactéria.....	3
2.2. Nichos ocupados pelas bactérias promotoras do crescimento vegetal.....	5
2.3. Mecanismos da promoção do crescimento vegetal	5
2.3.1. Bactérias solubilizadoras de fosfato.....	7
2.4. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudo.....	8
3.1. OBJETIVO GERAL	10
3.2. Objetivos específicos	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.1. Isolados bacterianos	12
4.2. Cultivo bacteriano em meio líquido	12
4.3. Ensaio de solubilização de fosfato inorgânico em meio de cultivo sólido.....	13
4.4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	16

4.4.1. Extração do DNA genômico	16
4.4.2. Amplificação do gene 16S rDNA.....	16
4.4.3. Sequenciamento do gene 16S rDNA	17
4.5. Material Vegetal	18
4.5.1. Desinfestação e condições de cultivo de <i>A. thaliana</i>	18
4.5.2. Padronização das condições ideais de substrato inerte para cultivo de <i>A. thaliana</i>	19
4.5.3. Definição da concentração limitante de fósforo solúvel na solução de Hoagland para o cultivo de <i>A. thaliana</i>	20
4.5.4. Ensaio de solubilização de P por bactéria durante interação com plantas de <i>A. thaliana</i>	21
5. RESULTADOS	23
5.1. Efeito do meio de cultura e de diferentes fontes de fosfato inorgânico na eficiência de solubilização por isolados bacterianos de abacaxi.....	23
5.2. Identificação molecular dos isolados bacterianos	28
5.2.1. Extração de DNA genômico e amplificação do gene <i>16S rDNA</i>	28
5.2.2. Análise das sequências do gene 16S rDNA e identificação molecular dos isolados	28
5.3. Definição da condição ideal de substrato inerte para cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
5.4. Definição da concentração limitante de fósforo solúvel na solução nutritiva para o desenvolvimento de plantas <i>A. thaliana</i>	32
5.5. Ensaio de solubilização de fosfato por bactérias durante interação com plantas de <i>A. thaliana</i>	35
6. DISCUSSÃO	40
6.1. Avaliação da solubilização de fosfato por isolados bacterianos de abacaxi e caracterização molecular	40
6.2. Avaliação da condição ideal de substrato inerte para cultivo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	42

6.3. Avaliação da concentração limitante de fósforo solúvel na solução nutritiva para o desenvolvimento de plantas <i>A. thaliana</i>	43
6.4. Avaliação da solubilização de fosfato por isolados bacterianos de abacaxi durante interação com plantas de <i>A. thaliana</i>	44
7. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação atual de <i>Arabidopsis thaliana</i>	9
Tabela 2. Isolados da bacterioteca de <i>Ananas comosus</i> (L.), cultivares Smooth Cayenne e Pérola, utilizados para o ensaio de solubilização de fosfato	14
Tabela 3. Composição do meio de cultivo DYGS.....	15
Tabela 4. Composição do meio de cultivo LGLm	16
Tabela 5. Composição do meio de cultivo Basal	16
Tabela 6. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores internos para amplificação do gene 16S rDNA	18
Tabela 7. Solução nutritiva de Hoaglan	19
Tabela 8. Proporções de substrato inerte para cultivo de <i>A. thaliana</i>	20
Tabela 9. Curva de fosfato insolúvel ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) e solúvel ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) na solução de Hoagland	21
Tabela 10. Tratamentos utilizados nos ensaios de solubilização de P por bactéria durante interação com plantas de <i>A. thaliana</i>	22
Tabela 11. Bactérias isoladas de <i>Ananas comosus</i> (L.) cultivares Smooth Cayenne e Pérola classificadas quanto à solubilização de fosfato	25

Tabela 12. Identificação das bactérias isoladas de <i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill cultivares Smooth Cayenne e Pérola com base nos resultados baseado no alinhamento de sequências.....	31
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Código para identificação dos isolados bacterianos de abacaxi, com a palavra “UENF” seguido de um conjunto de números. As plantas de abacaxi foram cultivadas em casa de vegetação no campus da UENF.....	15
Figura 2. Esquema dos ensaios de solubilização de P por bactéria durante interação com plantas de <i>A. thaliana</i>	22
Figura 3. Caracterização das bactérias isoladas de <i>Ananas comosus</i> (L.) cultivares Smooth Cayenne e Pérola quanto à solubilização de fosfato	26
Figura 4. Diâmetro do halo de solubilização no meio Basal acrescido com a fonte de fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e fosfato terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) das bactérias isoladas de <i>Ananas comosus</i> (L.) cultivares Smooth Cayenne e Pérola.....	27
Figura 5. Diâmetro do halo de solubilização no meio LGlM acrescido com a fonte de fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e fosfato terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) das bactérias isoladas de <i>Ananas comosus</i> (L.) cultivares Smooth Cayenne e Pérola.....	27
Figura 6. Morfologia da colônia das bactérias isoladas de <i>Ananas comosus</i> (L.) cultivares Smooth Cayenne e Pérola quanto à solubilização de fosfato	29

Figura 7. Visualização do padrão eletroforético da extração do DNA genômico das bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas de <i>Ananas comosus</i> (L.)	30
Figura 8. Visualização do padrão eletroforético da amplificação da região do gene <i>16S rDNA</i> das bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas de <i>Ananas comosus</i> (L.)	30
Figura 9. Análise da taxa de germinação de sementes de <i>A. thaliana</i> em diferentes proporções de vermiculita e areia	33
Figura 10. Avaliação da matéria fresca da parte aérea de <i>A. thaliana</i> cultivada em diferentes proporções de vermiculita/areia	33
Figura 11. Plantas de <i>A. thaliana</i> cultivadas em solução de Hoagland contendo fosfato insolúvel ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) e solúvel ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$).....	35
Figura 12. Avaliação da matéria fresca da parte aérea de plantas de <i>A. thaliana</i> cultivadas em solução nutritiva de Hoagland adicionada de fosfato insolúvel ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)	35
Figura 13. Avaliação da matéria fresca da parte aérea sobre o efeito da inoculação bacteriana em água durante o tratamento fosfato insolúvel em plantas de <i>A. thaliana</i>	37
Figura 14. Avaliação da matéria fresca da parte aérea sobre o efeito da inoculação bacteriana em solução de Hoagland durante o tratamento fosfato insolúvel em plantas de <i>A. thaliana</i>	38
Figura 15. Avaliação da matéria fresca da parte aérea sobre o efeito da inoculação bacteriana em água durante o tratamento fosfato solúvel em plantas de <i>A. thaliana</i>	38
Figura 16. Avaliação da matéria fresca da parte aérea sobre o efeito da inoculação bacteriana em solução de Hoagland durante o tratamento com fosfato solúvel em plantas de <i>A. thaliana</i>	39
Figura 17. Avaliação da solubilização de fosfato por bactérias durante a interação com planta de <i>A. thaliana</i>	39

RESUMO

SILVA, Nathália Duarte; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Abril de 2012; IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO E ANÁLISE DO SEU EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS DE *Arabidopsis thaliana*; Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Co-orientadora: Profa. Beatriz dos Santos Ferreira; Conselheiros: Profa. Rosana Rodrigues e Prof. Vanildo Silveira.

A disponibilidade de nutrientes para as plantas é um fator determinante para o seu desenvolvimento, tendo grande influência na produção agrícola. O fósforo é um dos nutrientes mais importantes para a cultura agrícola, pois é limitante para o crescimento vegetal por influenciar o fornecimento de energia necessária para os processos metabólicos. Um dos principais problemas relativos à absorção deste nutriente pelas plantas se deve ao fato de uma grande porção de fosfato inorgânico (Pi) solúvel, aplicado ao solo como adubo químico, ser rapidamente imobilizado nas formas de fosfato insolúvel. Uma das alternativas para amenizar esse problema é a utilização de microrganismos eficazes na liberação de Pi por meio de sua solubilização e mineralização. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação e a caracterização de isolados bacterianos de abacaxi (*Ananas comosus* L.) capazes de solubilizar fosfatos e a avaliação de seu efeito na promoção do crescimento vegetal, após sua inoculação em plantas de *Arabidopsis thaliana*. Vinte e um isolados bacterianos de abacaxi foram avaliados quanto à capacidade de solubilizar fosfato insolúvel em meio Basal e LGIm. Entre

os 21 isolados bacterianos avaliados, oito foram capazes de solubilizar fosfato, sendo dois de origem rizosférica e seis de raiz, dos quais três eram epifíticos e três, endofíticos. Os isolados foram caracterizados pelo sequenciamento da região do gene 16S rDNA, ao nível de gênero, sendo três do gênero *Bacillus* sp. (UENF 111925, UENF 112922 e UENF 122921), dois do gênero *Burkholderia* sp. (UENF 111923 e UENF 113922), um do gênero *Pseudomonas* sp. (UENF 113821) e um do gênero *Enterobacter* sp. (UENF 123925). As condições de cultivo de *A. thaliana* foram padronizadas e ensaios de inoculação com as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Bacillus* sp. (UENF 112922), *Bacillus* sp. (UENF 122921) e *Burkholderia* sp. (UENF 113922) permitiram analisar o efeito dessas condições na promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal. Como resultado, foi possível observar que as bactérias *G. diazotrophicus*, *Bacillus* sp. (UENF 112922) e *Burkholderia* sp. (UENF 113922) promoveram crescimento em plantas de *A. thaliana*.

Palavras-Chave: bactérias solubilizadoras de fosfato, *Arabidopsis thaliana*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, fosfato inorgânico.

ABSTRACT

SILVA, Nathália Duarte; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Abril de 2012; IDENTIFICATION OF PHOSPHATE SOLUBILIZING BACTERIA AND ANALYSIS OF ITS EFFECT ON THE DEVELOPMENT OF PLANTS *Arabidopsis thaliana*; Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Co-orientadora: Profa. Beatriz dos Santos Ferreira; Conselheiros: Profa. Rosana Rodrigues e Prof. Vanildo Silveira.

The availability of nutrients to plants is a determining factor for its development, having great influence on agricultural production. Phosphate is one of the most important nutrients for agriculture, it is a limiting factor to plant growth by influencing the supply of energy needed for metabolic processes. One of the main problems related to its absorption by plants, is the fact that a large portion of inorganic phosphate (Pi) soluble, applied to the soil as fertilizer, is rapidly immobilized to insoluble phosphate form. An approach to try resolves this problem is the use of microorganisms able to releasing Pi by its solubilization and mineralization. In this context, this work aimed the evaluation and characterization of bacteria isolated from pineapple (*Ananas comosus* L.) able to solubilize phosphates, and the evaluation of its effect in promoting growth of *Arabidopsis thaliana*. Twenty-one pineapple bacterial isolates were evaluated for their ability to solubilize phosphate insoluble in basal medium and LGIm. Among 21 bacterial isolates evaluated, eight were able to solubilize phosphate, 2 rhizospheric origin, 3 root-epiphytic and 3 root-endophytic. The isolates were characterized by

sequencing the region of the 16S rDNA in the genus level where 3 *Bacillus* sp. (UENF 111925, UENF 112922 and UENF 122921), 2 *Burkholderia* sp. (UENF UENF 111923 and 113922), a *Pseudomonas* sp. (UENF 113821) and an *Enterobacter* sp. (UENF 123925). The culture conditions of *A. thaliana* were standardized. The bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Bacillus* sp. (UENF 112922), *Bacillus* sp. (UENF 122921) and *Burkholderia* sp. (UENF 113922) were inoculated in plants for analyzing of its effect on plant growth promotion and development. As a result it was observed that the bacteria *G. diazotrophicus*, *Bacillus* sp. (UENF 112922) and *Burkholderia* sp. (UENF 113922) promoted the growth of plants of *A. thaliana*.

Keywords: phosphate solubilizing bacteria, *Arabidopsis thaliana*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, inorganic phosphate.

1. INTRODUÇÃO

A disponibilidade de nutrientes para as plantas é fator determinante para seu crescimento e aumento na produção agrícola. Neste sentido, a captura eficiente de nutrientes do solo pelas raízes é uma questão crítica para as plantas, uma vez em que muitos ambientes possuem baixa disponibilidade de nutrientes (HODGE, 2004).

Para suprir essa necessidade, a utilização de fertilizantes químicos é uma maneira rápida de fornecer os nutrientes para a planta. Com o aumento populacional no mundo, o uso acelerado da adubação química tem aumentado, contribuindo para efeitos desfavoráveis como lixiviação, emissão e eutrofização dos ecossistemas aquáticos, fatores que contribuem para o aumento da poluição ambiental (ADESEMOYE & KLOPPER, 2009a; ADESEMOYE, *et al.*, 2009b; YANG, *et al.*, 2009). A adubação química também pode modificar o pH e a estrutura do solo, além de influenciar as atividades enzimáticas dos microrganismos aí presentes (BÖHME & BÖHME, 2006).

Embora a pobreza de nutrientes no solo muitas vezes seja suprida pela aplicação de fertilizantes químicos, a disponibilidade desses nutrientes é regulada por um conjunto de parâmetros físico-químicos, fatores ambientais e interações biológicas (HODGE, 2004). Um nutriente bastante estudado é o fosfato por ser um fator limitante para o crescimento vegetal, além de desempenhar um papel importante no metabolismo das plantas ao fornecer energia para os processos metabólicos (MISHRA, 1968). Assim, o estudo e o desenvolvimento de

mecanismos de solubilização e disponibilização de fósforo são de grande importância para a agricultura mundial.

Neste contexto, tem sido observado um aumento significativo nos estudos acerca das rizobactérias promotoras de crescimento vegetal e da capacidade de solubilização e disponibilização de nutrientes do solo. Tais rizobactérias possuem grande potencial para melhorar o crescimento e o rendimento de várias culturas economicamente importantes (FARAJZADEH *et al.*, 2012).

O presente trabalho visou à seleção e caracterização de bactérias solubilizadoras de fósforo a partir de uma bacterioteca de isolados obtidos de plantas de abacaxi. A proposta envolveu a seleção de isolados capazes de realizar tal solubilização *“in vitro”*, a caracterização e a identificação molecular destes acessos bem como a avaliação do seu efeito sobre a promoção do crescimento de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Interação planta-bactéria

As plantas representam uma importante fonte de nutrientes e água para os microrganismos. Para terem acesso a esses nutrientes, várias bactérias patogênicas e mutualísticas como os rizóbios são capazes de colonizar, invadir e estabelecer infecções crônicas no interior da planta hospedeira (SOTO *et al.*, 2009).

Em a natureza, diferentes espécies bacterianas são encontradas em associação, formando comunidades. Essas comunidades bacterianas ocupam todos os nichos terrestres, colonizando ambientes tais como solo, água, ar, plantas e animais. As comunidades bacterianas são consideradas a porção principal da biomassa na Terra, sendo responsáveis por alguns processos essenciais para a vida, como a ciclagem do carbono, do nitrogênio e do enxofre (ANDREOTE *et al.*, 2009).

As interações planta-bactéria podem ser subdivididas em três classes: patogênica, simbiótica e associativa (PÜHLER, *et al.*, 2004). Independentemente do tipo de interação planta-bactéria, a sobrevivência e a persistência do microrganismo em diversas partes do hospedeiro vegetal necessitam de respostas adaptativas por parte da bactéria (MILLER *et al.*, 1989).

As interações planta-bacteria podem variar de acordo com o nicho da planta ocupado, podendo ser patogênicas, endofíticas ou epifíticas (ANDREOTE, *et al.*, 2009). A distinção entre essas bactérias é apenas de natureza didática, não

existindo um claro limite entre os grupos e sim um gradiente entre eles, visto que existem algumas populações que podem flutuar entre a colonização endofítica e a epifítica (HALLMANN *et al.*, 1997b).

Os mecanismos de penetração dessas bactérias nos tecidos vegetais podem ser distintos, envolvendo os estômatos, ferimentos, áreas de emergências, raízes laterais e a produção de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular dos vegetais (DI FIORE & DEL GALLO, 1995; QUADT-HALLMANN *et al.*, 1997 a; SHISHIDO *et al.*, 1999).

Quando a interação é fitopatogênica, o patógeno ataca as células do hospedeiro visando a utilizar substâncias produzidas pela planta em seu benefício (PÜHLER *et al.*, 2004). Para responder a essa interação, as plantas dependem de sua imunidade inata (Chisholm *et al.*, 2006). Estudos conduzidos sobre interação planta-patógeno indicam que a primeira linha de resposta da planta é acionada pelo reconhecimento de eliciadores gerais conhecidos como padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs/PAMPs). A percepção ao MAMP desencadeia várias respostas que ocorrem em minutos, com o fluxo de íons através da membrana plasmática, o aumento intracelular da concentração de Ca^{2+} , o estresse oxidativo, a ativação da MAP quinase e as grandes mudanças transcricionais (Nürnberg *et al.*, 2004).

Na interação associativa, o evento chave parece ser a colonização da rizosfera, onde o parasita é aparentemente mais favorecido, mas não causa danos à planta associada. A bactéria pode obter nutrientes do exsudado ou mesmo se instalar no interior da planta. Em troca, favorece a planta, suprimindo patógenos ou estimulando o crescimento vegetal através da produção de substâncias específicas (PÜHLER *et al.*, 2004). Entre os estágios deste processo, estão a percepção da planta pela bactéria, a quimiotaxia em direção à raiz e a aderência e colonização da superfície da raiz. Um exemplo nesse sentido é observado em *Pseudomonas fluorescens*, que exibe quimiotaxia em resposta a exsudados de plantas que atuam como dirigentes da interação planta-microrganismo (DE WEERT *et al.*, 2002).

Entre as interações benéficas que têm sido estudadas, estão aquelas em que as bactérias estabelecem simbiose com a planta (STACEY *et al.*, 1992; SMITH & READ, 1996). Nessa interação, as bactérias fornecem nutrientes às plantas ou contribuem com atividades bioquímicas relevantes ao metabolismo

vegetal. A planta, por sua vez, contribui com nutrientes gerados pelo processo fotossintético (GLENN & DILWORTH, 1985). Essas interações causam diversos efeitos para a planta, como acréscimos de altura e biomassa da parte aérea, do caule, das raízes, formação de pelos radiculares e foliares e lignificação de vasos do xilema (STURTZ, 1995). A interação entre rizóbio e leguminosas é um dos exemplos mais bem estudados de simbiose, em que as bactérias, ao fornecerem amônia à planta, aumentam sua capacidade de crescer em solos pobres neste nutriente e, em troca, recebem carboidratos (GLENN & DILWORTH, 1985). Essas espécies têm sido aplicadas comercialmente há muitos anos como biofertilizantes (KLOEPPER & BEAUCHAMP, 1992).

2.2. Nichos da planta ocupados pelas bactérias promotoras do crescimento vegetal

As bactérias associadas às plantas podem colonizar a superfície ou ocupar espaços dentro dos tecidos (BRENCIC & WINANS, 2005). Os nichos de colonização na planta podem ser classificados em filosfera, endosfera e rizosfera.

O ambiente filosfera está relacionado com as partes aéreas da planta. O ambiente endosfera é definido como o sistema interno de transporte. O termo rizosfera é definido como a região do solo que está ligada pelas raízes das plantas, frequentemente se estendendo a alguns milímetros desde a superfície da raiz (Bringhurst *et al.*, 2001). De acordo com Hiltner (1904), esta região do solo é bastante rica em bactérias quando comparada com as que circundam o solo.

A região da rizosfera é rica em bactérias por causa dos exsudados das plantas, tais como aminoácidos e açúcares, que fornecem um ambiente favorável rico em nutrientes, resultando em maior população bacteriana nessa região (Haas & Defago, 2005). Essa interação é benéfica para melhor aporte de água e nutrientes para as plantas (Ryan *et al.*, 2009), pois essas comunidades estão diretamente associadas aos ciclos biogeoquímicos do C, P, N e S, incluindo também a remoção de toxinas, produção de fitormônios, antibióticos, entre outras (Cardoso & Freitas, 1992).

2.3. Mecanismos da promoção do crescimento vegetal

Os mecanismos de promoção do crescimento vegetal desenvolvidos por bactérias associadas às plantas podem ser consequência de ações diretas e

indiretas. De acordo com Castro *et al.* (2009), os mecanismos gerais de promoção de crescimento diretos incluem a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, solubilização de minerais como fósforo e ferro, a produção de sideróforos e a indução de resistência sistêmica. E os mecanismos gerais de promoção indireta de crescimento são basicamente relacionados com biocontrole, incluindo a produção de antibióticos, a quelação de Fe disponível na rizosfera, síntese de enzimas extracelulares para hidrolisar a parede celular fúngica e da competição com patógenos por nichos dentro da rizosfera (Zahir *et al.*, 2004; Van Loon, 2007).

Através da fixação do nitrogênio, da biodisponibilização do fosfato, da aquisição de ferro, da exposição da atividade específica enzimática e da proteção das plantas contra patógenos nocivos pela produção de antibióticos, as bactérias promotoras do crescimento vegetal podem melhorar a qualidade das culturas agrícolas (Spaepen *et al.*, 2007). Com base em seus diversos mecanismos de ação, as ações das bactérias promotoras do crescimento vegetal podem ser classificadas em três formas gerais - biofertilizantes, fitoestimuladoras e biopesticidas (Bhattacharyya & Jha, 2012).

A ação de biofertilizante é caracterizada como efeito das substâncias produzidas por microrganismos vivos que, quando aplicados sobre a superfície da planta, semente ou solo, colonizam a rizosfera e promovem o crescimento das plantas pelo aumento de nutrientes primários para as plantas. Entre esses mecanismos de ação, destacam-se a fixação biológica de nitrogênio e a solubilização de P (Vessey, 2003; Somers *et al.*, 2004). Vessay (2003) enumera alguns gêneros de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal com alto potencial de agir como biofertilizantes, entre eles, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*.

Fitoestimulação é a ação desenvolvida por microrganismos capazes de produzir fitormônios tais como ácido indol acético, ácido giberélico, citocininas e etileno (Lugtenberg *et al.*, 2002; Somers *et al.*, 2004).

Biopesticidas são ações desempenhadas por microrganismos que promovem o crescimento da planta, controlando agentes fitopatogênicos pela produção de antibióticos, sideróforos, enzimas hidrolíticas e indução de resistência sistêmica (Vessey, 2003; Somers *et al.*, 2004; Chandler *et al.*, 2008). Segundo Bevivino *et al.* (1998), a estirpe de *Burkholderia cepacia* tem sido

observada com característica de biocontrole para *Fusarium* spp., estimulando o crescimento de plantas de milho em solos pobres em ferro pela produção de sideróforos.

2.3.1. Bactérias solubilizadoras de fosfato

O fósforo (P) é, após o nitrogênio, o segundo macronutriente limitante para o crescimento e a produção de culturas agrícolas (VANCE, 2001). Ele está envolvido em funções biológicas básicas como a formação de ácidos nucleicos, fosfolipídios, metabolismo energético, ativação de metabolismo intermediário e regulação enzimática através das cascatas de tradução de sinais (ABEL *et al.*, 2002; RAUSCH & BUCHER, 2002; SCHÜNEMANN *et al.*, 2004).

O P é aplicado ao solo na forma de fertilizantes fosfatados. Cerca de 5 a 30% dos fertilizantes fosfatados aplicados aos solos são aproveitados pelas plantas e uma parte significativa é reduzida por reações físico-químicas no solo (TROLOVE *et al.*, 2003). No entanto, uma grande porção de fosfato inorgânico (Pi) solúvel, aplicado ao solo como adubo químico, é rapidamente imobilizado sob as formas de fosfato de cálcio (CaHPO_4), fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), fosfato de ferro (FePO_4) e fosfato de alumínio (AlPO_4). Sob tais formas, o fosfato não é assimilado de forma eficiente pelas plantas, demandando aplicação excessiva de adubos fosfatados nas áreas de cultivo (OMAR, 1998).

Os recursos globais de fertilizantes fosfatados economicamente acessíveis vão se esgotar num futuro próximo, resultando em aumento de custos dos fertilizantes fosfatados, bem como na sua escassez (ISHERWOOD, 2000). Para evitar uma possível escassez de P, especialmente em economias menos competitivas, estratégias de melhoria da produtividade de diversas culturas devem ser desenvolvidas com abordagens sustentáveis de adaptação de cultivos a ambientes de baixa fertilidade, melhorando, para tanto, sua capacidade de aquisição de nutrientes (LYNCH, 2007; BEDDINGTON, 2010).

O fornecimento de P para as plantas por meio de insumos biológicos é uma alternativa sustentável e viável, já que o P solúvel é liberado a partir de reações de solubilização de fosfatos insolúveis envolvendo diversos microrganismos (Marschner and Dell, 1994).

Bactérias solubilizadoras de fosfato (“phosphate solubilizing bacteria”-PSB) podem solubilizar P insolúvel pela produção de vários ácidos orgânicos de baixa

massa molecular (Taha *et al.*, 1969), podendo também atuar como agentes quelantes (Lin *et al.*, 2006). Outro mecanismo de solubilização de P é a extrusão de prótons (H^+) (Illmer and Schinner, 1992), a produção de exopolissacarídeos (EPS) (Barberi *et al.*, 2004) e a produção de sideróforos (Yu *et al.*, 2011).

Essa habilidade de solubilizar P possibilita o aumento do fósforo disponível para as plantas, auxiliando no papel fundamental no ciclo biogeoquímico do P em ecossistemas naturais e agrícolas (Rodriguez and Fraga, 1999; Zeng *et al.*, 2012).

Microrganismos solubilizadores de fosfato têm atraído a atenção dos pesquisadores que objetivam melhorar o crescimento e o rendimento das plantas. Bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP) têm sido identificadas entre os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia* (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999).

2.4. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudo

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh, Tabela 1, é uma dicotiledônea da família da mostarda, cuja distribuição natural ocorre na Europa, Ásia e América do Norte. É considerada uma planta daninha de pequena importância agrícola. Muitos ecótipos diferentes têm sido coletados de populações naturais, entre eles, o ecótipo Colúmbia (COL-0), amplamente empregado para estudos genéticos e moleculares (TAIR, 2010).

O primeiro mutante, *AGAMOUS*, foi descrito em 1873 por Alexander Braun e, em 1943, Friedrich Laibach relatou o potencial desta espécie como planta modelo. Atualmente, *A. thaliana* é a planta vascular mais bem estudada, tem o genoma relativamente pequeno, com cerca de 146 milhões de pares de bases (BEVAN & WALSH, 2006), inteiramente sequenciado. Por possibilitar o uso de muitas ferramentas moleculares, atualmente *A. thaliana* é considerada a planta modelo para estudos genéticos.

Além disso, *A. thaliana* é uma planta de reprodução rápida com ciclo de vida curto, apresenta pequeno porte, o que possibilita o crescimento de várias plantas em espaços reduzidos como casas de vegetação. Muitos estudos sobre o crescimento, desenvolvimento e capacidade nutricional têm sido realizados para esta espécie. Por exemplo, tem sido possível a identificação de genes envolvidos na resposta à limitação de fósforo (SÁNCHEZ-CALDERÓN *et al.*, 2006

A. thaliana foi a primeira planta e o terceiro organismo multicelular, depois de *Caenorhabditis*

elegans (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998) e *Drosophila melanogaster* (ADAMS *et al.*, 2000), a ter seu genoma sequenciado (*The Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Tal trabalho propiciou aumento gradativo no número de publicações que utilizam *A. thaliana* como planta modelo (BEVAN & WALSH, 2006).

Tabela 1: Classificação atual de *Arabidopsis thaliana*

Classificação	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Brassicales
Família	Brassicaceae
Gênero	<i>Arabidopsis</i>
Espécie	<i>Arabidopsis thaliana</i>

Fonte: NCBI (2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterização de isolados bacterianos de abacaxi (*Ananas comosus* L.) capazes de fazer a solubilização de fosfatos e a avaliação de seu efeito na inoculação de plantas de *Arabidopsis thaliana* a partir de fontes insolúveis deste nutriente.

3.2. Objetivos específicos

1. Identificar os meios de cultura apropriados para a aplicação da metodologia baseada no halo de solubilização de P;
2. Comparar o efeito de diferentes fontes de fosfato inorgânico na formação do halo de solubilização de P;
3. Selecionar, entre os acessos da bacterioteca de abacaxi, isolados bacterianos capazes de solubilizar fosfato inorgânico;
4. Fazer a caracterização molecular dos isolados positivos para solubilização de P inorgânico através do sequenciamento da região do gene 16S rDNA;

5. Encontrar condições apropriadas para o cultivo de *A. thaliana* que permitam a análise do efeito da solubilização de fosfato, realizada por bactérias, sobre o desenvolvimento vegetal; e
6. Avaliar o efeito da promoção do crescimento conduzido por bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico em plantas de *A. thaliana* pela análise de peso fresco.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia (LBT), situado no Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes-RJ.

4.1. Isolados bacterianos

Foi utilizada a bacterioteca de abacaxi contendo 21 isolados de folhas, raízes e rizosferas, Tabela 2, cedida pelo Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – LBCT/CBB/UENF. Tais bactérias foram isoladas pelo Dr. Samuel Tavares dos Santos (SOUZA, 2008). Para fins de identificação da bacterioteca, cada isolado recebeu uma designação, seguida de um número informativo quanto à sua origem, Figura 1, em que foram descritas as características para a identificação dos isolados, que, por sua vez, foram armazenados em duplicatas em água ultrapura estéril.

Como controle positivo para a solubilização de fosfato, foi utilizada a bactéria selvagem *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 pela sua capacidade de promotora do crescimento vegetal. Esta bactéria também foi cedida pelo Prof. Dr. Fábio Lopes Olivares.

4.2. Cultivo bacteriano em meio líquido

Para o preparo do meio de cultura, os componentes foram dissolvidos em água destilada e, após solubilização, o meio foi esterilizado a 121°C, 1 atm, por

20 minutos. O pH do meio DYGS foi ajustado para 6,0 com KOH antes da esterilização.

As bactérias foram cultivadas em meio líquido DYGS (RODRIGUES NETO, 1986), Tabela 3, a 30°C, por 12 horas, a uma agitação de 140 rpm, rotações por minuto, em um agitador-incubador orbital.

4.3. Ensaio de solubilização de fosfato inorgânico em meio de cultivo sólido

Para selecionar bactérias capazes de solubilizar fosfato, foi utilizada a metodologia baseada na formação da zona de clareamento ao redor da colônia. Para condução dos ensaios, foram avaliados os meios de cultivo definidos: LGI (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988), modificado por Saravanan e colaboradores, (2007c) – LGIm, Tabela 4, e o meio Basal, descrito por Verma *et al.* (2001), com algumas modificações (Tabela 5). Aos meios, foram acrescentadas separadamente diferentes fontes de P inorgânicos: fosfato de cálcio terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) (g.L^{-1} : 2,7) e fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) (g.L^{-1} : 0,8). Como indicador de pH, foi utilizado azul de bromotimol 0,5 % em KOH 0,2 M (5mL.L^{-1}) para ambos os meios, e o pH foi ajustado para 6,0 com ácido acético.

Para os inóculos, uma alíquota de 10 μl de cada cultivo bacteriano foi depositada sobre os meios sólidos, e incubada em estufa a 30 °C durante 10 dias para a observação do halo de solubilização.

Após o primeiro ensaio, as bactérias selecionadas como solubilizadoras de fosfato foram novamente inoculadas em três repetições, com a densidade óptica ajustada para 1,0 ($D_{600}=1,0$), aproximadamente 10^8 células/ml.

A avaliação da solubilização de P foi feita por medição, com o auxílio de uma régua, do diâmetro do halo translúcido que se formou em torno da colônia bacteriana. O tamanho do halo foi dado pela fórmula: diâmetro do halo (mm) = diâmetro total - diâmetro da colônia.

Tabela 2: Isolados da bacterioteca de *Ananas comosus* (L.), cultivares Smooth Cayenne e Pérola, utilizados para o ensaio de solubilização de fosfato.

Número de Isolados	Código coleção UENF	Origem do isolado
1	UENF 11292J	raiz / epifítico
2	UENF 111923	Rizosfera
3	UENF 111924	Rizosfera
4	UENF 111925	Rizosfera
5	UENF 112921	raiz / epifítico
6	UENF 112922	raiz / epifítico
7	UENF 112925	raiz / epifítico
8	UENF 113821	raiz / endofítico
9	UENF 113922	raiz / endofítico
10	UENF 113923	raiz / endofítico
11	UENF 116828	folha / epifítico
12	UENF 117826	folha / endofítico
13	UENF 117828	folha / endofítico
14	UENF 121921	rizosfera
15	UENF 121922	rizosfera
16	UENF 121923	rizosfera
17	UENF 121924	rizosfera
18	UENF 122921	raiz / epifítico
19	UENF 123921	raiz / epifítico
20	UENF 123925	raiz / endofítico
21	UENF 127924	folha / endofítico

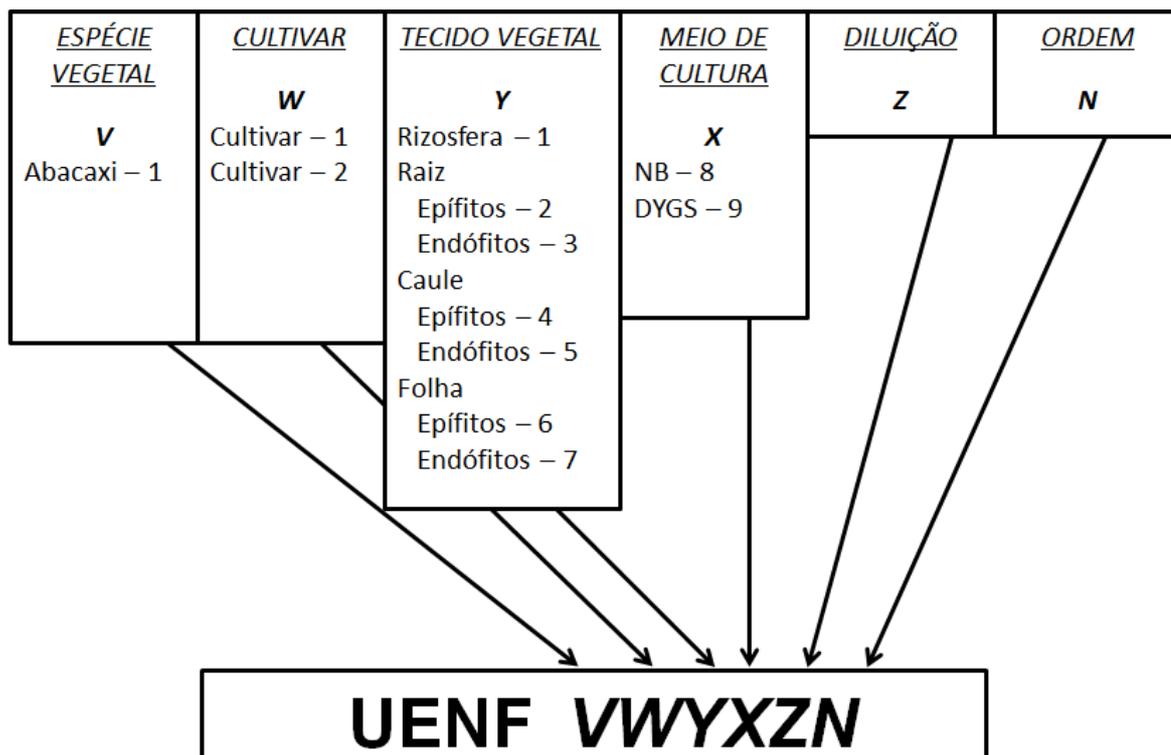


Figura 1: Código para identificação dos isolados bacterianos de abacaxi, com a palavra “UENF” seguida de um conjunto de números. As plantas de abacaxi foram cultivadas em casa de vegetação no campus da UENF. Adaptado e modificado de Santos (2008).

Tabela 3: Composição do meio de cultivo DYGS - pH 6,0

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Glicose	2,0
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
Extrato de levedura	2,0
Peptona bacteriológica	1,5
Ácido glutâmico	1,5

Tabela 4: Composição do meio de cultivo LGLm

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Glicose	10,0
K ₂ HPO ₄	0,2
KH ₂ PO ₄	0,6
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,002
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,018
Ágar	17,0

Tabela 5: Composição do meio de cultivo Basal

Componente	Concentração (g.L⁻¹)
Glicose	10,0
NH ₄ Cl	5
NaCl	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0
Ágar	15,0

4.4. Caracterização Molecular

4.4.1. Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi feita para os isolados que conferiram a capacidade de solubilizar fosfato a partir de células cultivadas em meio DYGS líquido (Rodrigues Neto, 1986), Tabela 3, utilizando o kit de extração *Plant DNAzol* (INVITROGEN, Grand Island, NY, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi analisado em gel de agarose 1% e quantificado por espectrofotometria (Nanodrop 3000, Thermo Scientific, USA).

4.4.2. Amplificação do gene 16S rDNA

O DNA genômico de cada isolado bacteriano foi utilizado como molde para amplificação da região do gene 16S rDNA através de PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos para o domínio *Eubacteria* fD1 “forward” (5’-

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 "reverse" (5'AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG *et al.*, 1991).

As reações foram realizadas em volume final de 50 µl contendo 20 pmols de oligonucleotídeos, 200 µM de cada dNTP, 1 X tampão da enzima, 2 U da enzima *Taq* DNA polimerase (FERMENTAS), 1,5 mM de MgCl₂ e 20 ng de DNA molde. A reação de amplificação foi realizada em termociclador modelo Veriti-96 well thermal cycler (Applied Biosystems), dentro do programa 94°C/3 minutos, 30 ciclos de amplificação (94°C/1 minuto, 55°C/30 segundos, 72°C /30 segundos), 72°C/10 minutos. Após a amplificação, foram retirados 5 µl do produto de reação de PCR, para avaliação por eletroferese em gel de agarose 1,2%, contendo brometo de etídeo. O tamanho do fragmento esperado era de, aproximadamente, 1500 pares de base.

O restante dos produtos amplificados foi precipitado com a adição de 60µl de isopropanol 100% (MERCK) e 20µl de água ultrapura autoclavada, vortexado e incubado por 2 horas a -20°C. O material foi centrifugado a 14000 rpm por 25 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. Ao sedimento, foram adicionados 200µl de etanol 70% (MERCK), centrifugados a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento seco a 40°C por 10 minutos foi, posteriormente, ressuspenso em 25µl de água ultrapura.

4.4.3. Sequenciamento do gene 16S rDNA

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism versão 3 - Life Technologies, USA, seguindo as recomendações do fabricante. Cada reação de sequenciamento foi ajustada para um volume final de 10 µl, utilizando 20 ng dos fragmentos de interesse, 3,2 pmoles de oligonucleotídeos iniciadores rD1 ou fD1, além dos conjuntos de oligonucleotídeos internos descritos, Tabela 6, 2,0 µl de tampão 2,5 X e 0,5 µl dos terminadores Big Dye. As condições de reação foram: 94°C/ 4min.; 25 ciclos (94°C/ 1 min., 55°C/ 30s,60°C/ 4 min.) em sequenciador ABI, modelo 3130 (Applied Biosystems).

Foi utilizado o programa BLAST contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). As sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal W 1.8 (Thompson *et al.*, 1994). Posteriormente, as extremidades das sequências de DNA foram ajustadas com o auxílio do programa

Bio Edit (Hall, 2001), de forma que todas tivessem o mesmo número de bases e estivessem completamente alinhadas.

Tabela 6: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores internos para amplificação do gene 16S rDNA. Adaptado de Lane (1991).

Sequência (3'- 5')	Posição de alinhamento na sequência de <i>E. coli</i>
CCT ACG GGA GGC AGC AG	341-357F
CTG CTG CCT CCC GTA GG	357-431R
GTA G(GC)G GTG AAA T(GC)C GTA GA	685-704F
TCT ACG (GC)AT TTC ACC (GC)CT AC	704-685R
GCA ACG AGC GCA ACC C	1099-1114F
GGG TTG CGC TCG TTG C	1114-1099R

4.5. Material Vegetal

As sementes de *A. thaliana* L.(Heyn), ecótipo Columbia (Col-0), utilizadas nos ensaios, foram gentilmente cedidas pelo professor Frederick Ausubel (Harvard University, Cambridge).

4.5.1. Desinfestação e condições de cultivo de *A. thaliana*

As sementes de *A. thaliana* foram desinfestadas superficialmente, sendo imersas em etanol 95% (MERCK) por dois minutos e, em seguida, imersas em hipoclorito de sódio 2,5% por dez minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas seis vezes com água ultrapura. Após a desinfestação, as sementes de *A. thaliana* foram incubadas por 48 horas em água ultrapura, em geladeira, visando à quebra de dormência e à estratificação.

Após esse período, as sementes de *A. thaliana* foram semeadas em potes de 50 ml contendo substrato inerte (vermiculita:areia, 4:1) e irrigados com 20 ml de solução de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) (Tabela 7). Em seguida, foram mantidas em sala de cultivo sob as seguintes condições: intensidade luminosa de 110 $\mu\text{mol m}^2.\text{s}^{-1}$; temperatura de 22°C e umidade relativa de 65%; e regadas com solução de Hoagland/água destilada com intervalo de dois dias.

Tabela 7: Solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950)

Composição	
KNO ₃	6,0mM
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4,0mM
NH ₄ H ₂ PO ₄	2,0mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0mM
KCl	0,05mM
H ₃ BO ₃	0,025mM
MnSO ₄ .H ₂ O	2,0μM
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,0μM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,5μM
H ₂ MoO ₄	0,5μM
NaFeDTPA	0,053Mm

4.5.2. Padronização das condições ideais de substrato inerte para cultivo de *A. thaliana*

Para a escolha de um substrato inerte que possibilitasse o controle nutricional e que propiciasse o melhor cultivo das plantas de *A. thaliana*, foram escolhidas vermiculita e areia. A escolha pela vermiculita foi feita em função da sua característica hidrofílica, que permite que seu volume aumente até vinte vezes. A opção pela areia foi feita com intuito de equilibrar o efeito da vermiculita. Ambos os substratos foram lavados e esterilizados a seco a 180°C/5h.

Após a esterilização, os substratos foram misturados em suas devidas proporções, Tabela 8, e acondicionados em potes de 50 ml irrigados com 20 ml de solução de Hoagland. Posteriormente, foram semeados e vedados totalmente com filme de PVC.

No sétimo dia, o filme de PVC foi parcialmente removido, e com dez dias cada pote recebeu novamente 10 ml de solução de Hoagland. No décimo quarto dia, o filme de PVC foi totalmente removido e as irrigações passaram a ser feitas com solução de Hoagland/água destilada com intervalo de dois dias.

As plantas foram mantidas em sala de cultivo com 10 repetições para cada tratamento até completarem 31 dias. Após esse período, a análise foi feita pela

avaliação da porcentagem de germinação e pelo aspecto físico das plantas de *A. thaliana*.

Tabela 8: Proporções de substrato inerte para cultivo de *A. thaliana*

Substrato	Concentrações (v:v)								
	5	4	3	2	1	1	1	1	1
Areia	5	4	3	2	1	1	1	1	1
Vermiculita	1	1	1	1	1	2	3	4	5

4.5.3. Definição da concentração limitante de fósforo solúvel na solução de Hoagland para o cultivo de *A. thaliana*

Após a escolha da proporção ideal de substrato inerte para o cultivo das plantas de *A. thaliana*, foi realizado um ensaio em que a fonte de P solúvel ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) da solução de Hoagland foi gradativamente substituída por uma fonte insolúvel de fosfato de cálcio terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), o mesmo utilizado no ensaio de solubilização de fosfato. Sendo assim, obtivemos seis tipos de tratamentos variando na concentração de P solúvel e insolúvel (Tabela 9).

As plantas de *A. thaliana* foram cultivadas em potes de 50 ml contendo vermiculita e areia (4:1) e irrigadas com 20 ml de solução de Hoagland em seus respectivos tratamentos com dez repetições cada, em um período de 31 dias, conforme o item 5.5.2. Em seguida, as plantas foram analisadas quanto ao peso fresco da parte aérea.

Tabela 9: Curva de fosfato insolúvel ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) e solúvel ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) na solução de Hoagland.

Tratamentos	P insolúvel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	P solúvel $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
T 1	100%	0%
T 2	80%	20%
T 3	60%	40%
T 4	40%	60%
T 5	20%	80%
T 6	0%	100%

4.5.4. Ensaio de solubilização de P por bactéria durante interação com plantas de *A. thaliana*

Após a escolha da definição da concentração limitante de fósforo solúvel na solução de Hoagland para o cultivo de *A. thaliana*, deu-se início aos testes de inoculações com as bactérias que conferiram a capacidade de solubilizar fosfato.

As plantas foram cultivadas conforme descrito no item 4.5.2 e as inoculações iniciadas no décimo sétimo dia de germinação. Assim, os cultivos bacterianos previamente realizados em meio DYGS, conforme descrito no item 4.2, foram centrifugados a 5000 RPM por 4 minutos, em seguida, o precipitado foi ressuspenso no volume inicial de água ultrapura. Posteriormente, as bactérias tiveram sua densidade óptica ajustada para 1,0 ($D_{600}=1,0$) (10^8 células/ml).

As bactérias foram inoculadas em solução de Hoagland e água diretamente no substrato inerte com a concentração final de 10^4 células/ml para cada tratamento com o volume de 10 ml.

As plantas germinadas em substrato inerte receberam os tratamentos contendo os diferentes isolados bacterianas a partir do décimo sétimo dia de idade (Figura 2). Tais adições foram repetidas a cada sete dias. As plantas inoculadas com a solução de Hoagland receberam água dois dias após a inoculação, e as que foram inoculadas com água receberam solução de Hoagland

dois dias após a inoculação. As irrigações continuaram em intervalos de dois dias até as plantas completarem trinta e um dias.

Os experimentos foram mantidos em sala de cultivo, sendo montados em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado), com quatro tratamentos, Tabela 10, com dez repetições. Após 35 dias de cultivo, as plantas foram analisadas quanto ao peso fresco da parte aérea.

Figura 2: Esquema dos ensaios de solubilização de P por bactéria durante interação com plantas de *A. thaliana*

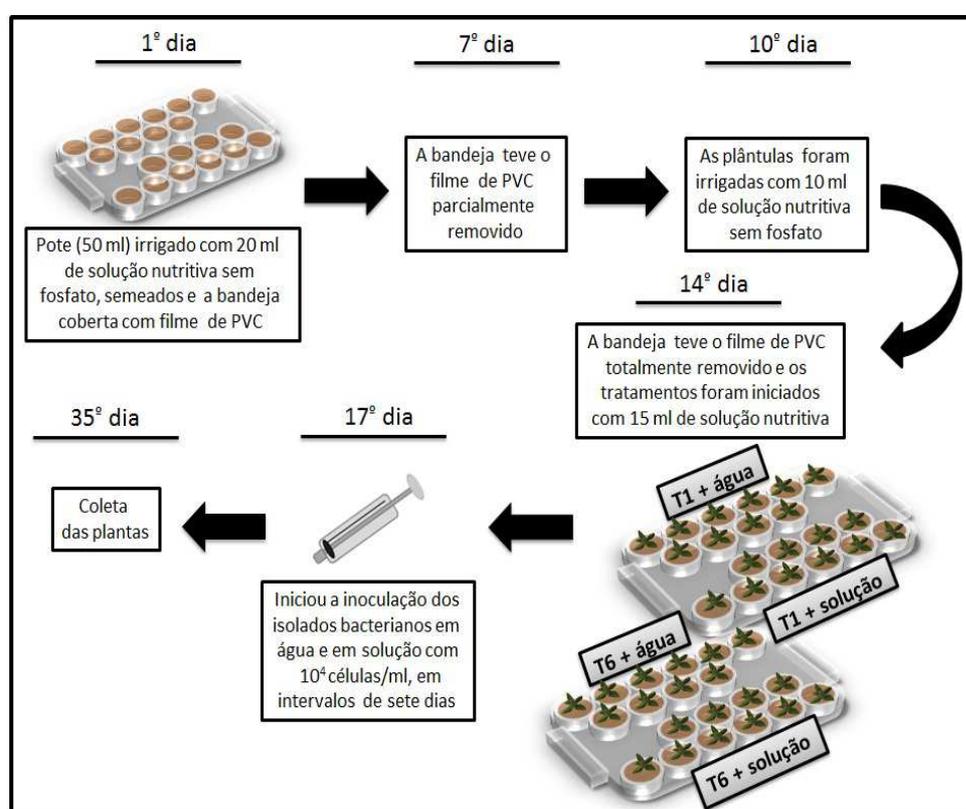


Tabela 10: Tratamentos utilizados nos ensaios de solubilização de P por bactéria durante interação com plantas de *A. thaliana*

	Tratamentos	Inoculação
T1	100% de	Água
	P insolúvel - $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	Solução de Hoagland
T6	100% de	Água
	P solúvel - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	Solução de Hoagland

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do meio de cultura e de diferentes fontes de fosfato inorgânico na eficiência de solubilização por isolados bacterianos de abacaxi

Com o objetivo de avaliar a capacidade dos diferentes isolados bacterianos de promover a solubilização de fosfato, foi utilizada metodologia baseada na formação da zona de clareamento ao redor da colônia em dois meios de cultura definidos, o meio Basal e o meio LGlM. Aos meios de cultura, foram adicionadas duas fontes de fosfato inorgânico separadamente, o fosfato de cálcio terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) e o fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), para a detecção da formação da zona de clareamento ao redor das colônias pelas bactérias isoladas de abacaxi.

Vinte e um isolados bacterianos de *Ananas comosus* (L.), cultivares Smooth Cayenne e Pérola, foram analisados quanto à capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*. Para este experimento, a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi utilizada como controle positivo por ser capaz de crescer e solubilizar fosfato em ambos os meios de cultivo com as duas fontes de fosfato insolúvel empregadas. A Tabela 11 reúne a identificação dos 21 isolados de abacaxi testados e sua classificação quanto à capacidade de solubilização de fosfato. Entre os isolados testados nas diferentes condições analisadas, oito apresentaram capacidade de solubilização de fosfato, o equivalente a 38% dos isolados. Entre estes isolados dois foram isolados da rizosfera e seis de raízes, três com comportamento epifítico e três endofítico. Nenhum organismo isolado de folha foi capaz de solubilizar fósforo nas condições testadas. Todos os

organismos selecionados estão presentes na zona de raiz, estando presentes no solo ou na planta (Tabela 12).

Quanto à metodologia utilizada para detecção do halo de solubilização, foram analisados três aspectos da cultura: visualização do halo, aspecto visual dos meios de cultura e crescimento das colônias. O resultado na Figura 1 mostra que ambos os meios utilizados no ensaio de solubilização de fosfato, acrescidos com a fonte de fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), possibilitaram a formação de halos de maior diâmetro, em comparação com os meios que receberam fosfato de cálcio terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$).

Com intuito de quantificar a solubilização de fosfato para os diferentes isolados, foi medido o diâmetro do halo de solubilização ao redor das colônias para cada bactéria positiva e de *G. diazotrophicus* (controle positivo). Os resultados apresentados nas Figuras 4 e 5 mostram que os isolados bacterianos diferiram quanto à capacidade de solubilizar fosfato no meio Basal, Figura 5, e em LGlM, Figura 4, com as diferentes fontes de fosfato insolúvel.

Gluconacetobacter diazotrophicus foi a bactéria que resultou em maior diâmetro do halo de solubilização, quando comparada com os oito microrganismos selecionados, em ambos os meios e fontes de fosfato. Os isolados bacterianos que produziram maior halo de solubilização, em meio Basal acrescido com a fonte de fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), foram as estirpes UENF 111925 e UENF 112922, Figura 4, com valores superiores a 2,0 cm. Já com fosfato de cálcio terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), foi possível identificar seis isolados bacterianos significativamente com maior capacidade de solubilização, fornecendo halo de diâmetros superiores a 0,5 cm. São eles: UENF 113821, UENF 111925, UENF 112922, UENF 122921, UENF 112925 e UENF 113922 (Figura 4).

Os testes com o meio LGlM, acrescido de fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), possibilitaram identificar o isolado UENF 113922, com diâmetro do halo superior a 3,0 cm, Figura 5, corroborando o que foi apresentado em meio Basal com o mesmo sal. O isolado forneceu halo de solubilização de fosfato com diâmetro superior 1,5 cm no meio LGlM acrescido com a fonte de fosfato de cálcio terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$).

Os ensaios com os meios acrescidos com fosfato de cálcio terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) mostraram baixa eficiência na formação do halo de solubilização

pelos isolados bacterianos quando comparados com meios contendo fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). No entanto, os resultados obtidos com fosfato de cálcio terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) mostraram que essa condição foi mais apropriada para a visualização definida dos halos de solubilização quanto comparada ao uso de fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).

Tabela 11: Bactérias isoladas de *Ananas comosus* (L.), cultivares Smooth Cayenne e Pérola, classificadas quanto à solubilização de fosfato.

Número de isolados	Código coleção UENF ^a	Origem do isolado	Solubilização de fosfato
1	UENF 11292J	raiz / epifítico	-
2	UENF 111923	Rizosfera	+
3	UENF 111924	Rizosfera	-
4	UENF 111925	Rizosfera	+
5	UENF 112921	raiz / epifítico	-
6	UENF 112922	raiz / epifítico	+
7	UENF 112925	raiz / epifítico	+
8	UENF 113821	raiz / endofítico	+
9	UENF 113922	raiz / endofítico	+
10	UENF 113923	raiz / endofítico	-
11	UENF 116828	folha / epifítico	-
12	UENF 117826	folha / endofítico	-
13	UENF 117828	folha / endofítico	-
14	UENF 121921	Rizosfera	-
15	UENF 121922	Rizosfera	-
16	UENF 121923	Rizosfera	-
17	UENF 121924	Rizosfera	-
18	UENF 122921	raiz / epifítico	+
19	UENF 123921	raiz / epifítico	-
20	UENF 123925	raiz / endofítico	+
21	UENF 127924	folha / endofítico	-

^aCódigo do isolado na coleção UENF: designação UENF, seguido de seis dígitos, que informam: a cultura (1: abacaxi); o cultivar (1: Smooth Cayenne), (2: Pérola); origem do isolado (1: rizosfera, 2: raiz/epifítico, 3: raiz/endofítico, 6: folha/epifítico 7: folha/endofítico); e o meio decultura (8: NB, 9: DYGS); a diluição; o número de ordem do isolado na coleção.

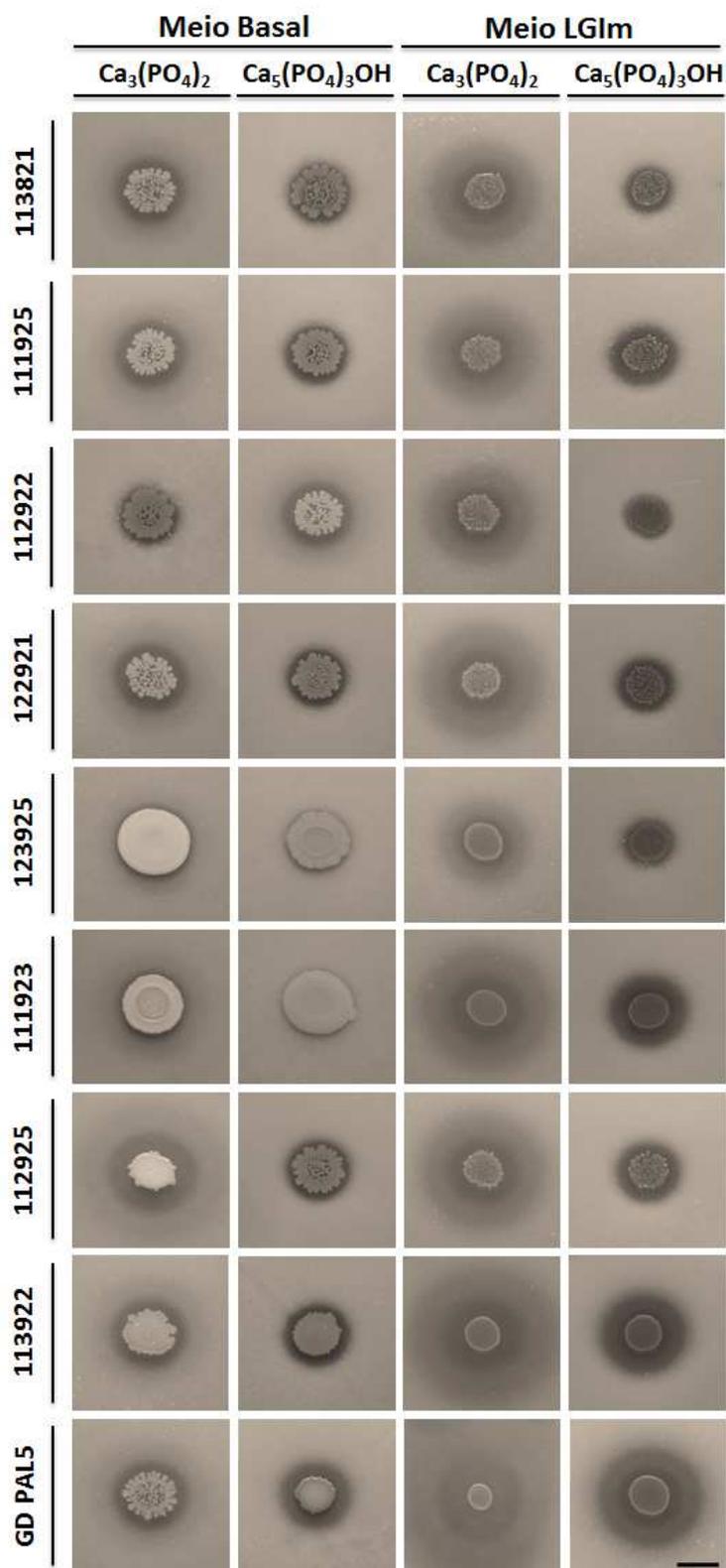


Figura 3: Caracterização das bactérias isoladas de *Ananas comosus* (L.), cultivares Smooth Cayenne e Pérola, quanto à solubilização de fosfato. Vertical: (1 a 8) Isolados selecionados como solubilizadores de fosfato, identificados na Tabela 11, (9) Bactéria *G. diazotrophicus* PAL5 utilizada como controle positivo. Horizontal: Indicação dos meios de cultura e das fontes de fosfato insolúvel utilizados durante os ensaios. A barra corresponde a 1 cm.

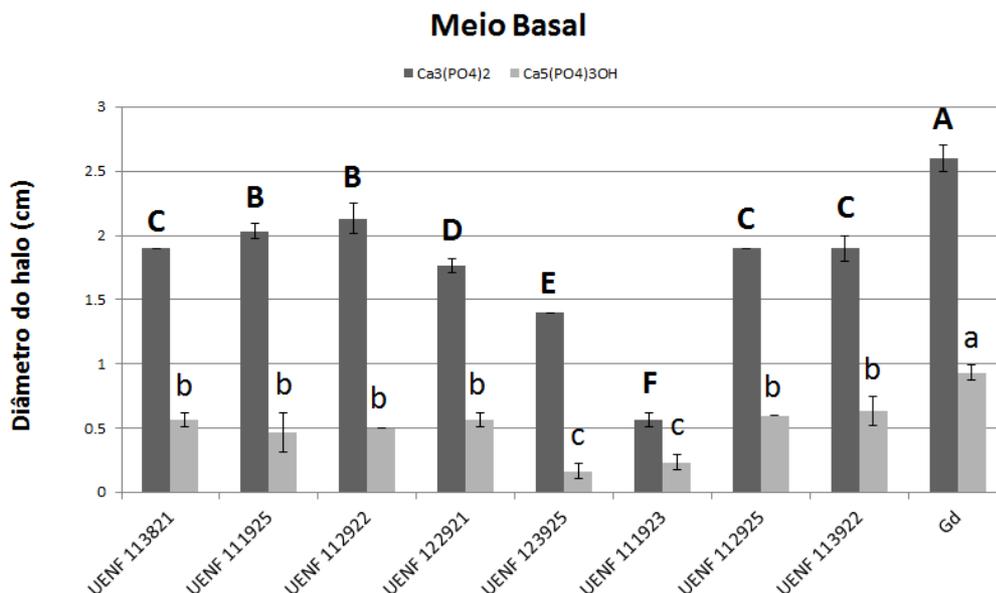


Figura 4: Diâmetro do halo de solubilização no meio Basal acrescido com a fonte de fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e fosfato terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) das bactérias isoladas de *Ananas comosus* (L.), cultivares Smooth Cayenne e Pérola. A bactéria *G. diazotrophicus* PAL5 (Gd) foi utilizada como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata. As barras verticais indicam o desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

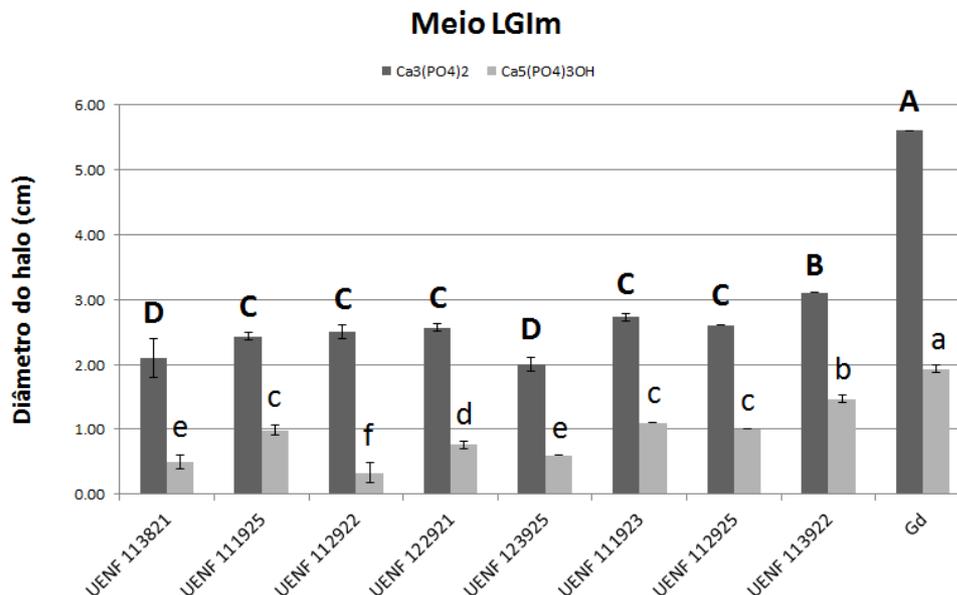


Figura 5: Diâmetro do halo de solubilização no meio LGLm acrescido com a fonte de fosfato tricálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e fosfato terciário ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) das bactérias isoladas de *Ananas comosus* (L.), cultivares Smooth Cayenne e Pérola. A bactéria *G. diazotrophicus* PAL5 (Gd) foi utilizada como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata. As barras verticais indicam o desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

Apesar de as bactérias apresentarem menor eficiência na formação de halos de solubilização em meio Basal, nesta condição, o crescimento das colônias foi mais eficiente (Figura 6). Adicionalmente, tal meio permite observar diversos aspectos morfológicos das colônias. Na Figura 6, podemos observar que os números 1, 2, 3, 4 e 7 apresentam morfologia similar à da colônia. Por outro lado, os números 5, 6, 8 e 9 apresentam morfologias de colônias diferenciadas.

5.2. Identificação molecular dos isolados bacterianos

5.2.1. Extração de DNA genômico e amplificação do gene 16S rDNA

O DNA genômico dos oito isolados bacterianos que apresentaram capacidade de solubilizar fosfato foi isolado. Na Figura 7, pode ser observado o padrão de eletroforese do DNA genômico extraído, com uma banda íntegra no início do gel (seta preta), indicando que o processo de extração do DNA foi bem sucedido e ele não se encontrava degradado. Ao final do gel, existe um padrão arrastado (seta azul) correspondente a moléculas de RNA degradadas co-extraídas durante o procedimento. A partir do DNA extraído, foi possível amplificar a região do gene 16S rDNA com os oligonucleotídeos para o domínio *Eubacteria* fD1 “forward” e rD1 “reverse”. Tal amplificação, que resultou em um fragmento de, aproximadamente, 1500 pares de base, pode ser observada na Figura 8. Como controle negativo, foi utilizada uma amostra sem DNA e, como esperado, não houve amplificação. A partir desse passo, os amplicons 16S rDNA foram submetidos ao sequenciamento de nucleotídeos.

5.2.2. Análise das sequências do gene 16S rDNA e identificação molecular dos isolados

Após a amplificação, as amostras de PCR foram purificadas seguindo reação de sequenciamento e análise de dados. Em média, foram obtidas sequências de 400 pb. As sequências de nucleotídeos do gene 16S rDNA de cada um dos diferentes isolados foram analisadas visando à sua identificação molecular. Tais sequências foram submetidas à análise comparativa na ferramenta *BLASTn*, no banco de dados internacional de sequências GenBank. O resultado dos alinhamentos permitiu a identificação dos oito isolados bacterianos selecionados a nível de gênero. Os dados resultantes das análises de alinhamento estão reunidos na Tabela 12. Os resultados permitiram distribuir os

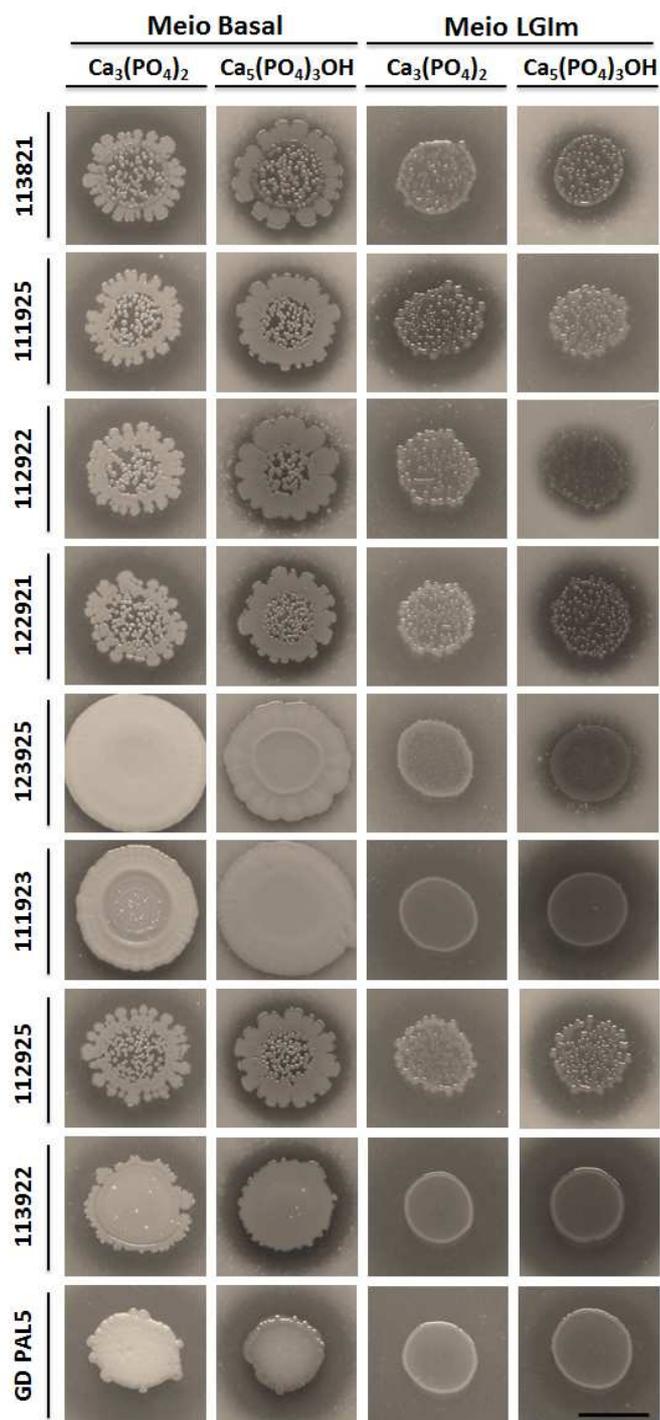


Figura 6: Morfologia da colônia das bactérias isoladas de *Ananas comosus* (L.), cultivares Smooth Cayenne e Pérola, quanto à solubilização de fosfato. Vertical: (1 a 8) Isolados selecionados como solubilizadores de fosfato, identificados no Quadro 1, (9) Bactéria selvagem *G. diazotrophicus* PAL5 utilizada como controle positivo. Horizontal: Indicação dos meios de cultura e das fontes de fosfato insolúvel utilizados durante os ensaios. A barra corresponde a 1,0 cm.

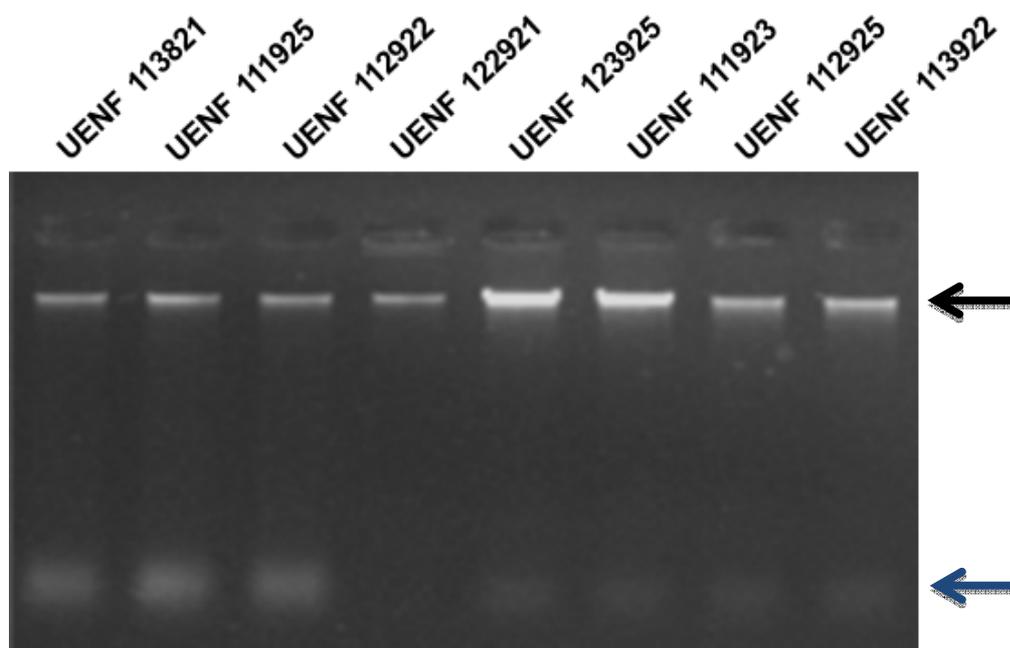


Figura 7: Visualização do padrão eletroforético da extração do DNA genômico das bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas de *Ananas comosus* (L.). As amostras de ácidos nucleicos extraídas dos isolados bacterianos foram separadas por eletroforese em gel de agarose 1,2%. A seta preta indica uma banda de alto peso molecular correspondente ao DNA genômico. A seta azul indica moléculas de RNA degradadas co-extraídas durante o procedimento.

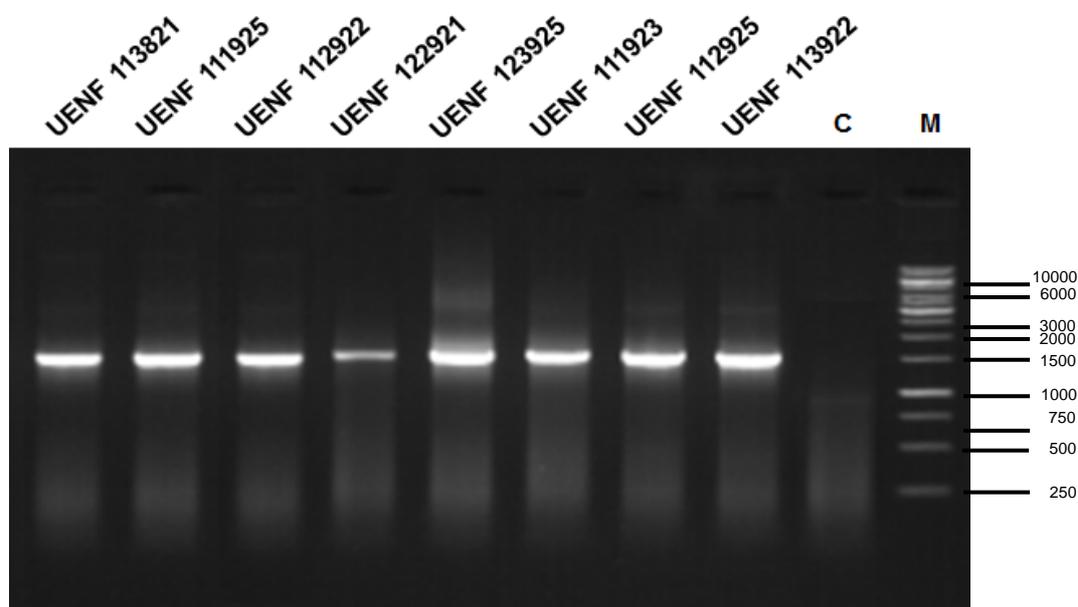


Figura 8: Visualização do padrão eletroforético da amplificação da região do gene 16S *rDNA* das bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas de *Ananas comosus* (L.). Produtos amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores rD1 e fD1 separados em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídeo. A seta preta indica uma banda de aproximadamente 1500pb correspondente à amplificação da região do gene 16S *rDNA*. Como controle negativo, foi utilizada para amplificação uma amostra sem DNA. M, marcador de peso molecular 1 Kb Ladder (Fermentas).

isolados em quatro gêneros bacterianos - *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Burkholderia*. Entre os gêneros encontrados, quatro foram identificados como *Bacillus*, dois, como *Burkholderia*, um, como *Pseudomonas*, e um, como *Enterobacter*.

Tabela 12: Identificação das bactérias isoladas de *Ananas comosus* (L.), cultivares Smooth Cayenne e Pérola, com base nos resultados do alinhamento de sequências.

Código coleção UENF	Tecido Vegetal	Organismo Relacionado ^a	Identidade ^b
UENF 113821	raiz – endofítico	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%
UENF 111925	rizosfera	<i>Bacillus</i> sp.	100%
UENF 112922	raiz – epifítico	<i>Bacillus</i> sp.	99%
UENF 122921	raiz - epifítico	<i>Bacillus</i> sp.	99%
UENF 123925	raiz - endofítico	<i>Enterobacter</i> sp.	99%
UENF 111923	rizosfera	<i>Burkholderia</i> sp.	94%
UENF 112925	raiz – epifítico	<i>Bacillus</i> sp.	96%
UENF 113922	raiz - endofítico	<i>Burkholderia</i> sp.	97%

^aOrganismo que possui a sequência com a qual a sequência parcial do gene 16S rDNA do isolado de abacaxi apresentou maior similaridade.

^bPorcentagem de identidade entre a sequência do isolado de abacaxi e a sequência do organismo relacionado.

5.3. Definição da condição ideal de substrato inerte para cultivo de *Arabidopsis thaliana*

Vermiculita e areia são dois substratos inertes comumente utilizados para o cultivo de plantas em casa de vegetação. Na procura de um substrato inerte que possibilitasse o controle nutricional e propiciasse o melhor cultivo das plantas de *A. thaliana*, diferentes proporções desses substratos foram testadas para germinação e crescimento das plantas. Nesse contexto, foram testadas diferentes proporções de vermiculita e areia (v:v) (Tabela 8). A escolha do melhor substrato foi feita através da avaliação da taxa de germinação das sementes de *A. thaliana* nas diferentes proporções dos substratos e avaliação do peso fresco da parte aérea das plantas aos 35 dias de cultivo.

Na Figura 9, estão representadas as taxas de germinação de sementes de *A. thaliana* para cada proporção de vermiculita/areia testada. Analisando a porcentagem de germinação, pode-se observar que a proporção 4:1 de vermiculita/areia proporcionou os melhores resultados. Nesta proporção, as sementes apresentaram germinação em torno de 89%, evidenciando que essa mistura apresentou as condições hídricas adequadas para que as sementes manifestassem seu potencial germinativo. Quando as sementes foram semeadas em proporções maiores de areia, a taxa de germinação decresceu (Figura 9).

Na Figura 10, podem ser observados os resultados do crescimento e desenvolvimento das plantas de *A. thaliana* nas diferentes proporções de vermiculita/areia pela avaliação do peso fresco da parte aérea. Nota-se que as plantas cultivadas no substrato com maior proporção de areia (1:5, 1:4, 1:3, 1:2/vermiculita:areia) mostraram os menores valores de peso fresco de parte aérea, aproximadamente 0,4g/planta. Na proporção de 1:1 de vermiculita:areia, as plantas apresentaram o seu pior índice de desenvolvimento, mostrando valores menores que 0,1g de peso fresco por planta analisada. Em contrapartida, pode-se observar que à medida que as concentrações de vermiculita foram aumentando (2:1, 3:1, 4:1, 5:1/vermiculita:areia), as plantas mostraram melhor desenvolvimento, apresentando valores de peso fresco da parte aérea superiores a 0,4g. A melhor proporção do substrato para desenvolvimento das plantas foi de 4 partes de vermiculita para 1 parte de areia (4:1), tendo sido os valores de peso fresco superiores a 0,6g (Figura 10).

5.4. Definição da concentração limitante de fósforo solúvel na solução nutritiva para o desenvolvimento de plantas *A. thaliana*

Após a escolha da proporção ideal de substrato inerte para o cultivo das plantas de *A. thaliana*, foi realizado um ensaio em que as fontes solúveis de fósforo da solução nutritiva de Hoagland foram gradativamente substituídas por uma fonte insolúvel. Para tanto, foi utilizado fosfato de cálcio terciário, $(Ca_5(PO_4)_3OH)$, a mesma fonte utilizada durante os ensaios de solubilização em placa para os isolados de abacaxi (Figura 3). Assim, as plantas foram cultivadas em solução.

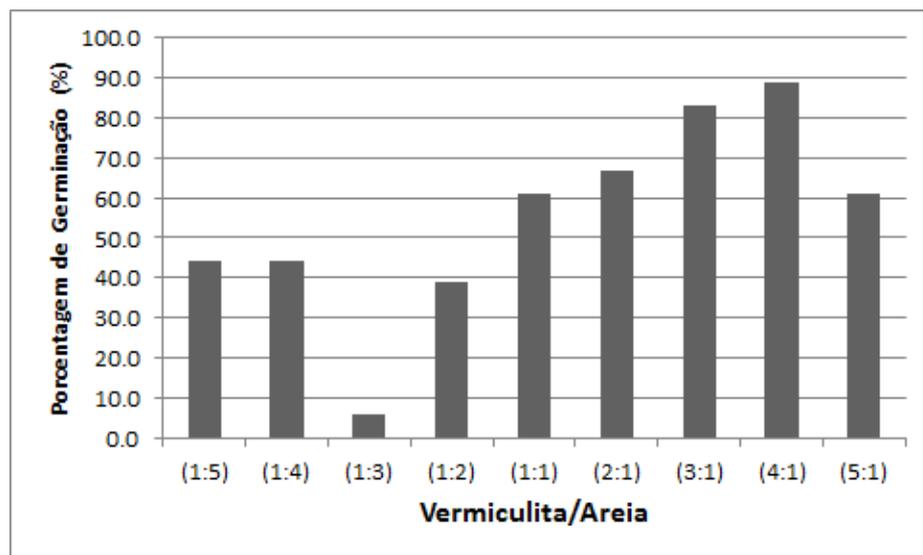


Figura 9: Análise da taxa de germinação de sementes de *A. thaliana* em diferentes proporções de vermiculita e areia. No gráfico, as barras verticais indicam a porcentagem de sementes de *A. thaliana* que germinaram quando semeadas em 9 proporções do substrato vermiculita/areia na presença de água.

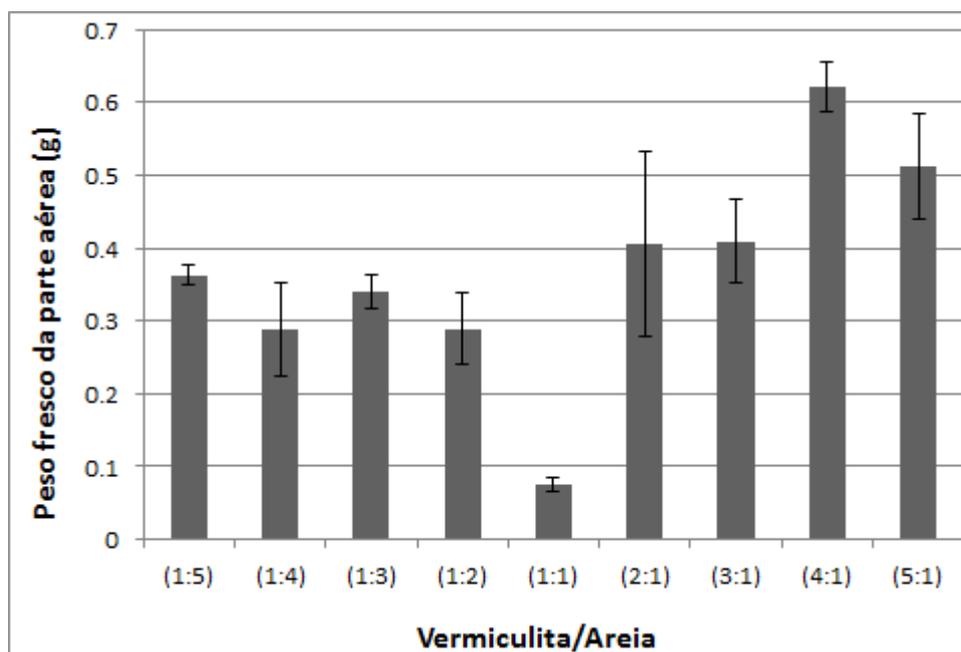


Figura 10: Avaliação da matéria fresca da parte aérea de *A. thaliana* cultivada em diferentes proporções de vermiculita/areia. No gráfico, as barras em cinza representam o peso fresco, em gramas, da parte aérea de plantas de *A. thaliana* cultivadas em 9 diferentes proporções do substrato vermiculita/areia. As barras verticais indicam o desvio padrão da média, sendo que as médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O experimento foi realizado com quatro repetições.

de Hoagland adicionada de concentrações crescentes de fosfato de cálcio terciário, em substituição às concentrações equivalentes de fosfato solúvel. Conforme apresentado na Tabela 9, os tratamentos T1, T2, T3, T4, T5 e T6 correspondem, respectivamente, a 100%, 80%, 60%, 40%, 20% e 0% de P insolúvel.

Podemos observar na Figura 12 que o tratamento 1 (T1) contendo apenas fosfato insolúvel limitou fortemente o crescimento vegetal. Entretanto, os resultados foram homogêneos entre as repetições, não ocasionando morte das plantas. Em T2 (80% de P insolúvel), pudemos observar um incremento no desenvolvimento das plantas, em que o peso fresco da parte aérea foi cerca de 7 vezes maior que o encontrado para T1. Os tratamentos que receberam dosagens superiores a 40% de fosfato solúvel (T3, T4, T5) não mostraram diferenças estatisticamente significativas em relação ao tratamento com 100% de fosfato solúvel (T6) (Figura 12).

A Figura 11 ilustra os resultados fornecidos pelas diferentes dosagens de fósforo solúvel sobre o desenvolvimento das plantas de *A. thaliana*. Podemos notar na Figura 11A que as plantas, quando colocadas na ausência de fósforo solúvel (T1 – 100% de P insolúvel), apresentam redução no tamanho das folhas e aspecto clorótico nas suas extremidades. Adicionalmente, é possível observar que as plantas nessas condições apresentaram uma coloração arroxeada na parte aérea, podendo ser resultado do acúmulo de antocianina em resposta à privação de fosfato (Figura 11A). A redução no tamanho das folhas e o aspecto clorótico nas extremidades das plantas de *A. thaliana* são menos aparentes, porém não desaparecem quando ocorre a adição de 20% de fósforo solúvel (Figura 11B). Contudo, tais sintomas desaparecem completamente à medida que o fosfato solúvel fica disponível (T3, T4, T5 e T6) e as concentrações de P insolúvel diminuem (Figuras 11C-12F).

A partir dos resultados obtidos, os tratamentos T1 e T6 foram escolhidos para serem utilizados nos ensaios posteriores de solubilização de fosfato durante a interação entre isolados bacterianos de abacaxi e plantas de *A. thaliana*.

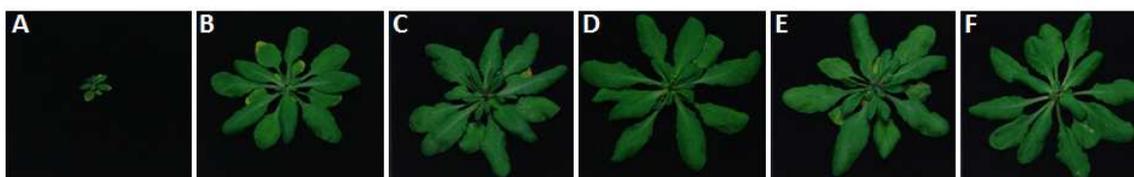


Figura 11: Plantas de *A. thaliana* cultivadas em solução de Hoagland contendo fosfato insolúvel ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) e solúvel ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Plantas de *A. thaliana* foram cultivadas em substrato vermiculita:areia (4:1) e molhadas periodicamente com solução de Hoagland acrescida de (A) 100% de fósforo insolúvel; (B) 80% de fósforo insolúvel e 20 % de fósforo solúvel; (C) 60% de fósforo insolúvel e 40 % de fósforo solúvel; (D) 40% de fósforo insolúvel e 60 % de fósforo solúvel; (E) 20% de fósforo insolúvel e 80 % de fósforo solúvel; e (F) 100% de fósforo solúvel.

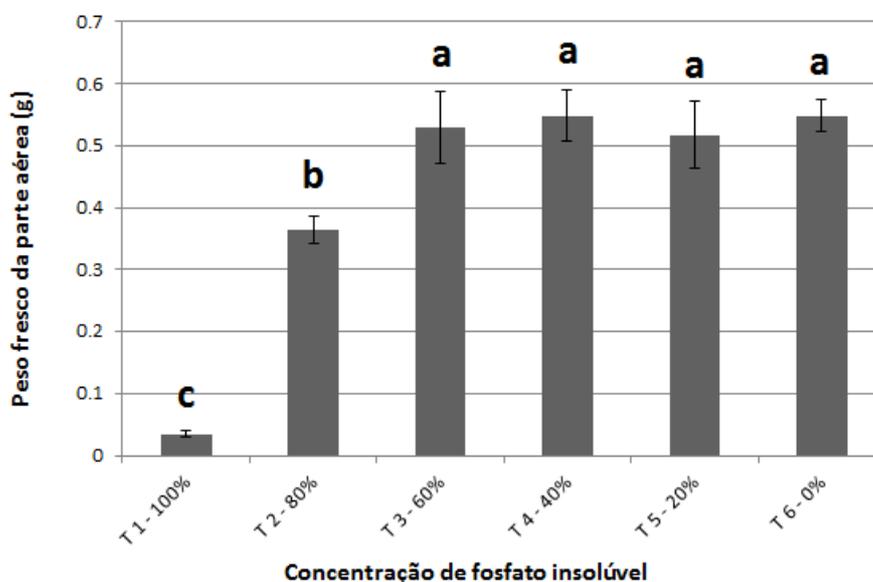


Figura 12: Avaliação da matéria fresca da parte aérea de plantas de *A. thaliana* cultivadas em solução nutritiva de Hoagland adicionada de fosfato insolúvel ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$). No gráfico, as barras em cinza resumem os valores de peso fresco da parte aérea de plantas de *A. thaliana* cultivadas em uma curva decrescente de fosfato insolúvel, em que T1 representa 100% e T6 representa 0% de fosfato insolúvel adicionado à solução de Hoagland. As barras verticais indicam o desvio padrão da média, sendo que as médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O experimento foi realizado com cinco repetições.

5.5. Ensaios de solubilização de fosfato por bactérias durante interação com plantas de *A. thaliana*

Após a definição das concentrações de fosfato a serem utilizadas nos ensaios de solubilização (T1: 100% de fosfato insolúvel e T6: 100% de fosfato solúvel), três isolados bacterianos foram selecionados para tais testes com base

nos resultados fornecidos pelos testes em meio sólido. São eles: Isolado 3 (UENF 112922), isolado 4 (UENF 122921) e isolado 8 (UENF 113922) (Tabela 12). A bactéria *G. diazotrophicus* foi utilizada como referência para os ensaios, pois sua habilidade de solubilização de fosfato (*in vitro*) já foi amplamente caracterizada.

A análise da influência dos isolados bacterianos na solubilização de fosfato e na promoção do crescimento de *A. thaliana* durante a interação planta/bactéria foi avaliada. Foram avaliadas duas condições de inoculação, tendo sido comparadas suspensões bacterianas em bactérias em água destilada e em solução de Hoagland. Para tanto, plantas foram cultivadas na presença das diferentes fontes de fosfato, solúvel e insolúvel, acrescidas semanalmente das suspensões das bactérias testadas. Como controle, foram utilizadas plantas que não receberam inoculação de bactéria. Após 35 dias, as plantas foram coletadas e tiveram o peso seco de suas partes aéreas analisado. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, e a comparação entre médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em um primeiro ensaio, plantas de *A. thaliana* cultivadas na presença de fosfato insolúvel foram inoculadas. Em tal ensaio, as bactérias utilizadas para inoculação foram previamente suspensas em água. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 13. Foi possível observar que a bactéria *G. diazotrophicus* forneceu promoção do crescimento às plantas, que atingiram valores de peso seco de parte aérea 9 vezes superior ao controle. Interessantemente, a inoculação bacteriana em solução de Hoagland não forneceu promoção do crescimento das plantas, revelando a influência do veículo de inoculação no processo (Figura 14).

No intuito de avaliar a habilidade das bactérias em promover o crescimento das plantas em condições não restritivas de fosfato solúvel, plantas foram cultivadas com solução convencional de Hoagland (100% de fosfato solúvel) e inoculadas semanalmente com suspensões bacterianas. No ensaio apresentado na Figura 15, as plantas foram inoculadas com bactérias ressuspensas em água. Os resultados revelaram que as bactérias *G. diazotrophicus*, UENF 112922 (*Bacillus* sp.) e UENF 113922 (*Burkholderia* sp.) promoveram o crescimento das plantas em comparação com o tratamento controle. Quando as bactérias foram suspensas em solução de Hoagland, Figura 16, também foi observada

promoção do crescimento das plantas em resposta à inoculação por *G. diazotrophicus* e UENF 112922 (*Bacillus* sp.).

A Figura 17 ilustra a promoção do crescimento observada para plantas cultivadas na presença de fosfato solúvel ou insolúvel, quando inoculadas com as diferentes bactérias ressuspensas em dois veículos distintos, água e solução de Hoagland. As imagens confirmam o conjunto de dados descritos nos gráficos das Figuras 13, 14, 15 e 16.

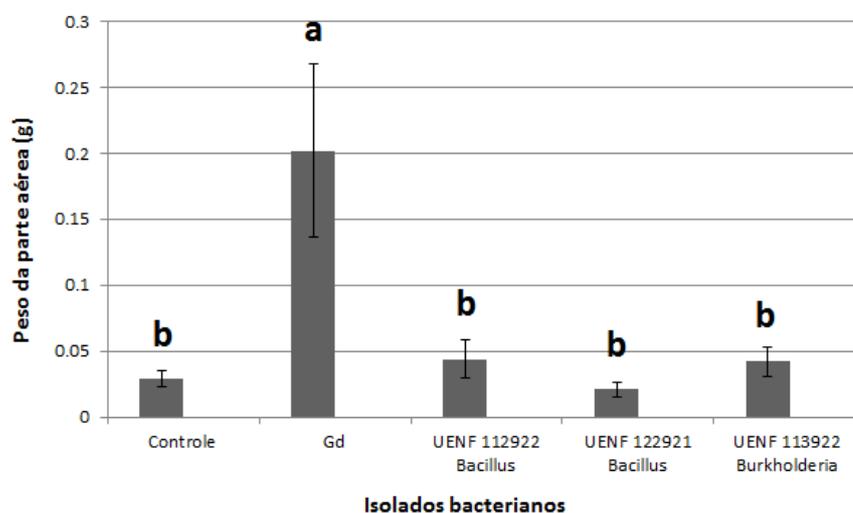


Figura 13: Avaliação da matéria fresca da parte aérea sobre o efeito da inoculação bacteriana em água durante o tratamento fosfato insolúvel em plantas de *A. thaliana*. O experimento foi realizado com cinco repetições. As barras verticais indicam o desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

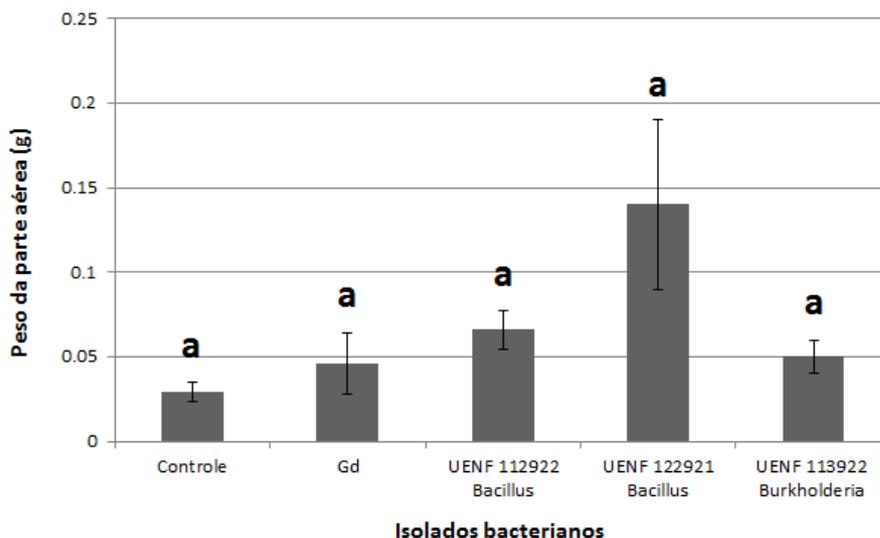


Figura 14: Avaliação da matéria fresca da parte aérea sobre o efeito da inoculação bacteriana em solução de Hoagland durante o tratamento fosfato insolúvel em plantas de *A. thaliana*. O experimento foi realizado com cinco repetições. As barras verticais indicam o desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

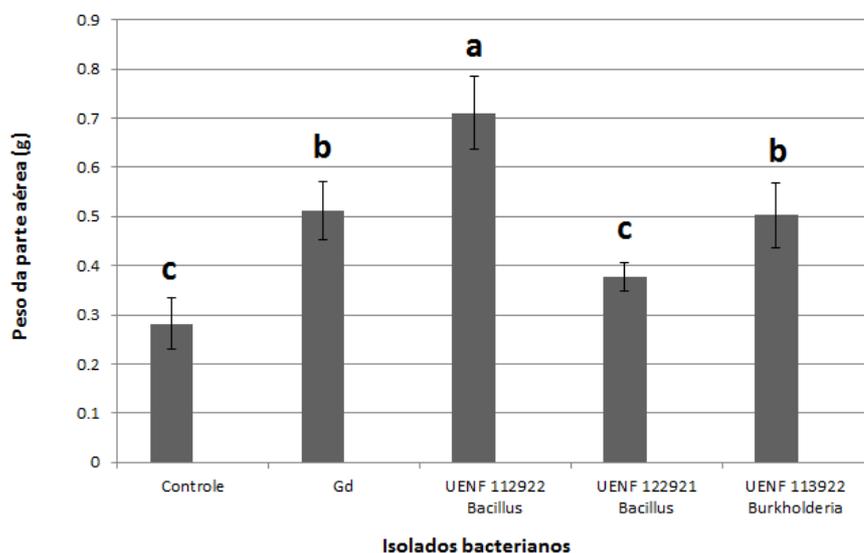


Figura 15: Avaliação da matéria fresca da parte aérea sobre o efeito da inoculação bacteriana em água durante o tratamento com fosfato solúvel em plantas de *A. thaliana*. O experimento foi realizado com cinco repetições. As barras verticais indicam o desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

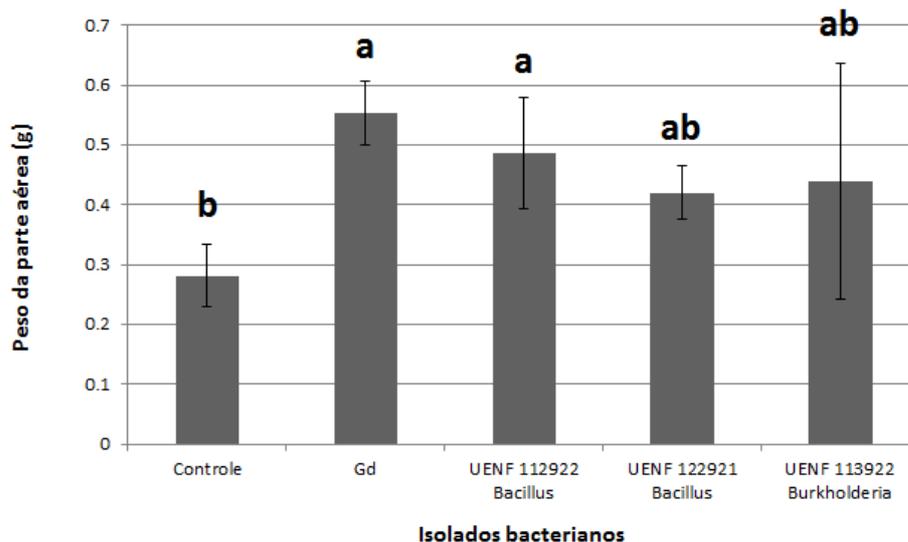


Figura 16: Avaliação da matéria fresca da parte aérea sobre o efeito da inoculação bacteriana em solução de Hoagland durante o tratamento com fosfato solúvel em plantas de *A. thaliana*. O experimento foi realizado com cinco repetições. As barras verticais indicam o desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

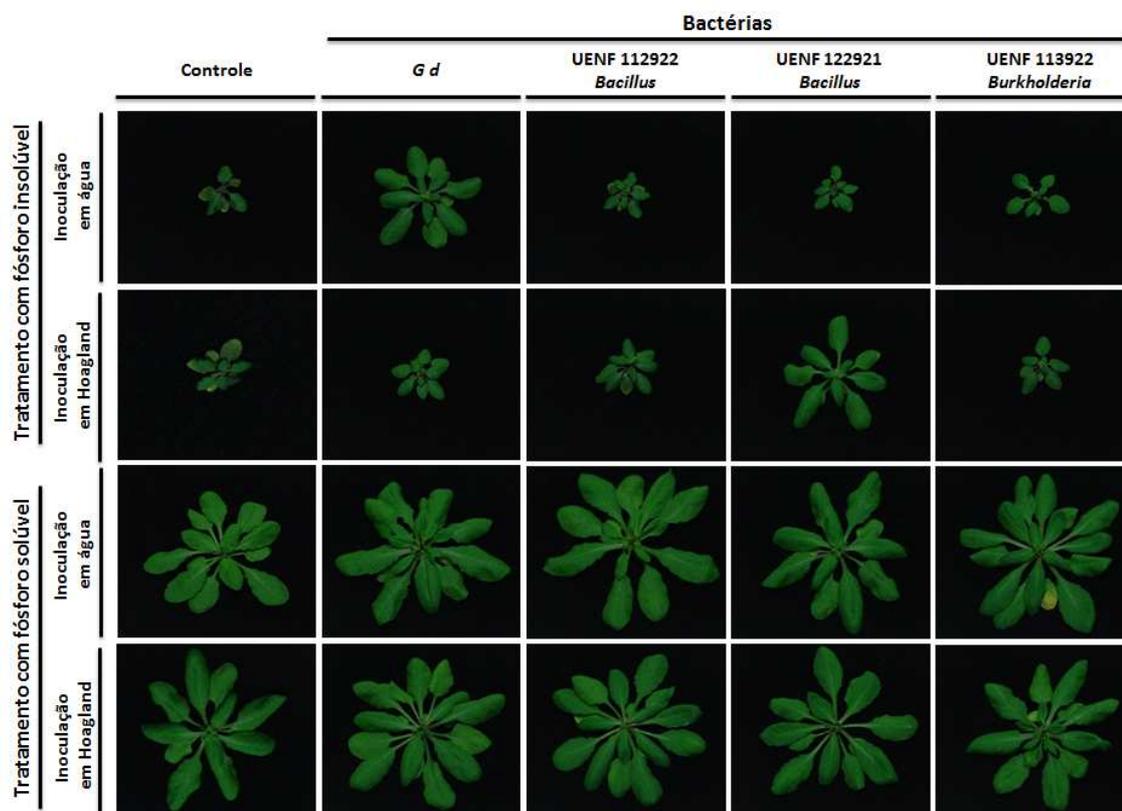


Figura 17: Avaliação da solubilização de fosfato por bactérias durante a interação com planta de *A. thaliana*. A parte horizontal da Figura 16 refere-se aos tratamentos utilizados e à forma de inoculação e a parte vertical, aos controles sem bactérias e aos isolados bacterianos inoculados.

6. DISCUSSÃO

6.1. Avaliação da solubilização de fosfato por isolados bacterianos de abacaxi e caracterização molecular

O uso de compostos fosfatados como fertilizantes químicos contendo grandes quantidades de fósforo solúvel tem sido aplicado à prática agrícola a fim de atender as necessidades das plantas e maximizar a produção (RAVIKUMAR *et al.*, 2010 a, b). No entanto, este fósforo solúvel é rapidamente imobilizado após a sua aplicação, assumindo formas insolúveis pela reação com Al^{3+} e Fe^{3+} em solo ácido e com Ca^{2+} em solos calcários (CHANG E YANG 2009; SAPSIRISOPA *et al.*, 2009).

Uma estratégia viável para a agricultura sustentável é a utilização de bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP), já que a extração de P não se dá a partir de fontes renováveis. Assim, o uso de bioinoculantes é uma alternativa interessante para recuperação do P acumulado nos solos. Pesquisadores têm tentado estabelecer métodos de triagem para o isolamento destas bactérias do solo e critérios específicos de avaliação para a aplicação sob diversas condições ambientais (MORRISSEY *et al.*, 2004).

Neste trabalho, foi feita a seleção de oito bactérias de abacaxi capazes de solubilizar fosfato insolúvel dos compostos $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, em vista de serem os sais destes compostos mais facilmente degradados por microrganismos (Rodríguez e Fraga, 1999). Em geral, esta habilidade é mediada pela produção de ácidos orgânicos, que reduzem o pH do ambiente externo,

solubilizando os cristais do composto insolúvel presente no meio de cultivo, gerando um halo em torno da colônia (DAS, 1989), conforme ilustrado na Figura 3. Os ácidos orgânicos produzidos pela bactéria quelam os cátions, principalmente Ca^{2+} , ligados ao fosfato, por meio dos seus grupos carboxílicos, convertendo-os em formas solúveis (KPOMBLEKOU E TABATABAI, 1994). Como exemplo destes ácidos, podemos citar o ácido butírico, ácido cítrico, ácido glucônico, entre outros (KIM et al., 1998; VASSILEVA *et al.*, 2001; PRADHAN E SUKLA, 2005).

Entre os isolados bacterianos testados no presente trabalho, os que apresentaram resultado positivo para solubilização de fosfato foram provenientes das raízes - endofíticos e epifíticos - e da rizosfera. Isto condiz com a literatura atual, pois a solubilização de P na rizosfera é indicada como a ação mais comumente encontrada em rizobactérias promotoras do crescimento vegetal, que aumentam a disponibilidade de nutrientes para as plantas hospedeiras (RICHARDSON, 2001).

Os isolados bacterianos apresentaram um maior crescimento de colônia em meio Basal independentemente do composto de P utilizado. Provavelmente, este fato esteja associado à fonte de nitrogênio utilizada no meio, já que LGIm é um meio isento deste composto. Foi possível observar que, além do crescimento bacteriano, o meio Basal possibilitou detectar diferenças quanto à coloração e morfologia das colônias. Tseng e Leng (2012) mostraram que os componentes do meio podem desempenhar um papel no processo de lipidação, pois a fonte de nitrogênio inorgânico influencia a expressão de lipoproteínas. Os resultados também mostram que o aumento dos níveis de lipoproteínas imaturas é resultante do aumento de fosfato no meio. Essas lipoproteínas são necessárias para manter a integridade da célula. Tais alterações podem justificar as variações observadas para a morfologia das colônias de bactérias cultivadas no meio basal.

Um aspecto observado nos ensaios de solubilização foi que o composto $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ permite uma melhor visualização do halo de solubilização, dando ao meio um aspecto opaco. Porém a eficiência de solubilização de P pelas bactérias é menos eficiente para este composto quando comparado com o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. É descrito pela literatura que, de forma geral, as biocerâmicas de fosfato de cálcio são degradadas com a seguinte ordem de velocidade: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, (KAWACHI et al., 2000; ALBUQUERQUE, 2004).

Entre os isolados bacterianos, foram identificados os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* e *Burkholderia*, Tabela 12, tendo o gênero *Bacillus* correspondido a 50% dos isolados caracterizados. Esses resultados estão de acordo com Hallmann (1997), que cita este gênero como o principal para bactérias endofíticas de determinadas plantas. Os gêneros encontrados já foram descritos na literatura quanto à característica de solubilização de P, entretanto, em abacaxi, tal habilidade ainda não havia sido caracterizada para estes microrganismos.

Naz e Bano (2010) demonstraram que um isolado de *Pseudomonas* pode ser utilizado como bioinoculante na proteção contra o estresse salino em milho, atuando como promotor do crescimento pela absorção de P para a planta.

Várias características para a promoção do crescimento vegetal são atribuídas à *Enterobacter cancerogenus* através dos estudos realizados por Jha e colaboradores (2012). Entre elas, a solubilização de fosfato e a capacidade de produzir AIA e sideróforo. Estas características permitiram analisar o efeito da inoculação desta bactéria na planta, que revelou aumento do comprimento das raízes e da massa seca radicular de *Jatropha curvas*.

Embora cepas de *Burkholderia* sejam relatadas na literatura quanto à capacidade de solubilizar P, essa capacidade foi demonstrada pela primeira vez em diversas condições como alta concentração de sal, pH extremo e baixa temperatura para *Burkholderia vietnamiensis*. Em tal trabalho, realizado por Park e colaboradores (2010), tal bactéria foi sugerida como um ótimo bioinoculante, não somente pela característica de solubilizar P, mas sobretudo pela sua capacidade de se adaptar bem sob diversas condições de estresse.

6.2. Avaliação da condição ideal de substrato inerte para cultivo de *Arabidopsis thaliana*

Durante os ensaios de padronização das condições ideais para o cultivo de *A. thaliana*, um dos parâmetros pesquisados foi o tipo e a concentração ideais de substrato. Após testar substratos como vermiculita e areia e testar diferentes proporções da mistura desses substratos, chegamos à proporção ideal de 4:1 vermiculita/areia. Em contrapartida, a adição de areia à vermiculita tende a atenuar o efeito de encharcamento.

A proporção 4:1 vermiculita/areia forneceu melhor eficiência quanto à taxa de germinação, Figura 9, e aumento no peso fresco da parte aérea das plantas *A. thaliana* (Figura 10). Um dos fatores que podem ter contribuído para a eficiência dessa mistura de substratos pode ter sido a aeração, visto ser uma característica física de grande importância para o crescimento de plantas em recipientes (BEARDSELL *et al.*, 1979). Sabendo que não apenas a água é necessária para o desenvolvimento das plantas, mas também o ar desempenha um papel importante para o crescimento radicular (VERDONCK, *et al.*, 1981), podemos conjecturar que uma parte de areia e quatro de vermiculita proporcionaram uma mistura de proporções adequadas para o desenvolvimento das plantas de *A. thaliana*, justificando a utilização desse substrato para os ensaios posteriores.

6.3. Avaliação da concentração limitante de fósforo solúvel na solução nutritiva para o desenvolvimento de plantas *A. thaliana*

Sendo o P um dos principais macronutrientes essenciais necessários para o desenvolvimento das plantas (ILLMER e SCHINNER, 1992), foram testadas várias concentrações de fosfato solúvel e insolúvel em solução de Hoagland, para verificar o seu efeito sobre o desenvolvimento de plantas de *A. thaliana*. Foi observado que, em resposta à deficiência de fósforo solúvel, as plantas de *A. thaliana* apresentaram redução no tamanho das folhas, aspecto clorótico e coloração arroxeadada (Figura 12A). Esses dados estão de acordo com trabalhos realizados por Nilsson e colaboradores (2012), que demonstraram que plantas de *A. thaliana* têm sua atividade fotossintética comprometida durante a falta de P, confirmando nossos dados, que mostram clorose nas extremidades das folhas destas plantas. Adicionalmente, esses autores verificaram que o fator de transcrição PHR1 é um elemento central na adaptação das plantas à deficiência por P. O fator de transcrição PHR1 contribui para o equilíbrio metabólico, a manutenção dos níveis de Pi e para a produção de antocianinas nas folhas. Sugere-se que a produção de antocianinas vise a proteger as folhas da fotoinibição por absorção da luz e potencialmente também pelo efeito antioxidante. Aumento na produção de antocianinas produz uma coloração arroxeadada em folhas de plantas sob estresse. Trabalhos realizados por Zhang e colaboradores (2012) mostraram que o acúmulo de antocianina pode desempenhar função antioxidante, contribuindo para extinguir o efeito de ROS

produzido no fotossistema I e II sob estresses ambientais. Neste contexto, nossos dados mostram uma coloração arroxeada nas plantas de *A. thaliana* sob estresse por privação de P, estando de acordo com os resultados descritos por Zhang e colaboradores (2012) e Nilsson e colaboradores (2012), permitindo inferir que a coloração observada pode ser atribuída ao acúmulo de antocianina em resposta ao estresse.

Após avaliar a influência das diferentes concentrações de fósforo insolúvel para o desenvolvimento das plantas de *A. thaliana*, foi possível escolher os tratamentos com 100% de fósforo insolúvel e com 100% fósforo solúvel (T1 e T6), para os ensaios de inoculação em plantas.

6.4. Avaliação da solubilização de fosfato por isolados bacterianos de abacaxi durante interação com plantas de *A. thaliana*

A associação entre bactérias solubilizadoras de fosfato (BSP) e as raízes das plantas desempenha um papel chave na conversão e utilização de P em muitos agroecossistemas, particularmente, em solos com deficiência em P (JORQUERA *et al.*, 2008). Nossos ensaios avaliaram o efeito de três isolados bacterianos de abacaxi, mais a bactéria *G. diazotrophicus*, quanto à capacidade de promover crescimento vegetal na presença de fontes solúveis e insolúveis de fosfato inorgânico (Pi), durante sua interação com plantas de *A. thaliana*.

Nossos resultados revelaram promoção do crescimento apenas para a bactéria *G. diazotrophicus*, quando a inoculação das bactérias utilizou água como veículo, durante o tratamento com fósforo insolúvel (Figura 13). Porém, a bactéria *G. diazotrophicus* também mostrou promoção do crescimento no tratamento com fósforo solúvel em inoculações em água e em solução de Hoagland. Sendo assim, não podemos afirmar ao certo qual o fator responsável pela promoção do crescimento vegetal. *G. diazotrophicus* apresenta uma série de características de promoção do crescimento vegetal, como a capacidade de produzir hormônios vegetais (auxina e giberelina), a fixação biológica de nitrogênio, a produção de sideróforos, além da capacidade de solubilizar fosfatos minerais e outros nutrientes (DE FREITAS *et al.*, 1997; KENNEDY *et al.*, 1997).

A bactéria UENF 112922 (*Bacillus* sp), quando inoculada em água, durante o tratamento com fósforo solúvel, promoveu aumento do peso fresco da parte aérea de *A. thaliana* em aproximadamente 60%. O mesmo resultado foi obtido

quando a tal bactéria foi inoculada com solução de Hoagland, porém com menor eficiência.

O aumento do peso fresco da parte aérea de *A. thaliana* também foi demonstrado pela bactéria UENF 113922 (*Burkholderia*), quando inoculada em água e solução de Hoagland, durante o tratamento com fósforo solúvel.

Com a observação desses dados contrastantes, podemos inferir que a forma de inoculação dos diferentes isolados bacterianos pode influenciar sua eficiência na promoção do crescimento vegetal.

Essas bactérias são relatadas em vários estudos com efeito de melhorar o crescimento vegetal e incluídas em um grupo diversificado de rizobactérias, entre as quais podemos encontrar *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus* e *Serratia* (OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994; Glick, 1995;). Essas rizobactérias promotoras de crescimento vegetal habitam as raízes das plantas influenciando em diversos mecanismos, tais como solubilização, aumentando a absorção de nutrientes, produção de reguladores de crescimento, produção de sideróforos, antibióticos e outros compostos (ZAHIR *et al.*, 2003).

Apesar de os dados relativos à solubilização de fosfato e/ou a promoção do crescimento vegetal, resultantes da inoculação com os isolados bacterianos, serem bastante promissores, tais resultados são preliminares. Portanto, merecem ser avaliados em novos ensaios de validação.

7. CONCLUSÕES

- 1- Entre os 21 isolados bacterianos de plantas de abacaxi avaliados, oito bactérias apresentaram capacidade de solubilizar fosfato, sendo duas de origem da rizosfera e seis da raiz, das quais três eram epifíticas e três, endofíticas.
- 2- O composto $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ permitiu melhor visualização do halo de solubilização, tornando o meio Basal e LGl m opaco, porém obteve menor diâmetro do halo de solubilização em ambos os meios.
- 3- O composto $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ permitiu maior diâmetro do halo de solubilização no meio Basal e LGl m, mas pior visualização do halo de solubilização, tornando o meio Basal e LGl m translúcido.
- 4- Por meio da análise molecular da região do gene 16S rDNA, foi possível classificar os isolados em nível de gênero, sendo três do gênero *Bacillus* sp. (UENF 111925, UENF 112922 e UENF 122921), dois do gênero *Burkholderia* sp. (UENF 111923 e UENF 113922), um do gênero *Pseudomonas* sp. (UENF 113821) e um do gênero *Enterobacter* sp. (UENF 123925).
- 5- *Gluconacetobacter diazotrophicus* promoveu crescimento quando

inoculada em água durante o tratamento com fosfato insolúvel em plantas de *A. thaliana*.

- 6- *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Bacillus* sp. (UENF 112922) e *Burkholderia* sp. (UENF 113922) promoveram crescimento quando inoculadas em água, durante o tratamento com fosfato solúvel em plantas de *A. thaliana*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arabidopsis Home 2010. Disponível em <http://www.arabidopsis.org/info/aboutarabidopsis.jsp>. Acesso em: 18/02/11.

ANDREWS, J.H., HARRIS, R.F. The Ecology and Biogeography of Microorganisms of plant surfaces. Annual Reviews of Phytopatology 38:145-180p, 2000.

ANDREOTE, F.D., ROSSETTO, P.B., MENDES, R., AVILA, L.A., LABATE, C.A., ALINE A. PIZZIRANI-KLEINER, A.A., AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. Bacterial community in the rhizosphere and rhizoplane of wild type and transgenic eucalyptus. World J Microbiol Biotechnol 25:1065-1073p, 2009.

ANDREOTE, F.D., A.A., AZEVEDO, J.L., ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants.

ADAMS, M.D. et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287, 5461, 2185-2195. 2000.

BEDDINGTON, J. Food security: contributions from science to a new and greener revolution. Philos. Trans. R. Soc. B 365, 61–71, 2010.

BELIMOV, A.A.; SAFRONA, V.I.; SERGEYEVA, T.A.; EGOROVA, T.N.; MATVEYEVA, V.A.; TSYGANOV, V.E.; BORISOV, A.Y. TIKHONOVICH, I.A.

BLANCO, Y.; BLANCH, M.; PIÑÓN, D.; LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Antagonismof *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *Xanthomonas albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. *J. Biosci. Bioeng*, v. 99. p. 366-371. 2005.

BISWAS, C. et al. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of Lowland rice. *Soil Scientific Society American*, Madison, v. 64, p. 1644-1650, 2000.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant. Growth. Regul.* v. 24. p. 7-11. 1998.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L.; GOE, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 29, p. 911-922, 1997.

BENCHIMOL, R. L.; CHU, E. Y.; YUITIMUTO, R.; DIAS-FILHO, M. B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 7, p. 1343-1348, 2000.

BÖHME L, BÖHME F. Soil microbiological and biochemical properties affected by plant growth and different long-term fertilization. *Europ J Soil Biol* 42:1–12, 2006.

CRUZ, L.M; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER,J.; PEDROSA,F.O. 16S ribossomal characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa sp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Applied and Environmental Microbiology*, v.67, p.2375-2379, 2001.

- CASSÁN, F.D.; LUCANGELI, C.D.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P.N. Azospirillum spp. Metabolize [17,17-2H2] gibberellin A20 to [17,17-2H2] gibberellin A1 in vivo in dy ice mutant seedlings. *Plant Cell Physiology*, v. 42, p. 763-767, 2001.
- CASSÁN, F.D.; BOTTINI, R.; SCHNEIDER, G.; PICCOLI, P. Azospirillum brasilense and Azospirillum lipoferum hydrolyze conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1 in seedlings of rice dwarf mutants 1. *Plant Physiology*, v. 125, p. 2053–2058, 2001.
- CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant & Soil*. v. 108, p. 23-31,1988.
- CHI, F.; SHEN, S.H.; CHENG, H.P.; JING, Y.X.; YANNI, Y.G.; DAZZO, F.B. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microb.* 71 (11), 7271-7278, 2005.
- CRUZ, C .D. Programa Genes: Biometria. Viçosa: Ed. UFV, 382p., 2006.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995.
- DASHTI, N. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean (*Glycine max* L. Merr) under short season conditions. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 200, p. 205-213. 1998.
- EL-KHAWAS, H.; ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of Azospirillum and Klebsiela and their effect on rice roots. *Biology and Fertility of Soils*, Berlim, v.28, p. 377-381. 1999.
- GLICK BR. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can J Microbiol* 41:109–117, 1995.

- GUIMARÃES, E.P.; SANT'ANA, E.P. Sistemáticas de cultivo. In: VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. (Ed). A cultura do arroz no Brasil. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p.17-35. 1999.
- HALLMAN, J.A.; QUADT-HALMANN, W.; MAHAFFEE, F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v.43, p.895-914, 1997.
- HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 16 (10), 463-471p, 2008.
- HARTMANN, A.; LEMANCEAU, P.; PROSSER, J.I. Multitrophic interactions in the rhizosphere. *Rhizosphere microbiology: at the interface of many disciplines and expertises.* FEMS Microbiol. Ecol. 65, 179p, 2008.
- ISHERWOOD, K.F. Mineral Fertilizer Use and the Environment. International Fertilizer Industry Association, United Nations Environment Programme, Paris, 2000.
- KLOPPER, J.W.; ZABLOWICZ, R.M.; TIPPING, B.; LIFSHITZ, R. Plant growth mediated by bacterial rhizosphere colonizers. *The rhizosphere and plant growth.* BARC Symp. v.14, p.315-326,1991.
- KENENDY I. R., et al. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, Amsterdam, v. 36, p. 1229-1244. 2004.
- KLUGE, C.; PREISFELD, A. DIETZ, K.J.; STEPANOK, V.V. Characterisation of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Canadian Journal of Microbiology*, v.47, p.642–652,2001

- LYNCH, J.P. Turner review no. Roots of the second green revolution. *Aust. J. Bot.* 55, 493–512. Taiz, L e Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. 3a edição. Porto Alegre: Artmed. 559p, 2007.
- MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras: Editora UFLA, 626p. 2002.
- MITHOFER, A. Suppression of plant defense in rhizobia–legume symbiosis. *Trends in Plant Science* 7:440 – 444. 2002.
- NEWMAN, D.K., BANFIELD, J.F. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. *Science* 10(296):1071-1077. 2002.
- NCBI. Taxonomia de *Arabidopsis thaliana*. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acessado em: 03/03/2011.
- OMAR SA. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular–arbuscular–mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World J Microbiol Biotechnol* 14:211–218, 1998.
- OKON Y, LABANDERA-GONZALEZ CA. Agronomic applications of azospirillum: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol Biochem* 26:1591–1601, 1994.
- PETRINI O. Fungal endophytic of tree leaves. In: Andrews J. and Hirano SS (eds) *Microbial ecology of leaves*. Springer Verlag, p. 179-197, 1991.
- PERRINE, F. M. et al. Rhizobium plasmids are involved in the inhibition or stimulation of rice growth and development. *Australian Journal of Plant Physiology*, Sidney, v.28, p. 923-937. 2001.

- PRIETO, P.; MERCADO-BLANCO, J. Endophytic colonization of olive roots by the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64 (2), 297-306p, 2008.
- RAO, D.; WEBB, J.S.; KJELLEBERG, S. Microbial colonization and competition on the marine alga *Ulva australis*. *Appl. Environ. Microb.* 72 (8), 5547-5555p, 2006.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.
- RODRIGUEZ H, FRAGA R, GONZALEZ T, BASHAN Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth promoting bacteria. *Plant Soil* 287:15–21, 2006.
- SALVAUDON, L.G.T.; SHYKOFF, J.A. Genetic diversity in natural populations: a fundamental component of plant–microbe interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 135-143p, 2008.
- STURTZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil*, 175:257-263. 1995.
- SOBRAL, J.K. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta. 2003. 108p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003
- SILVEIRA, E.L. Inoculação de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2008.
- SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium

Gluconacetobacter diazotrophicus. *Chemosphere*. v. 66. p. 1794-1798. 2007a.

SANTOS, S.T. Biogeografia de bactérias culturáveis associadas a fruteiras tropicais 2008. 122p. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2008.

SOTO, M.J., FERRERAS, A.D., MENDONZA, D.P., SANJUÁN, J., OLIVARES, J. Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant–bacteria interactions. *Cellular Microbiology*, 381-388p, 2009.

STURZ, A. V., NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied soil Ecology* 15:183-190. 2000.

TROLOVE, S.N.; HEDLEY, M.J.; KIRK, G.J.D.; BOLAN, N.S.; Loganathan, P. Progress in selected areas of rhizosphere research on P acquisition. *Australian Journal of Soil Research*, pp. 471–499, 2003.

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

THOMPSON J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* v.22, 4673-4680, 1994.

THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 8692: 796-815. 2000.

TAIR. The Arabidopsis Information Resource. Disponível em:
<http://www.arabidopsis.org>. 2010.

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

WEBER, O.B.; CORREIA,D.; ROCHA,M.W.; ALVEZ,G.C.; DEOLIVEIRA, E.V.; SÁ,E.G. Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1419-1426, dez. 2003.