

JOÃO ANTONIO CÔRTEZ VIEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE MILHO E SEU POTENCIAL COMO
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL E AGENTES DE CONTROLE
BIOLÓGICO**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

2015

João Antonio Côrtes Vieira

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE MILHO E SEU POTENCIAL COMO
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL E AGENTES DE CONTROLE
BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dra. Vera Lúcia dos Santos
Co-orientadora: Dra. Christiane Abreu de Oliveira Paiva

Belo Horizonte
2015

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, a Deus, por sempre estar ao meu lado, sempre me guiando e amparando, sempre colocando pessoas maravilhosas em meu caminho, por jamais desistir de mim;

Com todo amor e carinho, aos meus pais, minha maior alegria neste mundo, meu maior tesouro de Deus, que sempre acreditaram em mim, sempre fizeram o possível e o impossível para me ajudar a conquistar meus sonhos e a me tornar um homem honrado;

Aos meus irmãos, Valentina e Vinícius, e a todos os meus familiares, em especial, a minha avó Eli, que sempre fez questão de me acompanhar tão de perto;

A minha orientadora, Prof^a Verinha, que desde o princípio me acolheu e tratou tão bem, me dando todo o suporte possível para que eu realizasse meus trabalhos. Obrigado por esse período de grande aprendizado, e por toda a paciência que sempre teve comigo;

A todos os meus amigos do LMA e de BH, que sempre me apoiaram e fizeram eu me sentir melhor mesmo nos momentos mais difíceis, sem falar nas tantas vezes que puseram a mão no batente para me dar uma força em meus trabalhos! Em especial à Natália, minha ex-IC que parecia minha mãe, ao Rafa, meu grande conselheiro desde os tempos de Viçosa, ao Chicão e Fernando, fiéis companheiros de república e baladas, e ao Vitor, que me acompanhou no Mineirão na conquista do bicampeonato Brasileiro do Cruzeiro!

A Dra. Christiane Abreu Oliveira Paiva, pela co-orientação e apoio neste trabalho;

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite para a avaliação deste trabalho e todas as contribuições que certamente serão de grande valia;

A Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela oportunidade de realizar o melhor mestrado em Microbiologia do país;

A todos os professores e funcionários, pela gentileza e aprendizado;

Ao doutorando Frederic Mendes Hughes, pela ajuda de valor imensurável com as análises e discussões dos dados estatísticos deste trabalho;

A Capes e a Fapemig, pela bolsa de estudos e financiamento deste projeto, respectivamente.

SUMÁRIO

RESUMO	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. JUSTIFICATIVA.....	1
2. INTRODUÇÃO	3
2.1. Micro-organismos associados às plantas.....	3
2.2. Ecologia e fisiologia das relações plantas - micro-organismos endofíticos	5
2.3. Potencial dos endofíticos de promover o crescimento e desenvolvimento vegetal.	10
2.4. A cultura do milho.....	19
3. OBJETIVO GERAL	22
3.1. Objetivos específicos	22
4. METODOLOGIA	23
4.1. Material vegetal e delineamento experimental	23
4.2. Extração e isolamento das bactérias endofíticas	24
4.3. Preservação dos micro-organismos isolados	25
4.4. Caracterização das bactérias isoladas	26
4.4.1. Extração de DNA das bactérias endofíticas.....	26
4.4.2. Reações de PCR de regiões do gene rDNA 16S.....	26
4.4.3. Sequenciamento de regiões do rDNA 16S.....	27
4.5. Análise do potencial de produção de fatores de crescimento vegetal.....	28
4.5.1. Padronização dos inóculos	28
4.5.2. Produção de Ácido 3-indol acético (AIA)	28
4.5.3. Capacidade de solubilizar fosfato inorgânico.....	29
4.5.4. Potencial de produção de enzimas fitases	30
4.5.5. Potencial de produção de sideróforos.....	30
4.5.6. Antagonismo contra micro-organismos fitopatogênicos.....	31
4.5.7. Análises estatísticas da densidade de isolados endofíticos e de produção de fatores de crescimento vegetal	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Isolamento das bactérias endofíticas	34
5.2. Identificação molecular das bactérias endofíticas.....	37
5.3. Produção de fatores de crescimento vegetal.....	44
5.3.1. Produção de Ácido 3-indol acético (AIA)	44
5.3.2. Capacidade de solubilizar fosfato inorgânico.....	50

5.3.3. Mineralização de fitato.....	57
5.3.4. Produção de sideróforos	59
5.3.5. Atividade antagonista.....	64
5.3.6. Análise do potencial dos isolados como promotores de crescimento vegetal e agentes de controle biológico.....	69
6. CONCLUSÕES.....	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
APÊNDICE A.....	102
APÊNDICE B.....	103
APÊNDICE C.....	105
APÊNDICE D.....	111
APÊNDICE E.....	118
APÊNDICE F.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIA – Ácido 3-indol acético (auxina);
- BDA – Batata dextrose ágar;
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético;
- Eq. EDTA – Unidades de atividade quelante equivante à de EDTA (em mM);
- ha – hectare;
- ISF – Índice de solubilização de fosfato;
- MLG – Modelo linear generalizado;
- mM – Milimolar;
- MPCP – Micro-organismos promotores de crescimento de plantas;
- MSP – Micro-organismos solubilizadores de fosfato;
- Na-IHP – Ácido dodecassódico inositol-hexafosfórico;
- NBRIP – National Botanical Research Institute;
- P_i – Fósforo inorgânico;
- PMAP – Padrão molecular associado a patógenos;
- pmol – Picomol;
- PR – Proteínas relacionadas à patogênese;
- RSI – Resistência sistêmica induzida;
- SDS –Dodecil sulfato de sódio;
- TE – Tris-EDTA;
- TSA – Ágar tripton de soja (do inglês “triptic soy agar”);
- TSB – Caldo tripton de soja (do inglês “triptic soy broth”);
- UFC – Unidades formadoras de colônias.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Propriedades químicas do solo (0 – 20 cm) das áreas de cultivo (Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas, MG) do milho antes de receberem os tratamentos de adubação fosfatada..... 23
- Tabela 2:** Densidades médias de bactérias endofíticas de milho observadas em cada uma das regiões morfológicas da planta e dos tratamentos avaliados. 34
- Tabela 3:** Resultados da aplicação de Modelos Lineares Generalizados (MLG) com erros gama e funções de ligação identidade para avaliar possíveis associações entre adubação fosfatada e partes da planta de milho (folha, raiz e seiva) na variação de densidade das suas comunidades de bactérias endofíticas associadas. 35
- Tabela 4:** Grupos taxonômicos encontrados entre os isolados identificados pelo sequenciamento de regiões do gene rDNA16S. 42
- Tabela 5:** Resultados da aplicação de Modelos Lineares Generalizados com erros gama e funções de ligação identidade para avaliar possíveis associações entre adubação fosfatada e partes da planta de milho (folha, raiz e seiva) na variação das taxas de produção de AIA pelos isolados endofíticos. 45
- Tabela 6:** Resultados da aplicação de Modelos Lineares Generalizados (GL) com erros gama e funções de ligação identidade para avaliar possíveis associações entre adubação fosfatada e partes da planta de milho (folha, raiz e seiva) sobre as variações das taxas de solubilização de fosfato de cálcio pelos isolados endofíticos. 52
- Tabela 7:** Resultados da aplicação de Modelos Lineares Generalizados (MLG) com erros gama e funções de ligação identidade para avaliar possíveis associações entre adubação fosfatada e partes da planta de milho (folha, raiz e seiva) na variação das taxas de produção de sideróforos pelos isolados endofíticos. 62
- Tabela 8:** Isolados endofíticos que apresentaram atividade antagonista contra os micro-organismos confrontados neste ensaio. Os valores de atividade antibacteriana estão expressos como a razão entre o halo de inibição e o diâmetro da colônia do isolado endofítico. Os valores de atividade anti-fúngica estão expressos

como a distância, em milímetros, entre as bordas das colônias da bactéria endofítica e do fungo confrontado. 68

Tabela 9: Efeito das partes da planta sobre a frequência de isolados promotores de crescimento vegetal. 70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representações esquemáticas desenhadas a partir dos dados de agrupamento pelo método de k-means. Números superiores, em cor destacada, indicam a amplitude da densidade bacteriana (UFC por g ou mL de amostra) em cada agrupamento. Demais números indicam a frequência de densidades encontradas para cada tratamento e parte da planta, por *cluster*. Densidade no Cluster 1 < Cluster 3 < Cluster 2.35
- Figura 2:** Comportamento da variável densidade normalizada via transformação Box-Cox. A) Tratamentos de adubação fosfatada (T – adubação fosfatada; P – sem adubação fosfatada) e B) Partes da planta (F – folhas; R – raízes; S – seiva). A mediana (linha grossa), o erro padrão (caixa cinza) e o desvio padrão (linhas tracejadas) são representados.36
- Figura 3:** a) Identificações proposta para os isolados FP1C-13 e FP1A-37. b) Resultados do BLASTn (banco de dados nr), das sequências de 580 pares de base do gene rDNA 16S do isolado FP1C-13 e do RP1A-37. c) Dendogramas de distância nucleotídica utilizando as sequências dos isolados FP1C-13 e FP1A-37 e as sequências depositadas no GenBank de linhagens de referência filogeneticamente próximas.40
- Figura 4:** Representações *Box-plots* das taxas de produção de ácido indol acético (AIA - µg /mL) e suas repostas aos tratamentos de adubação fosfatada e partes da planta. Tratamentos: T – adubação fosfatada; P – sem adubação fosfatada. Partes da planta: F – folhas; R – raízes; S – seiva. Dados originais transformados por Box-Cox. As linhas grossas representam as medianas, as caixas os erros-padrões e as linhas tracejadas os desvios-padrões.45
- Figura 5:** Valores de produção de AIA pelos isolados endofíticos. Colunas azuis indicam os isolados do *cluster* 1, em vermelho os isolados do *cluster* 2, em verde os isolados do *cluster* 3, barras os desvios-padrões e os pontos azuis indicam os valores de pH. Médias de três repetições.46
- Figura 6:** Representações esquemáticas desenhadas a partir dos dados de agrupamento pelo método de k-means. Números superiores, em cor destacada,

indicam as faixas de produção de AIA ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Demais números indicam a frequência de isolados encontrados para cada tratamento e parte da planta, por *cluster*. Taxas de produção de AIA do *cluster* 1 < *cluster* 3 < *cluster* 2.....47

Figura 7: Valores de solubilização de fosfato e pH no meio NBRIP conferidos pelos isolados endofíticos. Colunas azuis indicam os isolados do *cluster* 1, em vermelho os isolados do *cluster* 3, em verde os isolados do *cluster* 2, barras os desvios-padrões e os pontos azuis indicam os valores de pH. Médias de três repetições.51

Figura 8: Representações esquemáticas desenhadas a partir dos dados de agrupamento pelo método de *k-means*. Números superiores, em cor destacada, indicam as faixas de solubilização de fosfato de cálcio ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Demais números indicam a frequência de isolados encontrados para cada tratamento e parte da planta, por *cluster*. Taxas de produção de AIA do *cluster* 1 < *cluster* 3 < *cluster* 2....52

Figura 9: Comportamento da variável solubilização de fosfato inorgânico normalizada via transformação Box-Cox por A) Tratamentos de adubação fosfatada (T – adubação fosfatada; P – sem adubação fosfatada) e B) Partes da planta (F – folhas; R – raízes; S – seiva). A mediana (linha grossa), o erro padrão (caixa cinza) e o desvio padrão (linhas tracejadas) estão representados.53

Figura 10: Comportamento das variáveis taxas de fosfato solubilizado ($\mu\text{g P}_i/\text{mL}$) e pH (vermelho) via correlação de Spearman. Valores discrepantes são destacados. 55

Figura 11: Relação entre os índices de solubilização de fosfato ($\mu\text{g P}_i/\text{mL}$) e pH das culturas dos isolados endofíticos. As cores dos pontos indicam *clusters k-means* dos isolados agrupados de acordo com as duas variáveis (Apêndice E.6). Cluster 1 (vermelho) – 10 a 49,3 $\mu\text{g P}_i/\text{mL}$; cluster 2 (verde claro) – 85,7 a 224,4 $\mu\text{g P}_i/\text{mL}$; cluster 3 (verde escuro) – 225,2 a 349,4 $\mu\text{g P}_i/\text{mL}$; cluster 4 (azul) – 358,8 a 550,7 $\mu\text{g P}_i/\text{mL}$56

Figura 12: Isolados mineralizadores de fitato evidenciados pela formação de um halo translúcido em torno das colônias.....57

Figura 13: Frequência de gêneros encontrados dos isolados endofíticos mineralizadores de fitato de sódio. Espécies encontradas também são indicadas....59

Figura 14: Valores de produção de sideróforos em meio KB pelos isolados endofíticos. Colunas azuis indicam os isolados do *cluster* 1, em vermelho os isolados do *cluster* 2, em verde os isolados do *cluster* 3, barras os desvios-padrões e os pontos azuis indicam os valores de pH. Médias de três repetições..... 61

Figura 15: Representações esquemáticas desenhadas a partir dos dados de *clustering* pelo método de *k-means*. Números superiores, em cor destacada, indicam as faixas de produção de sideróforos (Eq. EDTA). Demais números indicam a frequência de isolados encontrados para cada tratamento e parte da planta, por *cluster*. Taxas de produção do *cluster* 1 < *cluster* 3 < *cluster* 2..... 61

Figura 16: Representações *Box-plots* das taxas de produção de sideróforos (u. EDTA) e suas repostas aos tratamentos de adubação fosfatada e partes da planta. A) Tratamentos: T – adubação fosfatada; P – sem adubação fosfatada. B) Partes da planta: F – folhas; R – raízes; S – seiva. Dados originais transformados por Box-Cox. As linhas grossas representam as medianas, as caixas os erros-padrões e as linhas tracejadas os desvios-padrões..... 62

Figura 17: A) Halo de inibição do isolado FP1A-13 contra a bactéria teste *Bacillus subtilis*. B) Halo de inibição do isolado *Staphylococcus warneri* FT3C-14 contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum graminicola*..... 65

Figura 18: Diagrama de Venn mostrando as diferentes combinações de atividades antagonistas dos isolados contra os micro-organismos testes confrontados. 66

RESUMO

Muitos micro-organismos endofíticos têm sido descritos por apresentarem promissores potenciais de aplicação biotecnológica, incluindo a capacidade de promoverem o crescimento de plantas, como o milho. Este trabalho teve como objetivos isolar bactérias endofíticas associadas às folhas, seiva e raízes do cultivar híbrido de milho Pioneer 30F35 Herculex, cultivado com e sem adubação fosfatada, e analisar sua capacidade de produzir fatores promotores de crescimento vegetal. Um total de 178 bactérias foram isoladas e identificadas pelo sequenciamento parcial do gene rDNA 16S. Cerca de 70% dos isolados foram classificados como gram-positivos, sendo que a proporção deste grupo foi maior entre os isolados de seiva (82%), seguido por folhas (76%) e raízes (57%). Houve uma distribuição equivalente de isolados pertencentes aos clados Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria, e apenas um isolado (*Flavobacterium acidificum* RT3B-41) do filo Bacteroidetes foi encontrado. Os principais gêneros encontrados foram *Microbacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Enterobacter* e *Curtobacterium*. *In vitro*, 81% dos isolados apresentaram pelo menos um atributo potencialmente promotor de crescimento vegetal, sendo que 57% dos isolados apresentaram a capacidade de produzir moléculas do tipo auxina, 31% foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico, 42% de mineralizar fitato, 15% de antagonizar bactérias e fungos fitopatogênicos, e 43% dos isolados de seiva e folhas foram capazes de produzir sideróforos. As densidades bacterianas também foram computadas e variaram com a parte da planta analisada (folha, seiva e raiz), o que não aconteceu em relação aos tratamentos de adubação fosfatada. Porém, tanto as partes das plantas quanto os tratamentos de adubação apresentaram efeito significativo sobre a frequência de isolados produtores de fatores de crescimento vegetal, assim como sobre suas taxas de produção ou atividade. Estes resultados permitirão em trabalhos futuros considerar o uso destes isolados como bioinoculantes promotores de crescimento no momento de plantio do milho e como agentes de controle biológico, visando o aumento de produtividade desta cultura.

Palavras-chave: bactérias; endofíticos; milho; auxina; solubilização e mineralização de fósforo; sideróforos; antagonismo; bioprospecção.

ABSTRACT

Many endophytic microorganisms have been reported to exhibit potential biotechnological applications, including the promotion of maize growth. This work aimed to isolate endophytic bacteria associated to leaves, sap and roots of Pioneer 30F35 Herculex hybrid corn crops, cultivated with and without phosphorus fertilization, and to analyze their ability of producing plant growth promoting factors. A total of 178 bacteria were isolated and identified by partial sequencing of the 16S rDNA gene. About 70% of the isolates were classified as Gram-positive, and the proportion of this group was higher among sap isolates (82%), followed by leaves (76%) and roots (57%) isolates. There was an equal distribution of the isolates from Actinobacteria, Firmicutes and Proteobacteria clades, and only one isolate (*Flavobacterium acidificum* RT3B-41) of Bacteroidetes phylum was found. The main genera found were *Microbacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Lactococcus*, *Enterobacter* and *Curtobacterium*. It was found that 81% of the isolates showed at least one potential plant growth promoter attribute *in vitro*. 57% of the isolates had the ability to produce auxin-like molecules, 31% were able to solubilize inorganic phosphate, 42% to mineralize phytate, 15% to antagonize pathogenic fungi and bacteria, and 43% of the sap and leaves isolates were able to produce siderophores. Bacterial densities were also computed and varied for each part of the plant (sap, leaves and roots), what have not happened regarding phosphorus fertilization treatments. However, both parts of the plant and fertilizer treatments had significant effect on the frequency of individuals able to produce plant growth factors as well as on the production or activity rates. These results open doors for investigations on using these isolates as growth promoters bioinoculants at the time of planting corn and as biological control agents, in order to increase the productivity of this crop species.

Keywords: bacteria; endophytes; corn; auxin; phosphorus solubilization and mineralization, siderophores; antagonism; bioprospecting.

1. JUSTIFICATIVA

Micro-organismos endofíticos englobam as bactérias e fungos capazes de colonizar os tecidos internos das plantas, mas que, ao contrário dos organismos patogênicos, não causam prejuízos aos seus hospedeiros (NETO et al., 2003). Pelo contrário, diversos trabalhos têm relacionado as associações de micro-organismos endofíticos a atividades benéficas às plantas, incluindo seu potencial de promover o crescimento vegetal e de atuar contra a atividade de organismos fitopatógenos (CARVALHO et al., 2012; MONTAÑES et al., 2012; FÁVARO et al., 2012; YOUNG et al., 2013; RADZKI et al., 2013).

A presença de micro-organismos endofíticos associados a diversos cultivares de interesse agrônomo, incluindo soja (LEITE et al., 2013), café (SANTAMARÍA & BAHYMAN, 2005), cana-de-açúcar (FÁVARO et al., 2013), arroz (SESSITSCH et al., 2012) e milho (MONTAÑES et al., 2012) já foi descrita. Tradicionalmente, a produção dessas e outras culturas agrônomicas são atreladas à utilização de fertilizantes e pesticidas químicos, que invariavelmente tendem a causar danos ao meio ambiente e risco à saúde humana (WHITE & BROWN, 2010). Na busca por métodos alternativos de se alcançar maiores índices de produtividade agrícola, uma das possibilidades que têm ganhado destaque é a manipulação da microbiota associada às plantas, contexto no qual os micro-organismos endofíticos apresentam perspectivas promissoras. Este interesse está relacionado com os resultados de diversos trabalhos observando o potencial de micro-organismos que crescem associados às plantas de promoverem o crescimento do vegetal, por exemplo, pela produção de fatores de crescimento, mobilização de nutrientes para as plantas e antagonismo contra fitopatógenos (FÁVARO et al., 2012; YOUNG et al., 2013; RADZKI et al., 2013; FARIA et al., 2013).

No presente trabalho, pretendeu-se isolar, caracterizar e analisar o potencial de produção de fatores de crescimento vegetal e antagonismo das bactérias endofíticas associadas à cultura do milho, cereal do qual atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas dos Estados Unidos e China (FAOSTAT, 2012). As bactérias foram isoladas das folhas, seiva e raízes do cultivar híbrido Pioneer 30F35 Herculex, e as densidades obtidas analisadas em relação ao efeito de cada parte da planta e de dois tratamentos, presença e ausência de

adubação fosfatada. Dentre os potenciais de promover o crescimento de plantas, analisou-se a capacidade dos isolados de produzirem o fitohormônio de crescimento ácido-3 indol acético (AIA), as capacidades de solubilizar e mineralizar fosfato, de produzir sideróforos e de apresentar atividade antagonista contra fungos e bactérias fitopatogênicas. Estes resultados permitirão considerar a possibilidade futura de utilizar estes micro-organismos como bioinoculantes em culturas como o próprio milho, visando aumentar sua produtividade e/ou utilizá-los como agentes de controle biológico contra fitopatógenos.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Micro-organismos associados às plantas

As plantas podem ser consideradas como complexos seres subdivididos em diversos micro-habitats, colonizados por uma enorme variedade de micro-organismos. Diversas associações ecológicas podem ser observadas entre estes dois componentes, incluindo relações benéficas às plantas. Estudos já demonstraram como as plantas são capazes de eliciar sua colonização por micro-organismos específicos, promovendo essas associações benéficas (BAIS et al., 2006).

A principal fonte de bactérias capazes de crescer associadas às plantas é o solo (HARDOIM et al., 2011). As plantas exsudam uma variedade enorme de compostos químicos em sua rizosfera, a região do solo em íntimo contato com as raízes, sendo que muitos destes compostos atuam na comunicação inicial entre as plantas e micro-organismos do solo, durante o estabelecimento da colonização microbiana. Estes compostos são usualmente divididos em duas classes: os compostos de baixo peso molecular, como aminoácidos, ácidos orgânicos, compostos sacarídicos e metabólitos secundários, que correspondem a maior diversidade desses exsudados, e compostos de alto peso molecular, como mucilagens, que embora menos diversos, frequentemente representam uma grande fração do volume total destes exsudados (BAIS et al., 2006).

A exsudação desses compostos tem, dentre outras funções putativas, eliminar excretas metabólicas e promover o crescimento vegetal, por exemplo, lubrificando a superfície das raízes ou auxiliando na aquisição de nutrientes (BAIS et al., 2004). Além disso, diversos outros importantes papéis fisiológicos também já foram observados, como o de atividade antimicrobiana do ácido rosmarínico, envolvido na resposta imune de plantas como o manjeriço (*Ocimum basilicum*) contra fitopatógenos do solo (BAIS et al., 2002).

Pouco ainda se sabe sobre como se dão essas complexas interações entre as plantas e os micro-organismos rizosféricos, através dos sinais químicos exsudados pelas raízes. O mesmo sinal químico pode eliciar respostas distintas de inquilinos particulares dessa rizosfera, por exemplo, atraindo determinado organismo ao passo em que repele outro, ou dois organismos distintos podem ser atraídos por

determinado sinal, porém desencadeando respostas com consequências totalmente opostas (BAIS et al., 2006). Um exemplo dessas interações tão diversas mediadas por sinais químicos, e que demonstra o quão importante elas são, é a secreção de isoflavonoides por raízes de soja (*Glycine max*), que tanto servem para atrair a rizobactéria mutualista *Bradyrhizobium japonicum* quanto podem atrair o fitopatógeno *Phytophthora sojae* (MORRIS et al., 1998).

O “efeito rizosfera”, primeiramente descrito por Hiltner (1904, apud. BAIS et al., 2006), assume que o número e atividade dos micro-organismos do solo aumentam sistematicamente em proximidade com as raízes das plantas, atraídos pelos exsudados liberados e acumulados nessa região. Dentre essa microbiota, existe uma parcela de organismos que se limita a colonizar o rizoplane (a superfície das raízes), e outra parcela que é capaz de colonizar os tecidos internos das raízes (endorriza) e outros órgãos da planta (endosfera), incluindo micro-organismos simbiotes, patogênicos e endofíticos (HARDOIM et al., 2008; REINHOLD-HUREL & HUREK, 2011).

Os micro-organismos colonizadores do rizoplane das raízes, juntamente com os micro-organismos capazes de colonizar a superfície das partes aéreas das plantas (filoplane), são denominados epifíticos. Os micro-organismos simbiotes, colonizadores dos tecidos internos das plantas, tais como as rizobactérias de leguminosas (Fabaceae) e os fungos micorrízicos arbusculares, tem em comum o fato do desenvolvimento ser intracelular, envolvido por uma membrana celular do hospedeiro, em um ambiente protegido e onde é possível haver trocas de nutrientes entre os simbiotes (REINHOLD-HUREL & HUREK, 2011). Em outro extremo, estão as interações patogênicas, em que o fitopatógeno, para explorar os recursos da planta em benefício apenas de seu próprio crescimento, pode inclusive utilizar de mecanismos análogos aos explorados por micro-organismos não patogênicos para burlar as defesas das plantas, como a modulação da produção de fitohormônios envolvidos com as defesas imune das plantas, de modo a evitar seu reconhecimento (DENANCÉ et al., 2013). E também existem os micro-organismos endofíticos, termo historicamente utilizado para descrever os micro-organismos capazes de colonizar o interior da planta de forma assintomática e que, ao contrário dos endosimbiotes, não residem dentro das células vegetais envolvidos por uma membrana (REINHOLD-HUREL & HUREK, 2011; HARDOIM, 2011). Além disso, os micro-

organismos endofíticos não apresentam crescimento se estendendo para fora da planta, como as micorrizas, e nem promovem a formação de estruturas anômalas nas plantas, como os nódulos das rizobactérias nas raízes de leguminosas.

Além do solo, os micro-organismos endofíticos também podem ser transmitidos pela atmosfera, por vetores, como insetos, e de forma vertical, através de propágulos, como sementes, rizomas, estacas, etc. (HARDOIM, 2011). Estas fontes têm papel mais relevante principalmente sobre a microbiota associada aos caules e folhas das plantas, tanto a epifítica quanto a endofítica. Porém, também já foi observado que algumas bactérias do solo e colonizadores da endorriza conseguem acessar o sistema vascular das plantas e se dispersar para seus órgãos aéreos por meio dos vasos do xilema (COMPANT et al., 2008).

2.2. Ecologia e fisiologia das relações plantas - micro-organismos endofíticos

Em termos práticos, geralmente todo micro-organismo que pode ser isolado de um tecido vegetal desinfectado superficialmente é considerado um endofítico, o que não exclui a possibilidade de micro-organismos conhecidamente residentes da rizosfera ou epifíticos serem isolados desta forma, visto que muitas vezes a fonte de contaminação pelos endofíticos é justamente esse ambiente (HARDOIM et al., 2008). Há inclusive autores que classificam os endofíticos entre obrigatórios, cujo crescimento e desenvolvimento dependem intrinsecamente da planta hospedeira, com a transmissão se dando verticalmente ou por vetores, e os endofíticos facultativos, que apresentam um ciclo de vida difásico, alternando entre a condição endofítica e de vida livre (HARDOIM et al., 2008).

Estudos como o de Hardoim (2011), mostrando por análises multivariadas que metagenomas de comunidades ambientais, tais como solo e ambientes dulcícolas, são distintas da microbiota endofítica do arroz (*Oryza sativa*), bem como o trabalho de Santamaría e Bayman (2005), destacando que a microbiota foliar epifítica do café (*Coffea arabica*) se mostrou distinta de sua microbiota endofítica, sugerem que embora o solo seja uma grande fonte de micro-organismos endofíticos, e que as comunidades epifíticas e endofíticas estejam separadas por apenas alguns micrometros em uma folha, as plantas apresentam mecanismos fisiológicos que

favorecem a colonização e determinam os nichos de diferentes membros desta comunidade.

Muitas vezes os micro-organismos isolados do interior de tecidos vegetais saudáveis são de espécies conhecidamente saprofíticas ou fitopatogênicas (ARAÚJO et al., 2002; SANTAMARÍA & BAYMANN, 2005; LEITE et al., 2013). Na verdade, a distinção entre os micro-organismos endofíticos, patogênicos e oportunistas é meramente didática, visto que suas relações com as plantas hospedeiras dependem de uma série de fatores, tais como o estágio de desenvolvimento da planta e sua condição fisiológica (SESSITSCH, et al., 2002; SOBRAL, 2003; VAN OVERBEEK et al., 2008), e condições ambientais, como pH e umidade (SANTAMARÍA & BAYMAN, 2005; ADEJUMO & ODOLE, 2010). Desse modo, a distância entre uma condição endofítica e outra patogênica pode acabar se tornando muito curta (PEIXOTO-NETO et al., 2002). Além disso, tem sido sugerido que micro-organismos fitopatogênicos tenham adquirido o caráter endofítico ao perderem genes de virulência, evitando o reconhecimento e ativação do sistema imune das plantas (INIGUEZ et al., 2005; JONES & DANGL, 2006). Estudos metagenômicos também têm corroborado que os endofíticos se diferem de fitopatógenos microbianos quanto ao seu arsenal de interação com as plantas. Sessitsch e colaboradores (2012), por exemplo, observaram no metagenoma de bactérias endofíticas do arroz que todos os sistemas de secreção para translocação de moléculas para o citoplasma de outras células estavam presentes, à exceção do sistema do tipo III (T3SS), comumente utilizado por bactérias patogênicas para inserção de proteínas moduladoras da resposta imune do hospedeiro.

Embora uma variedade de bactérias endofíticas tenha sido identificada, incluindo Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e, principalmente, Proteobacteria (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006), nenhuma Archaea endofítica foi identificada até o momento, pelo menos de forma convincente (embora tenham sido registradas em alguns estudos independentes de cultivo, associadas à superfície de raízes velhas) (CHELLIUS & TRIPLETT, 2001).

Apesar da crescente conscientização sobre a importância da microbiota associada às plantas, muitas das minúcias dessas interações ainda são pouco elucidadas, como sua fitomodulação. Este processo é de grande importância, haja

vista que permite a planta se adequar às flutuações ambientais e fisiológicas a que está exposta. Mesmo interações sabidamente benéficas, como a simbiose entre leguminosas e as rizobactérias fixadoras de nitrogênio, podem vir a se tornar prejudiciais à planta e até mesmo se tornar uma relação de parasitismo em condições onde os benefícios fornecidos pelo simbiote não são necessários, como sob uma alta disponibilidade de compostos nitrogenados no ambiente (BAUER, 1981; GAGE, 2004). A capacidade do micro-organismo endofítico de modular certos aspectos da fisiologia da planta durante o processo de colonização também é essencial visto que, a princípio, a planta sempre entende esse processo como uma invasão potencialmente prejudicial e está programada para desencadear suas defesas imunes contra tal (COMPANT et al., 2005; INIGUEZ et al., 2005). Assim, os pontos chave do sucesso no estabelecimento de uma relação endossimbiótica são a modulação dos sinais químicos produzidos pelas plantas e a modulação de suas defesas imunes.

Para a vasta maioria dos micro-organismos, o interior e mesmo a superfície das plantas são ambientes inóspitos, devido à produção de compostos antimicrobianos pelas plantas, como terpenoides, benzoxazinonas e, principalmente, flavonoides e isoflavonoides (BAIS et al., 2006). Como os micro-organismos endofíticos conseguem evadir essas barreiras e se instalarem em tão grande número nos tecidos das plantas ainda não é totalmente compreendido (REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). A epiderme das plantas, frequentemente revestida por uma camada de cutícula, suberina e outros componentes, também representa uma barreira à penetração de micro-organismos (MÜLLER & RIEDERER, 2005). Usualmente, esse processo se dá passivamente por orifícios na superfície da planta, como estômatos e regiões de emergência de raízes laterais, mas também pode ocorrer por meio de vetores, como fungos micorrízicos (PAULA et al., 1991), e ainda ativamente, via enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular e outras barreiras primárias dos vegetais, incluindo celulasas, xilanases, pectinases, lipases e proteases (REDDY et al., 1996; SAKIYAMA et al., 2001; SUTO et al., 2002; TORRES et al., 2003; COMPANT et al., 2005; PENG & CHEN, 2007). Estas enzimas podem inclusive ter potencial de aplicações biotecnológicas.

Estudos têm demonstrado que, em bactérias, certas estruturas de superfície podem ser de grande importância no início dessas interações planta-micro-

organismo, no momento da colonização. Por exemplo, foi demonstrado que os pili do tipo IV, envolvido com a locomoção, cuja presença é um importante fator de virulência de muitas bactérias gram-negativas, são essenciais para a formação de biofilmes na superfície de raízes de arroz e posterior colonização endofítica (DORR et al., 1998; REINHOLD-HUREK et al., 2006; BOHM et al., 2007). Outros trabalhos relatam a importância dos flagelos na colonização interna de plantas por bactérias endofíticas (INIGUEZ et al., 2005). Czaban e colaboradores (2007) relataram que a proporção de bactérias endofíticas flageladas recuperadas de raízes de trigo era cinco vezes maior que a de bactérias flageladas da rizosfera correspondente. Ao mesmo tempo, porém, os flagelos bacterianos constituem um potente padrão molecular associado à patógenos (PMAP) reconhecido pelas defesas imune das plantas (COOLEY et al., 2003; JONES & DANGL, 2006).

Embora as plantas não apresentem um sistema de defesa de células móveis ou um sistema imune adaptativo somático, tal como os mamíferos, elas contam com as defesas imunitárias de cada uma de suas células e com um sistema de sinais que são emitidos de sítios infectados (JONES & DANGL, 2006). Os fitohormônios etileno, ácido salicílico e ácido jasmônico apresentam um papel central na resposta de resistência das plantas à patógenos (SHAH, 2009). O etileno é visto como um mensageiro secundário, capaz de ativar uma resposta independente de ácido salicílico referida como resistência sistêmica induzida (RSI) (TON et al., 2001). Estimulada pelo reconhecimento de uma invasão microbiana, a RSI elicit capacidades defensivas sistematicamente por toda a planta, incluindo a produção de fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (PR), de forma que na endosfera da planta, a modulação fisiológica dos níveis de etileno é provavelmente o ponto chave para garantir uma efetiva colonização endofítica (HARDOIM et al., 2011). Diversos trabalhos têm demonstrado que de alguma forma, os endófitos têm a habilidade de colonizar as plantas de uma maneira a causar baixa indução das defesas mediadas por etileno e ácido jasmônico (INIGUEZ et al., 2005; MICHÉ et al., 2006; BORDIEC et al., 2011). Os mecanismos dessa competência, no entanto, permanecem obscuros.

Além da habilidade de modular certos aspectos da fisiologia das plantas, o sucesso do estabelecimento da colonização endofítica depende ainda do potencial do endofítico de competir com diversos outros micro-organismos. Essa

competitividade pode ser conferida, dentre vários meios, pela: (1) produção de metabólitos secundários antimicrobianos, tais como o 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), cianeto de hidrogênio e antibióticos (DÉFAGO, 1993; RAAIJMAKERS et al., 2002; NIELSEN et al., 2002), (2) pela produção de biossurfactantes, afetando a colonização inicial da superfície das plantas por outros micro-organismos (SOUZA et al., 2003), (3) pela produção de enzimas líticas, capazes de hidrolisar componentes de parede de outros micro-organismos (COMPANT et al., 2010), e (4) pela produção de sideróforos, inibindo o crescimento de micro-organismos competidores da rizosfera indiretamente pela competição por nutrientes (COMPANT et al., 2005).

Embora muitos dos endofíticos sejam meramente oportunistas nessas relações, aproveitando-se de sua capacidade de evadir as defesas da planta e permanecer nessa condição de maneira equilibrada, beneficiando-se de um ambiente protegido e com disponibilidade de recursos nutritivos, é notória a necessidade das plantas de apresentarem uma microbiota associada para o seu crescimento e desenvolvimento (HARDOIM et al., 2008). Basta observar a dificuldade que existe em se cultivar transplantes vegetais em condições gnotobióticas (LEIFERT et al., 1989).

Nos últimos anos, tem havido uma crescente conscientização da importância da microbiota associada ao homem e outros animais, que naturalmente tem sido acompanhada de um grande esforço em se caracterizar e compreender seu papel e abrangência (TURNBAUGH et al., 2007; JAMI & MISRAHI, 2012). A mesma importância existe em relação à microbiota associada às plantas. Existem diversos relatos do potencial de micro-organismos endofíticos em promover o crescimento, desenvolvimento e saúde das plantas, incluindo a mobilização de nutrientes do solo, promoção de tolerância a estresses ambientais, resistência à fitopatógenos e produção de fitohormônios de crescimento (REDMAN et al., 2002; ARNOLD et al., 2003; OBLEDO et al., 2003; NASSAR et al., 2005; MONTAÑES et al., 2009; BERG, 2009; BIVI et al., 2010). O fato de micro-organismos poderem obter benefícios da planta ao receberem um ambiente protegido e com disponibilidade de nutrientes, ao mesmo tempo em que promovem crescimento e redução de estresses em suas hospedeiras, sugere que a emergência de uma interação mutualística tenha sido resultado de uma seleção positiva (THRALL et al., 2007). Exemplos deste padrão podem ser ilustrados nas relações entre o fungo *Curvularia protuberata* e a planta

geotermofílica *Dichanthelium lanuginosum*, e entre *Fusarium culmorum* e a planta costeira halotolerante *Leymus mollis*. Em associação endofítica, ambos os pares são capazes que colonizar habitats com temperaturas maiores que 65°C e com níveis de salinidade da água do mar (300-500 mM de NaCl), respectivamente, o que não é possível para nenhum dos organismos quando crescidos isoladamente, ou se dá de forma muito comprometida em alguns casos (MARQUÉZ et al., 2007; RODRIGUÉZ et al., 2008).

A importância para as plantas das associações com micro-organismos endofíticos também pode ser claramente notada ao se observar que, frequentemente, a população endofítica de uma planta é tão ou maior e mais diversa que sua população rizosférica e epifítica (SANTAMARÍA & BAYMAN, 2005).

2.3. Potencial dos endofíticos de promover o crescimento e desenvolvimento vegetal

Na literatura científica podem ser encontrados diversos relatos de como a microbiota associada às plantas pode afetar o balanço hormonal destas de forma benéfica. Por exemplo, o etileno é um importante hormônio vegetal, o único gasoso, produzido a partir do precursor imediato ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico). Em baixas concentrações, pode contribuir para a promoção do crescimento vegetal, embora em maiores concentrações seja conhecidamente um inibidor do crescimento vegetal e indutor da senescência (PIERIK et al., 2006). Porém, alguns dos micro-organismos que se associam à plantas, inclusive alguns endofíticos, são capazes de produzir ACC desaminases que degradam o precursor ACC, modulando as concentrações desse hormônio nas plantas (PANDEY et al., 2005; ZHANG et al., 2011) e promovendo seu crescimento (GRICK, 2005). Como este fitohormônio ainda está associado às respostas de estresse da planta, o decréscimo de seus níveis favorece a colonização pelos micro-organismos endofíticos e ainda tem o grande potencial de proteger a planta contra estresses bióticos e abióticos (revisado em SALEEN et al., 2007).

As auxinas (do grego “auxein”, que significa “crescer”), particularmente o ácido 3-indol acético (AIA), foram os primeiros hormônios vegetais a serem descobertos. Estão envolvidas em virtualmente todos os aspectos do crescimento e

desenvolvimento das plantas, sendo consideradas, juntamente com as citocininas, hormônios essenciais à sua viabilidade (BARTEL, 1997; MOCKAITIS & ESTELLE, 2008). São responsáveis pela extensão, divisão e diferenciação de células e tecidos vegetais, tropismos, dominância apical, formação de raízes adventícias, diferenciação do sistema vascular, abscisão foliar, germinação de sementes e crescimento de frutos, podendo afetar também a fotossíntese, biossíntese de vários metabólitos e produção de fatores de resistência a estresses ambientais. Estes efeitos podem variar dependendo de fatores como local de atuação, concentração, estágio de desenvolvimento do tecido ou órgão alvo, envolvimento de outros hormônios, dentre outros (ZHAO, 2010).

Diversos micro-organismos que crescem associados às plantas apresentam a capacidade de produzir AIA, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (SERGEEVA et al., 2002; KHAN & DOTY, 2009; NASSAR et al., 2005; SIRRENBORG et al., 2007). A bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, causadora da doença galha da coroa, é capaz de induzir deformações neoplásicas na planta hospedeira por meio da produção de auxinas e citocininas. As cepas virulentas da bactéria são portadoras de um plasmídeo Ti, e durante a infecção é inserido no genoma das células hospedeiras uma pequena região desse plasmídeo, o T-DNA, contendo os genes necessários à produção dos fitohormônios, além da produção de opinas, compostos de baixo peso molecular que são aproveitados pela bactéria como uma importante fonte energética e de nitrogênio (GENVIL, 1990). Neste caso, a produção de fitohormônios por bactérias não é benéfica à planta. No entanto, a produção de AIA por micro-organismos que estabelecem relações benéficas com diversas plantas têm sido descrita, inclusive associada a várias plantas de interesse comercial, tais como soja, milho, arroz, cana-de-açúcar e batata (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993; JOHNSTON-MONJE et al., 2011; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; JHA & KUMAR, 2009; SESSITSCH et al., 2012).

Montañez e colaboradores (2012) e Jonhston-Monje e Raizada (2011) também demonstraram a capacidade de diversas bactérias endofíticas de milho produtoras de AIA de promoverem o crescimento de plantas de milho (*Z. mays* L.) e batata (*Solanum tuberosum* cv. Kennebec). No entanto, assim como em diversos outros trabalhos, esses autores também relataram a habilidade dos isolados em

promover o crescimento vegetal por outros meios, como solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio e produção de sideróforos.

Estudos com mutantes de *Azospirillum brasilense*, capazes de produzir apenas 10% dos níveis de AIA produzidos pela linhagem selvagem, mostraram que o aumento promovido no crescimento de plantas de trigo (*Triticum aestivum*) inoculadas com a bactéria endofítica do tipo selvagem era perdido quando se utilizava as linhagens mutantes (DOBBELAERE et al., 1999). Do mesmo modo, mutantes da bactéria capazes de produzir AIA constitutivamente, e não apenas na fase estacionária, como as linhagens selvagens, conferiam um aumento no peso seco nas plantas de trigo acima de 14% em relação aos controles, contra apenas 4% de aumento conferido pela linhagem selvagem (SPAEPEN et al., 2008).

Estudos também têm demonstrado que a aplicação exógena de L-triptofano, precursor da biossíntese de auxina nas plantas e micro-organismos (ARSHAD & FRANKENBERGER, 1998), estimula consideravelmente a produção microbiana de auxinas *in vitro* (FRANKENBERGER & POTH, 1987; KHALID et al., 2004).

Além das auxinas, micro-organismos associados à plantas, incluindo endofíticos, também podem produzir outros fitohormônios, como giberilinas, citocininas, ácido abscísico, jasmônico, dentre outros (FORCHETTI et al., 2007; KHAN et al., 2009; BHORE et al., 2010).

Outra potencialidade dos micro-organismos promotores de crescimento de plantas (MPCP), e que também tem sido alvo de grande interesse da comunidade científica e do agronegócio, é a mobilização de nutrientes, com destaque para o nitrogênio e o fósforo.

Embora o nitrogênio seja o elemento mais abundante da atmosfera, apenas certos procariontos dos domínios Bacteria e Archaea são capazes de realizar a fixação biológica do nitrogênio, ou seja, converter sua forma atmosférica (N_2) a amônio (NH_4^+) (CANDIELD et al., 2010). Certas leguminosas (Fabaceae), por meio de uma cascata de sinalizações, conseguem estabelecer relações espécie-específicas com bactérias fixadoras de nitrogênio da classe Alphaproteobacteria. As plantas recebem compostos nitrogenados em troca de carbono fotoassimilado. Esse mesmo princípio de cooperação é observado entre outros tipos de bactérias

diazotróficas e plantas como, por exemplo, as associações endofíticas entre *Azospirillum* spp., *Azoarcus* spp. e *Herbaspirillum* com uma diversidade de plantas, incluindo cereais de interesse econômico (BALDANI & BALDANI, 2005; SANTI et al., 2013).

Os primeiros relatos dessas associações foram feitos pela pesquisadora brasileira Johanna Döbereiner, que em 1958 descobriu uma nova espécie de bactéria diazotrófica, a *Beijerinckia fluminensis*, que crescia associada à rizosfera e rizoplano de cana-de-açúcar e outras gramíneas (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958). Na época, estimou-se a contribuição dessas bactérias à culturas de cana no Brasil em 50 kg ha⁻¹ de nitrogênio fixado por ano (DÖBEREINER et al., 1973).

Diversos trabalhos também têm relatado associações de bactérias dizotróficas com plantas de milho, incluindo bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella* e *Azospirillum* (CHRISTIANSEN-WENIGER & VANDERLEYDEN, 1994; CHELIUS & TRIPLETT, 2000; GUTIERREZ-ZAMORA & ROMERO, 2001; PERIN et al., 2006; MONTAÑEZ et al., 2009). Embora muitos trabalhos analisando o efeito de inóculos destas bactérias em plantas tenham apresentado resultados positivos, em geral, outros fatores promotores de crescimento, como a produção de fitohormônios, também estão envolvidos, e a contribuição da capacidade de fixação de nitrogênio por bactérias associadas à plantas não leguminosas parece ter um efeito mais marginal em seu crescimento, significativo apenas em condições de carência deste elemento no ambiente (OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1995). Porém, outra possibilidade é a de se buscar resultados mais significativos por melhoramento e engenharia genética (SANTI et al., 2013).

O outro elemento químico frequentemente limitante ao crescimento das plantas é o fósforo, devido principalmente a sua baixa taxa de difusão na maioria dos solos, seus íons serem facilmente imobilizados por precipitação com diversos elementos do solo, tais como os cátions Ca²⁺, Mg²⁺, Fe³⁺ e Al³⁺, além de frequentemente estar presente em forma orgânica, principalmente como inositóis hexa e pentafosfato (fitatos), que correspondem em média a 50% do teor de fósforo presente no solo. Estas formas de fósforo complexadas são apenas marginalmente assimiladas pelas plantas (RAGHOTHAMA, 1999; OLIVEIRA et al, 2009). Devido a

essas características, usualmente grandes proporções da adubação fosfatada aplicada às culturas agrícolas são prontamente perdidas por imobilização em formas insolúveis, ou por lixiviação, vindo a poder causar uma série de impactos ambientais, principalmente em ambientes aquáticos, onde quando acumulados podem promover a eutrofização, levando a hipoxia e degradação de corpos d'água e aquíferos (RAGHOTHAMA, 1999; VANCE et al., 2003).

Para a mobilização destas fontes em ortofosfatos HPO_4^{-2} e $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$, que podem ser assimilados pelas plantas, é de fundamental importância o papel de micro-organismos solubilizadores de fosfato (MSP), que podem ser de vida livre ou crescerem associados às plantas, incluindo uma variedade de bactérias, fungos e leveduras (KUCEY et al., 1989; WHITELOW, 1999; COLLAVINO et al., 2010).

Os MSP podem usar vários mecanismos para promover a solubilização e/ou disponibilização do fósforo livre. Entre os mecanismos de solubilização de fosfato inorgânico estão a redução do pH do ambiente por produção de ácidos orgânicos ou liberação de prótons, atrelada, por exemplo, à trocas iônicas com o meio ambiente durante a aquisição de nutrientes (BHATTACHARYA & JHA, 2012). Gyaneshwar e colaboradores (1998) detectaram por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a presença dos ácidos oxálico, succínico, cítrico, láctico e acético acumulados em meio de cultivo líquido após o crescimento de MSP, e observou que a capacidade de solubilização de fosfato *in vitro* de seus isolados era neutralizada pela adição de substâncias tamponantes no meios de cultivo. Estes ácidos podem não só solubilizar o fósforo no solo por trocas aniônicas do PO_4^{-2} pelo ácido aniônico como, principalmente por atividade quelante de cátions associados ao fosfato, como o Al^{3+} e o Fe^{+3} , e competição pelos sítios de adsorção do fósforo à elementos do solo, como compostos húmicos (OMAR, 1998; KHAN et al., 2007; RICHARDSON et al., 2009).

Já a solubilização do fósforo complexado a compostos orgânicos no solo pode ser alcançada enzimaticamente, usualmente por dois grupos de enzimas, as fosfatases ácidas de baixa especificidade, capazes de catalisar desfosforilações de grupos fosfoésteres ou fosfoanidridos, e as fitases, fosfatases que catalisam a desfosforilação específica de ácidos fítics (JONER et al. 2000). Essas fosfatases podem ser detectadas tanto extracelularmente, no solo, como associadas às

superfícies das células microbianas (JONER et al., 2000). As fosfatases alcalinas são usualmente intracelulares e apresentam alta especificidade, estando envolvidas com vias metabólicas dos organismos e não contribuindo consideravelmente para a solubilização de fosfato no solo (JONER et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2006). A classificação de ácidas ou alcalinas deriva das condições ótimas de pH para a atividade das enzimas (JONER et al., 2000).

Diversos trabalhos têm associado a atividade de MSP à promoção do crescimento e desenvolvimento de plantas. Unno e colaboradores (2005) mostraram que diversos isolados de *Burkholderia* spp. de *Lupinus albus* eram capazes de solubilizar fitato e promover crescimento de mudas de *L. albus*. Montañes e colaboradores (2012) indentificaram diversas bactérias endofíticas de milho solubilizadoras de fósforo que se mostraram capazes de promover o crescimento de plantas de milho em condições laboratoriais, incluindo *Burkholderia* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter* spp., *Herbaspirillum hiltneri* e *Pantoea agglomerans*, sendo que isolados do gênero *Rhizobium* apresentaram os maiores índices de solubilização de fosfato. Neste trabalho, diversos isolados também apresentaram outros atributos promotores de crescimento vegetal, como fixação biológica de nitrogênio e produção de AIA, e os resultados se mostraram dependentes dos cultivares de milho testados. *P. fluorescens* EMA38 e *Enterobacter* EMA149 e EMA15, por exemplo, foram capazes de promover o crescimento das partes aéreas do cultivare NK900, mas não do cultivar DK682, enquanto o oposto foi observado para *P. fluorescens* EMA68, *Pantoea* spp. EMA35 e *Rizobium* spp. EMA176. Desse modo, não foi possível fazer uma atribuição conclusiva a quais parâmetros foram realmente efetivos em promover o crescimento vegetal observado.

Young e colaboradores (2013) isolaram do solo uma nova linhagem de *Burkholderia cepacia*, que se mostrou capaz de estabelecer uma relação endofítica permanente com plantas de milho (*Z. mays* L.). Quando inoculada em sementes de milho, após um mês, as plantas cultivadas *in vitro* apresentaram aumento de 45% na estatura, 48% na produção de biomassa, e 86% no comprimento das raízes em relação aos controles não-inoculados. A taxa de assimilação de fósforo pelas plantas inoculadas apresentou um aumento de 2,4 vezes, assim como foi observado um aumento da atividade fosfatase nas raízes das plantas inoculadas. O conteúdo total de fósforo e nitrogênio das plantas também apresentou um aumento de 150% e

90%, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas. Porém, outros fatores promotores de crescimento, como a capacidade de produzir fitohormônios e sideróforos, não foram analisadas, o que dificulta associar a promoção no crescimento das plantas apenas à habilidade de solubilizar fosfato.

Sideróforos são compostos de baixo peso molecular produzidos por plantas e micro-organismos que apresentam alta afinidade por ferro (III), e em menor escala por outros metais, como íons de alumínio, cobre e níquel (DIMKPA et al., 2008; HIDER & KONG, 2009). Frequentemente, o ferro está presente em condições limitantes no ambiente, sendo alvo de grande disputa entre os organismos. No solo, por exemplo, embora muitas vezes se encontre em excesso, usualmente esse elemento se encontra na forma insolúvel de óxidos e hidróxidos, pouco biodisponíveis. Embora as plantas sejam capazes de aumentar a biodisponibilidade do ferro no solo pela produção de sideróforos e redução do pH da rizosfera, frequentemente essa capacidade é insuficiente para atender as suas demandas, principalmente em solos alcalinos, que favorecem ainda mais sua precipitação (ZUO & ZHANG, 2011; RADZKI et al., 2013).

Assim como as plantas, em condições de baixa disponibilidade de ferro, muitos micro-organismos são capazes de produzir sideróforos que quelam o ferro do ambiente. Em seguida, este elemento pode ser reduzido pela ligação do sideróforo à receptores específicos na superfície da célula (NEILANDS, 1984). Recentemente, Radzki e colaboradores (2013) demonstraram que plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Marglobe) em condição de privação de ferro, em estufa, apresentaram ganho de peso seco em relação à plantas supridas com ferro, quando tratadas com sideróforos produzidos por duas cepas bacterianas, uma *Chryseobacterium* spp. e uma *P. fluorescens*, isoladas da rizosfera de arroz (*Oryza sativa*) e *Nicotina glauca*, respectivamente. O conteúdo de clorofila das plantas tratadas com sideróforos não apresentou diferença estatística em relação às plantas supridas com ferro.

Dimpka e colaboradores (2008), trabalhando com *Streptomyces* spp., observaram que a presença dos metais tóxicos Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} inibiam a produção de AIA por seus isolados, porém aumentava a produção de sideróforos, já que competiam pela atividade quelante com os íons Fe^{3+} . Posteriormente, os

autores também observaram que a inibição da produção de AIA promovida pelos metais pesados também era suprimida pela produção de sideróforos, provavelmente pela capacidade destes de sequestrar os metais inibidores da síntese do fitohormônio. Os autores ainda concluíram que, de fato, a produção de sideróforos indiretamente induzia o crescimento vegetal, devido a síntese de auxinas que era normalizada pelo sequestro dos metais inibidores de sua síntese.

A produção de sideróforos por micro-organismos associados a outras plantas também tem sido relatada, inclusive por populações endofíticas de plantas como o milho. Em trabalhos de prospecção como o de Montañez e colaboradores (2012) e Johnston-Monje e Raizada (2011), por exemplo, foi observada a produção de sideróforos por *P. fluorescens*, *Burkholderia* spp., *Enterobacter* spp. e *Pantoea* spp., assim como a capacidade de produzir fitohormônios de crescimento, de solubilizar fósforo, antagonizar patógenos, dentre outras habilidades. Alguns dos isolados estudados nestes trabalhos também promoveram o crescimento de plantas em condições laboratoriais, porém a associação direta do potencial de produzir sideróforos com o crescimento de plantas não foi analisado.

Os micro-organismos produzem diversos tipos de sideróforos, como os ferricromos produzidos por fungos *Ustilago* spp., as enterobactinas produzidas por *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Erwinia* spp., e as pioverdinas produzidas por *Pseudomonas* spp e *Burkholderia* spp. (NEILANDS, 1984). A habilidade de produzir um ou mais sideróforos e de captar não apenas os seus próprios, como os produzidos por outras espécies, conferem aos micro-organismos uma grande capacidade competitiva, podendo garantir, por exemplo, a habilidade de um determinado micro-organismo de colonizar eficientemente uma planta e até mesmo competir por tal com micro-organismos fitopatógenos (MIRLEAU et al., 2000; RADZKI et al., 2013). Em geral, os sideróforos produzidos por bactérias apresentam maior afinidade por ferro que os produzidos por fungos patogênicos (COMPANT et al., 2005). Cao e colaboradores (2004) isolaram 131 actinomicetos endofíticos de raízes de banana (*Musa* sp.). Um dos isolados, o *Streptomyces* S96, apresentou a capacidade de produzir sideróforos e atividade antagonista contra o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, causador de uma ferrugem em bananeiras. Observou-se que a atividade antagonista era perdida quando se adicionava FeCl_3 à zona de inibição, em meio sólido. Além disso, em ensaios *in vivo*, os autores relataram que o índice

de severidade da doença foi significativamente reduzido nas plantas inoculadas com a linhagem S96, indicando o potencial de se explorar a capacidade de microorganismos endofíticos produtores de sideróforos em se combater fitopatologias.

Também existem diversos trabalhos relatando a capacidade de microorganismos que crescem associados à plantas de elicitar sua RSI (KLOEPPER et al., 2004) contra bactérias, fungos, vírus, insetos, nematoides, dentre outros fitopatógenos (SIKORA, 1988; LIU et al., 1995; ZEHNDER et al., 1997; MAURHOFER et al., 1998). Tomateiros (*S. lycopersicum*) tratados pelos MPCP *Pseudomonas fluorescens* 63-28 ou *Bacillus pumilus* SE 34, por exemplo, apresentaram espessamento de paredes celulares, na deposição de calose e no acúmulo de compostos fenólicos em sítios de invasão de hifas de *Fusarium oxysporum* e outros fungos fitopatogênicos (M'PIGA et al., 1997; BENHAMOU et al., 1998). M'Piga e colaboradores (1997) demonstraram ainda que a *P. fluorescens* 63-28 também induzia as plantas de tomate a acumularem proteínas PR, como quitinases, nos sítios de penetração do *F. oxysporum* f. sp. pisi, promovendo a degradação das paredes celulares do fungo parasita e inibição de seu crescimento.

Outra forma de promover proteção contra fitopatógenos é através do antagonismo direto dos MPCP (CARVALHO et al., 2012; FAVARO et al., 2012; JOHNSTON-MONJE & RAIZADA, 2011; GAO et al., 2010). Os mecanismos que capacitam tal habilidade incluem a produção de antibióticos, biossurfactantes, competição por nutrientes e colonização de sítios e produção de enzimas extracelulares degradadoras de parede, como quitinase e 1,3-glucanases (CHERNIN & CHET, 2002; DE SOUZA et al., 2003).

Araújo e colaboradores (2000) observaram que de 53 actinomicetos endofíticos isolados de folhas e raízes de milho (*Z. mays*), 23 apresentaram atividade antibiótica contra uma ou mais linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *B. subtilis* e *Candida albicans*, com que foram confrontados. Johnston-Monje e Raizada (2011) relataram que atividade antagonista contra *E. coli* DH5 α , *Bacillus subtilis* e a levedura da linhagem AH109 foi observada em endofíticos isolados de oito variedades dentre as 14 de milho e teosinto (*Z. mays* spp.) utilizadas neste trabalho, com destaque para espécies de *Luteibacter*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas* e *Burkholderia*.

Krechel e colaboradores (2002) analisaram e compararam as comunidades de bactérias endo e epifíticas associadas a cultivos de batata (*S. tuberosum*), e avaliaram o potencial antagonista *in vitro* de 440 isolados frente aos fungos de solo patogênicos *Verticillium dahliae* e *Rhizoctonia solani*. A proporção de antagonistas foi mais alta na rizosfera (10%), seguidos da endorriza (9%), filosfera (6%) e endosfera (5%), tendo sido considerados promissores agentes de controle biológico. Sessitsch e colaboradores (2004) testaram os mesmos isolados de bactérias contra os fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Phytophthora cactorum* e as bactérias *Erwinia carotovora*, *Streptomyces scabies* e *Xanthomonas campestris*. Ao todo, sete endofíticos apresentaram antagonismo contra estes patógenos, sendo considerados como potenciais agentes de controle biológico.

Catillo e colaboradores (2002) isolaram e caracterizaram um novo antibiótico de largo espectro, a munumbicina, produzida pelo endofítico *Streptomyces* NRRL 30562, isolado da planta medicinal *Kennedia nigriscans*, nativa do Norte da Austrália. Ensaios com o extrato do endofítico mostraram sua eficiência contra os fitopatógenos *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Erwinia carotovora*, *Cochliobolus carbonum* e *Penicillium* sp., além dos patógenos humanos *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis* multi-resistente, *S. aureus* resistente à metilicina e o protozoário parasita da malária *Plasmodium falciparum*.

2.4. A cultura do milho

O milho (*Zea mays* ssp. *mays*) é um dos principais cereais cultivados pelo homem. Acredita-se que sua domesticação tenha se dado há cerca de 9000 anos, no sudeste do México, a partir do teosinto (*Z. mays* spp.), uma gramínea selvagem (MATSUOKA et al., 2002).

Além de ser um cultivar de grande importância na alimentação humana, particularmente em alguns países, como o México, sua principal destinação é a alimentação animal, principalmente como ração, que corresponde por cerca de 70% de seu consumo mundial. Outras destinações incluem diversas indústrias de beneficiamento, como a de biocombustíveis (DUARTE, 2000). Nos Estados Unidos, por exemplo, responsável por mais de um terço da produção mundial de milho,

cerca de 40% do milho produzido e importado é destinada a indústria de bioetanol (PIMENTEL, 2012).

Atualmente, o milho é o cereal mais produzido no mundo (FAOSTAT, 2013). O Brasil aparece como o terceiro maior produtor mundial do cereal, atrás apenas do Estados Unidos e da China (FAOSTAT, 2013). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra brasileira de milho do período 2013/14 havia atingido a marca de 70,9 milhões de toneladas, sendo que a produção mundial no mesmo período foi estimada em 989,6 milhões de toneladas (United States Department of Agriculture – USDA).

Apesar desses números, o Brasil não se destaca em relação à produtividade de milho. Em 2013/14, a produtividade média dessa cultura no Brasil foi em torno de 5,1 toneladas por hectare, valor inferior à média mundial de 5,5 t ha⁻¹, e bem abaixo das 9,9 t ha⁻¹ apresentadas pelos Estados Unidos ou aos 10,1 t ha⁻¹ do Chile, ou aos 25,6 t ha⁻¹ de Israel (USDA). Porém, a produtividade média nacional vem subindo sistematicamente, e já é comum em diversas partes do país se observar índices de produtividade superiores a 12 t ha⁻¹, não raro maiores que 14 t ha⁻¹ (MELHORANÇA et al., 2012).

Um dos maiores desafios do século XXI será desenvolver modelos de produção de grãos de maneira não só cada vez mais eficazes e produtivos, como também de maneira ambientalmente responsável e sustentável. Os atuais sistemas de produção agrícolas são baseados no uso de pesticidas e fertilizantes químicos que, invariavelmente, acabam causando impactos ao meio ambiente e à saúde humana, incluindo poluição do solo e água, exposição a resíduos tóxicos na própria cadeia alimentícia, impacto sobre organismos não alvos, tais como as abelhas, além de tornarem o custo da produção extremamente oneroso (GUNNELL et al., 2007; LEACH & MUMFORD, 2008). Além disso, muitos dos fertilizantes comumente utilizados atualmente são, em geral, derivados de combustíveis fósseis, os quais provêm de reservas finitas e logo são de exploração insustentável à longo prazo. As constantes emergências e re-emergências de fitopatógenos também continuam constituindo um desafio formidável a nossas habilidades de salvaguardar nossos cultivos agrícolas (MILLER et al., 2009).

Tradicionalmente, o homem sempre apostou na biotecnologia vegetal para atender às demandas agrícolas da humanidade, tendo esta, de fato, sido fundamental até agora, tal como iconizado desde a década de 60 pela chamada “revolução verde” (EVENSON & GOLLIN, 2003). Porém, ainda hoje, os benefícios das interações planta-micro-organismos têm sido ignoradas e pouco aplicadas à agricultura, principalmente em culturas de grãos como o milho. Neste cenário, e por tudo que aqui foi dito, os micro-organismos endofíticos surgem como uma opção promissora na busca por alternativas mais rentáveis e sustentáveis de aumentar a produtividade de culturas de grãos. Por isso, este projeto teve como objetivos isolar e caracterizar as bactérias endofíticas de um cultivar híbrido de milho cultivado no Brasil, e prospectar seu potencial para produzir fatores de crescimento vegetal, o que poderá permitir sua futura utilização na forma de um bioinoculante nesta e em outras culturas de grãos.

3. OBJETIVO GERAL

Realizar o isolamento e identificação de bactérias endofíticas associadas à seiva, folhas e raízes de milho, e analisar seu potencial de produção de fatores de crescimento de plantas e de apresentar atividade antagonista contra fitopatógenos.

3.1. Objetivos específicos

- Isolar e identificar pelo sequenciamento parcial do gene rDNA 16S as bactérias endofíticas das folhas, raízes e seiva da variedade híbrida de milho (*Zea mays*) Pioneer 30F35 Herculex;
- Analisar o efeito das partes da planta (seiva, folhas e raízes) e tratamento de adubação fosfatada (presença ou ausência) sobre as densidades de bactérias endofíticas de milho;
- Analisar o potencial dos isolados quanto à produção do fitohormônio ácido 3-indol acético (AIA), solubilização de fosfato, mineralização de fitato e produção de sideróforos;
- Analisar o potencial dos isolados de antagonizar bactérias e fungos fitopatogênicos.

4. METODOLOGIA

4.1. Material vegetal e delineamento experimental

Para o isolamento dos micro-organismos endofíticos, utilizou-se um experimento com plantas de milho (*Zea mays*) da variedade híbrida Pioneer 30F35 Herculex (PIONNER). O plantio foi realizado no dia 21 de março de 2013, na área experimental da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas – MG; 19°26'53,95" ao sul, 44°09'59,87" à oeste, altitude em torno de 720 metros), em solo classificado como Latossolo Vermelho Distrófico e com histórico de mais de 20 anos de cultivo de milho. O delineamento experimental do cultivo foi organizado em blocos casualizados, com dois tratamentos, com e sem adubação fosfatada, e três repetições amostrais. As parcelas experimentais foram constituídas de quatro linhas de cinco metros e espaçamento de 0,70 m, com cinco plantas por metro linear, com um total de 100 plantas/parcela, mas considerando-se duas linhas externas como bordadura, o *stand* útil foi de 40 plantas por parcela. O tratamento com fósforo foi a base de 250 kg ha⁻¹ de adubo Super Triplo (100 kg P₂O₅ ha⁻¹) aplicados a 5 cm de profundidade, através da abertura de sulcos com enxada e ao lado da linha de plantio. Todos os tratamentos receberam adubação de cobertura nas doses de 54 kg ha⁻¹ de ureia e 80 kg ha⁻¹ de KCl no momento do plantio, e nova adubação aos 30 e 45 dias após o plantio, em duas doses de 125 kg ha⁻¹ de ureia cada uma. Ao final do ciclo, amostras foram coletadas para análises químicas do solo (acidez, capacidade de troca iônica e dosagem de macro e micronutrientes) por técnicos da Embrapa Milho e Sorgo.

Tabela 1: Propriedades químicas do solo (0 – 20 cm) das áreas de cultivo (Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas, MG) do milho antes de receberem os tratamentos de adubação fosfatada.

pH (H ₂ O)	H+Al (cmolc/dm ₃)	Fósforo Mehlich (1 mg/dm ₃)	MO (dag/kg)	Carbono (%)	Al (cmolc/dm ₃)	Ca (cmolc/dm ₃)
6,8	3,42	22,322	3,29	1,91	0	4,635
Mg (cmolc/dm ₃)	K (mg/dm ₃)	SB (cmolc/dm ₃)	CTC (cmolc/dm ₃)	V (%)	Sat. Al(%)	
0,601	136,9	5,586	9,006	62,026	0	

H+Al: acidez potencial; MO: matéria orgânica; SB: soma de bases trocáveis; CTC: capacidade de troca de cátions; V: saturação por bases; Sat. Al: saturação de alumínio na CTC.

4.2. Extração e isolamento das bactérias endofíticas

Três plantas de cada repetição por tratamento, totalizando nove plantas por tratamento, foram coletadas aos 87 dias após o plantio, quando as plantas estavam no período de florescimento. Para a extração das bactérias endofíticas totais dos tecidos de milho, primeiramente, os caules com as folhas das plantas foram cortados a cerca de 5 cm do nível do solo no campo, e as raízes foram cuidadosamente arrancadas junto aos blocos de solo em seu entorno. Na Embrapa Milho e Sorgo, as folhas foram destacadas dos caules e reservadas em câmara fria, juntamente com as raízes, sendo mantidas nessa condição até o momento de seu processamento. Os caules foram cortados na região dos entrenós com uma lâmina estéril e desinfetados externamente da microbiota epifítica por lavagem em água corrente, seguida de imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo (v/v) por 30 segundos, imersão em álcool 70% por 1 minuto e quatro lavagens em água destilada estéril. A seiva foi recolhida em tubos falcon estéreis, com a extração por pressão positiva via um sistema de bombeamento de ar estéril. No mesmo dia, a seiva extraída, as folhas e as raízes foram enviadas para o Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFMG, onde o processamento das amostras teve continuidade.

Da seiva, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-6} em solução salina (NaCl 0,85%), e 100 μ L de cada diluição, além da amostra bruta, foram plaqueados por espalhamento em superfície em placas de Petri contendo meio TSA (Himedia/Índia) suplementado de benomil (50 μ g /mL) (Sigma/EUA), visando o isolamento das bactérias endofíticas e inibição do crescimento de fungos endofíticos.

As folhas foram primeiramente lavadas em água corrente, cortadas em fragmentos com cerca de 5 cm de aresta e desinfetadas superficialmente por imersão em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo (v/v) por 3 minutos, imersão em álcool 70% por 1 minuto e quatro lavagens em água destilada estéril. A seguir, 2,5 g de folhas de cada planta foram triturados com pistilo em grais contendo 5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e cerca de 1 g de areia estéril. Após a trituração, as amostras foram transferidas para tubos plásticos de 15 mL estéreis e mantidas sob agitação em agitador rotatório (Marconi) a 180 rpm e temperatura ambiente, para permitir a liberação mais eficiente dos endofíticos das partículas trituradas. Foram realizadas diluições seriadas até 10^{-6} em solução salina (NaCl 0,85%), e 100 μ L de

cada diluição e das amostras brutas trituradas foram plaqueados por espalhamento em placas de Petri contendo TSA mais benomil (50 µg /mL).

Para o isolamento dos endofíticos das raízes, foi utilizada basicamente a mesma estratégia. A desinfecção externa foi realizada inicialmente com lavagem em água corrente, para retirar o excesso de solo associado ao sistema radicular de cada amostra, e as raízes foram cortadas em fragmentos com 5 a 10 cm de comprimento, descartando-se regiões escarificadas ou com aparência patológica. Em seguida, os fragmentos foram mantidos sob agitação a 200 rpm por 30 minutos, em frascos contendo água destilada para remoção de materiais ainda aderidos, para finalmente passarem pela esterilização química, onde foram imergidos por 5 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5% de cloro ativo (v/v), 2 minutos em álcool 70% e quatro lavagens em água estéril. Como controle desse processo, assim como da esterilização superficial dos colmos e folhas, alíquotas de 100 µL da água da última lavagem das amostras foram plaqueadas em placas contendo meio TSA, as quais foram incubadas por dez dias em incubadora do tipo BOD (FANEM), a 28°C, não tendo sido observado crescimento de bactérias não-endofíticas.

Após o período de incubação, os diferentes morfotipos obtidos foram enumerados para a estimativa da densidade microbiana (UFC por g ou mL de amostra), bem como da distribuição da microbiota endofítica nas folhas, seiva e raízes do milho. Representantes dos diferentes morfotipos bacterianos foram purificados por semeadura em estrias em meio TSA.

4.3. Preservação dos micro-organismos isolados

Representantes dos diferentes isolados bacterianos foram preservados em tubos de ensaio contendo meio lignieri (caldo nutriente 13 g L⁻¹; ágar 7 g L⁻¹; gelatina 5 g L⁻¹), mantidos a 4°C, e criotubos com caldo TSB (Himédia/Índia) e glicerol a 20% (v/v) a -80°C, após o crescimento a 28°C. Os isolados foram depositados na Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

4.4. Caracterização das bactérias isoladas

Todos os isolados obtidos e estocados foram caracterizados macromorfolologicamente e pela reação tintorial a coloração de Gram, seguido da identificação a partir do sequenciamento parcial do gene rDNA 16S, a partir da análise com sequências homólogas depositadas no GenBank.

4.4.1. Extração de DNA das bactérias endofíticas

Para a extração de DNA dos isolados bacterianos (PITCHER et al., 1989, com modificações), estes foram cultivados em placas contendo meio TSA (Himedia/Índia) por 48 h à 28°C. Após o crescimento, colônias isoladas foram coletadas e suspensas em 250 µL de tampão TE (Tris-EDTA – Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5). Após adição de uma porção de esferas de vidro aos microtubos, estes foram levados ao vortex por 2 min. Em seguida, 400 µL da solução de tiocianato de guanidina 5,0 M, EDTA 100 mM (pH 8,0) e sarcosil 0,5% foram adicionados e os tubos, após agitação por inversão, foram incubados por 10 min à temperatura ambiente. 200 µL de acetato de amônio 7,5 M foram, então, adicionados aos tubos, que foram novamente agitados por inversão e incubados por 10 min em gelo. Após esse período, 600 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 v/v) foram acrescentados e os tubos agitados por inversão. Após centrifugação a 12.000 x g por 10 min, a fase aquosa foi transferida para novos microtubos, onde mesmo volume de isopropanol foi acrescentado. Em seguida, os microtubos foram mantidos a temperatura ambiente por 15 min e centrifugados a 4.000 x g por 20 min. O sobrenadante então foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70% (v/v). Essa etapa foi repedida três vezes. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi suspenso em 50 µL de água deionizada estéril e estocado a -20°C. O produto foi quantificado em nanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

4.4.2. Reações de PCR de regiões do gene rDNA 16S

Para amplificar as sequências parciais de rDNA 16S dos isolados bacterianos, foram utilizados os iniciadores 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') (STACKEBRANDT & GOODFELLOW, 1991). A reação da PCR foi realizada em um volume final de 50 µL, contendo 1,25 U de Taq DNA polimerase (Phoneutria), MgCl₂ a 1,5 mM, 200 µM de cada um dos

desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,3 μ M de cada iniciador, 50 a 300 ng de DNA, e volume completado com água deionizada estéril. A reação foi realizada utilizando termociclador Veriti (Applied Biosystems) sob as seguintes condições (DON et al., 1991):

Estágio 1: desnaturação inicial a 94°C por 5 min;

Estágio 2: três ciclos com desnaturação a 94°C por um min, anelamento a 57°C por um min e extensão a 72°C por três min;

Estágios 3 a 10: dois ciclos com desnaturação a 94° por um min, extensão a 72°C por três min, e anelamento por um min a 56°C no primeiro estágio, decrescendo 1°C a cada estágio até 49°C, no último estágio.

Estágio 11: anelamento final a 72°C por 10 min.

4.4.3. Sequenciamento de regiões do rDNA 16S

Após dosagem dos produtos das PCRs em nanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies), estes foram purificados adicionando-se 11,25 μ L de EDTA (125 mM) e 135 μ L de etanol absoluto (Merck), e incubando-se a mistura por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4100 x g por 60 min, o sobrenadante descartado e as amostras suspensas em 120 μ L de etanol 70% (v/v). Os tubos de microcentrifuga foram então homogeneizados por inversão, centrifugados a 4100 x g por 25 min e o sobrenadante novamente descartado. Após evaporação do etanol residual, as amostras de DNA foram ressuspensas em 12 μ L de água deionizada estéril, e as soluções obtidas dosadas em nanoDrop ND 1000.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems®) para o sequenciamento com o sequenciador automático ABI. As sequências foram analisadas utilizando-se os softwares PHPH (TOGAWA & BRÍGIDO, 2003), MEGA (versão 6.06 – TAMURA et al., 2013) e BLASTn (banco de dados nr) (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). A identificação no nível de espécie foi proposta para os isolados que apresentaram índices acima de 97% de similaridade com sequências de referência depositadas no GenBank. A identificação dos isolados que apresentaram estes índices com mais de uma espécie foi resolvida a partir da construção de dendogramas de distância nucleotídica pelo programa MEGA (versão 6.06), utilizando-se o método de

Neighbour-joining (modelo Tamura-Ney) (TAMURA et al., 2013) aliado à *Bootstrap* de 1000 reamostragens das sequências.

4.5 Análise do potencial de produção de fatores de crescimento vegetal

4.5.1 Padronização dos inóculos

Para a produção de inóculos, as bactérias das culturas estoque foram ativadas por esgotamento em placas contendo TSA e incubadas a 28°C por 48 h. Decorrido esse tempo, as colônias foram suspendidas com o auxílio de uma alça de repicagem em tubos de ensaio contendo 2 mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril, e a concentração de células foi padronizada da seguinte forma para cada experimento.

- Escala McFarland nº 1, equivalente a 3×10^8 UFC mL⁻¹, para os ensaios qualitativos de solubilização e mineralização de fosfato, e para os testes de antagonismo;
- Densidade óptica de 1,0, medida a 550 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV1800), equivalente a 3×10^8 UFC mL⁻¹, para os ensaios quantitativos de solubilização de fosfato inorgânico e produção de AIA;
- Densidade óptica de 0,5, medida a 550 nm em espectrofotômetro, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, para os ensaios quantitativos de mineralização de fosfato orgânico e produção de sideróforos.

4.5.2 Produção de Ácido 3-indol acético (AIA)

O potencial de produção de AIA pelos isolados endofíticos foi testado em meio líquido suplementado com 5 mM de DL-triptofano, mantido sob agitação, no escuro, à 28°C por 48 horas. Alíquotas de 40 µL foram semeadas das suspensões celulares padronizadas. Após o período de incubação, o meio foi centrifugado e o sobrenadante obtido utilizado para a quantificação da produção de AIA (NASSAR et al., 2005). As reações foram realizadas em microplacas de 96 poços. A mistura de reação, constituída de 100 µL de sobrenadante da cultura e 100 µL da solução reagente de Salkowski (2% de solução FeCl₃ 0,5 molL⁻¹ e 98% de solução de ácido perclórico a 35%) (GORDON & WEBER, 1951), foi mantida a temperatura e

luminosidade ambientes, por 30 minutos, e posteriormente a absorvância foi determinada a 530 nm, em leitor de ELISA (Varioskan™ Flash Multimode Reader). Como controle negativo, foi utilizado meio líquido estéril suplementado de triptofano no lugar do sobrenadante. Todas as amostras foram testadas em triplicata e analisadas a partir de uma curva-padrão construída com as leituras de absorvância de soluções de AIA comercial em concentrações entre 10 e 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que resultou em uma equação $f(x) = 0,0091x + 0,0966$ ($R^2 = 0,9902$), com o potencial de produção de AIA sendo expresso em termos de μg de AIA mL^{-1} (GORDON & WEBER, 1951).

4.5.3 Capacidade de solubilizar fosfato inorgânico

4.5.3.1 Seleção dos isolados capazes de solubilizar fosfato inorgânico

Para aferição do potencial dos isolados de solubilizar fosfato, os endofíticos foram cultivados em placas contendo o meio do National Botanical Research Institute (NBRIP) (glicose 10 g L^{-1} ; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g L^{-1} ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 g L^{-1} ; KCl 0,2 g L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g L^{-1} ; ágar 15 g L^{-1}), pH 7,0 (NAUTIYAL, 1999). Alíquotas de 5 μL dos pré-inóculos foram aplicadas sobre as placas, e estas foram incubadas por 72 horas a 28°C. O fosfato de cálcio se encontra predominantemente na forma insolúvel neste meio de cultivo, tornando-o turvo, de modo que as colônias que cresceram envolvidas por um halo claro foram consideradas positivas para a utilização de fosfato inorgânico, tendo sido selecionadas para a dosagem desta capacidade em meio líquido.

4.5.3.2 Ensaio quantitativo da capacidade de solubilizar fosfato pelos isolados

A partir das suspensões celulares padronizadas, 200 μL foram inoculados em tubos de penicilina contendo 10 mL de meio NBRIP sem adição de ágar, e estes foram mantidos sob agitação à 180 rpm e 28°C por 72 horas. Após este período, o meio foi centrifugado e o sobrenadante obtido utilizado para a medição de pH e para a confirmação e quantificação da habilidade de solubilização do fosfato, baseando-se na dosagem de fósforo inorgânico livre (Pi), segundo o método do azul de molibdênio, descrito por Murphy e Riley (1962) (NARSIAN et al, 2010; GHORBANI et al. 2012).

Os ensaios de quantificação foram inicialmente realizados em tubos de ensaio, onde as amostras foram diluídas em água deionizada para um volume final de 5 mL, no qual foi aplicado 1 mL da solução reagente, constituída de 50 mL de solução de H_2SO_4 2,5 mol L^{-1} , 15 mL de solução de molibdato de amônio 40 g L^{-1} , 30 mL de solução de ácido ascórbico 0,1 mol L^{-1} e 5 mL de solução de tartarato de potássio e antimônio 0,027 g L^{-1} . Destes tubos, 150 μL foram aplicados em placas de 96 poços, os quais foram mantidos por 30 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, a absorbância foi determinada a 880 nm em leitor de ELISA. Todas as amostras foram testadas em triplicata. Um branco foi feito utilizando a solução reagente e água deionizada. Curvas-padrão foram construídas com concentrações de 0 a 6 mg L^{-1} de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4).

4.5.4 Potencial de produção de enzimas fitases

O potencial de produção de fitases pelos isolados também foi analisado através de um teste qualitativo em meio sólido (RICHARDSON & HADOBAS, 1997). O meio de enriquecimento para a seleção de bactérias produtoras de fitases foi o Pikovskaya com modificações (OLIVEIRA et al., 2009), pH 7,0, que apresentava fitato de sódio (Na-IHP – ácido dodecassódico inositol-hexafosfórico) como única fonte de fósforo (Na-IHP 5 g L^{-1} ; glicose 10 g L^{-1} ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 g L^{-1} ; NaCl 0,2 g L^{-1} ; KCl 0,1 g L^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g L^{-1} ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,9 g L^{-1} ; MgCl_2 1,9 g L^{-1} ; traços de MnSO_4 e FeSO_4 (concentração final de 0,1mg L^{-1}) e ágar 15 g L^{-1}). Foram aplicados 5 μL da suspensão de células bacterianas nas placas, e estas foram incubadas por 72 horas a 28°C. As colônias que cresceram envolvidas por um halo translúcido foram consideradas positivas para a utilização de Na-IHP como única fonte de fósforo.

4.5.5 Potencial de produção de sideróforos

O ensaio qualitativo para detecção do potencial de produção de sideróforos pelos isolados foi o método colorimétrico de Schwyn e Neilands (1987), com modificações. Primeiramente, alíquotas de 20 μL das suspensões celulares foram inoculadas em 1 mL de caldo King B (proteose peptona 20 g L^{-1} ; K_2HPO_4 1,5 g L^{-1} ; MgSO_4 1,5 g L^{-1} ; glicerina 10 mL L^{-1}), pH 7,2, em placas de cultivo de 96 poços, à 28°C e 200 rpm por 24 horas. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas e 150

µl dos sobrenadantes foram adicionados ao mesmo volume de solução indicadora de Overlay, com modificações (7,5 mL de solução CAS – cromo azurol S 1,22 mg mL⁻¹; 1,5 mL de solução FeCl₃.6H₂O 270 mg L⁻¹ e HCl 0,84 mL /L; 25 mL de HDTMA 0,876 g L⁻¹; 50 mL de tampão succinato de sódio pH 5,6; água deionizada q.s.p. 100 mL), em microplacas de 96 poços. Após 10 a 20 min, a atividade de sideróforos foi analisada em ELISA medindo-se o decréscimo da absorvância do azul à 630 nm, e quantificada por comparação com curvas-padrão de EDTA com concentrações entre 0 e 25 mol L⁻¹ (GUAN et al., 2001, com modificações).

4.5.6 Antagonismo contra micro-organismos fitopatogênicos

4.5.6.1 Atividade anti-fúngica

O potencial de antagonismo dos endofíticos contra fungos fitopatógenos de milho foi avaliado pelo método de pareamento, que consiste no confronto direto do antagonista (endofítico) e do fungo patogênico em placas de Petri contendo meio de cultura sólido (MARIANO, 1993). Foram utilizados os fitopatógenos de milho *Colletotrichum graminicola* 03.10M e *Fusarium verticillioides* 193, gentilmente cedidos pela Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas – MG).

A partir das suspensões bacterianas padronizadas, foram efetuadas riscas sobre meio BDA (Himédia, Índia) em placa de Petri, semeando-se quatro bactérias por placa, distantes 1 cm da borda interna, formando um quadrado, porém com o cuidado para que as riscas não se encontrassem. Um cilindro de ágar de 5 mm contendo o micélio do patógeno previamente crescido em meio BDA à 28°C foi colocado no centro das placas e, após incubação a 28°C por 7 a 10 dias, foi analisada a presença de halos de inibição. Os testes foram realizados em duplicata e como controle foram montadas placas contendo apenas o patógeno em posição equivalente à das testemunhas (PILEGGI, 2006).

4.5.6.2 Atividade anti-bacteriana

Para aferição do potencial de antagonismo anti-bacteriano das bactérias endofíticas, foram preparados inóculos de maneira idêntica à realizada para os testes de atividade anti-fúngica. Paralelamente, linhagens bacterianas da fitopatógena gram-negativa de milho *Pantoea ananatis* 2103 e da bactéria gram-positiva *Bacillus subtilis* DSM 3258 foram cultivadas em caldo TSB (Himédia/Índia)

sob agitação de 180 rpm, à 28°C por 48 horas. Alíquotas de 5 µL das suspensões de endófitos foram inoculadas em placas de Petri contendo 20 mL de meio TSA e incubados à 28°C por 48h, e passado o período, as colônias obtidas foram mortas por exposição a uma atmosfera de clorofórmio por 40 minutos. A seguir, foram inoculados 0,1 mL da cultura crescida de cada bactéria reveladora em tubos contendo 3,5 mL de TSB acrescido de 0,7% de ágar fundido a 45°C, e esta mistura foi dispensada sobre as placas de Petri contendo as culturas de endófitos previamente mortas. Após 48h sob 28°C, foi observado se houve a formação de halos de inibição do crescimento das bactérias reveladoras sobre as colônias mortas de endófitos. A título de comparação, o potencial anti-bacteriano dos isolados foi calculado pela razão entre o diâmetro do halo de inibição e o diâmetro da colônia endofítica. Os testes foram realizados em duplicata. Como controle, foram preparadas placas contendo somente as bactérias reveladoras.

A linhagem de *P. ananatis* 2103 foi gentilmente cedida pela Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas – MG), e a linhagem de *B. subtilis* DSM 3258 pela Prof^a Dra. Regina Maria Nardi Drummont, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.5.7 Análises estatísticas da densidade de isolados endofíticos e de produção de fatores de crescimento vegetal

Os testes de Qui-quadrado para as diferentes análises de frequência de isolados no isolamento e nos ensaios de produção de fatores de crescimento foram realizadas no programa Microsoft Office Excel (RIBEIRO JÚNIOR, 2011).

As variáveis de densidade e produção de fatores de crescimento vegetal foram avaliadas quanto aos critérios de homogeneidade da variância (teste de Levene; LEVENE 1960) e de normalidade da distribuição dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk; SHAPIRO & WILK 1965) através do programa R (R CORE TEAM, 2014). Todas as variáveis de densidade de isolados e produção de fatores de crescimento vegetal foram consideradas não paramétricas e sofreram transformação Box-Cox com o objetivo de torná-las normalmente distribuídas (BOX & COX, 1964). As variáveis normalizadas e não-normais foram representadas em Diagramas de caixa (*box-plots*, APÊNDICE B).

Para analisar o efeito dos tratamentos de adubação fosfatada e das partes da planta (seiva, folhas e raízes) na densidade de isolados e produção de fatores de crescimento vegetal, Modelos Lineares Generalizados (MLG) foram utilizados com auxílio do programa R, versão 3.0.3 (R CORE TEAM, 2014). Primeiramente, MLGs foram gerados para analisar os potenciais preditores das densidades e diferentes fatores de crescimento. Em uma segunda etapa, modelos mais complexos foram criados, onde o ajuste dos modelos individuais é reportado utilizando-se a proporção de desvio explicado (desvio – 2 x log da verossimilhança maximizado; porcentagem do desvio explicado = $(100 - \text{desvio nulo} / \text{desvio residual}) \times 100$). O melhor preditor ou combinações de preditores selecionados de cada categoria foram incluídos em um modelo de combinações multipreditorial. A seleção dos modelos baseado em suas complexidades foram avaliadas utilizando-se do Critério de Informação Akaike (AIC), que incorpora o log da verossimilhança maximizado do modelo e um termo que penaliza os modelos de maiores complexidades (CRAWLEY, 2013). A seleção dos modelos é então baseada no ΔAIC , que é a diferença entre o AIC do modelo de interesse e o AIC do melhor modelo de ajustamento (CRAWLEY, 2013). Todos os MLGs foram conferidos por análises residuais para avaliação da adequação da distribuição de erros, tendo sido aceito o modelo de mínima significância.

O agrupamento dos dados de densidade bacteriana e taxas de produção de fatores de crescimento vegetal pelo método de *clustering* K-means também foi realizado utilizando-se o programa R (R CORE TEAM, 2014).

Os testes de médias Skott-Knott e Tukey para os dados de produção de fatores de crescimento vegetal e atividade antagonista, foram realizados através do software Assistat, versão 7.7 (SILVA & DE AZEVEDO, 2002).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento das bactérias endofíticas

As densidades de bactérias endofíticas foram computadas para cada parte analisada das plantas de milho (i.e., folhas, raízes e seiva), e os valores obtidos apresentados na Tabela 1.

Tabela 2: Densidades médias de bactérias endofíticas de milho observadas em cada uma das regiões morfológicas da planta e dos tratamentos avaliados.

	Densidade média Log(UFC/g)		
	Adubação fosfatada	Sem adubação	Média
Seiva	4,23±0,30	4,15±0,33	4,19
Folhas	5,20±0,61	5,52±0,78	5,38
Raízes	5,79±0,59	5,65±0,82	5,73
Média	5,42	5,42	5,42

Valores representam médias \pm desvio padrão de nove plantas para cada tratamento, exceto para os isolados de seiva, onde os valores representam as médias de três amostras compostas da seiva recolhida das plantas de cada bloco amostral.

A média geral foi de $2,64 \times 10^5$ (5,42 Log) UFC por g ou mL de amostra das partes da planta. Embora esses valores possam variar consideravelmente de acordo com fatores como espécie vegetal, clima e saúde da planta, observa-se que, de modo geral, as densidades encontradas neste trabalho são semelhantes aos valores médios de densidades encontradas em grande parte de outras publicações, inclusive trabalhos de inoculação de isolados endofíticos em plantas cultivadas no campo ou em condições laboratoriais (MCINROY & KLOEPPER, 1995; SOBRAL, 2003; VAN OVERBEEK & VAN ELSAS, 2008; HARDOIM et al., 2012; MA et al., 2013). Zienniel e colaboradores (2002) isolaram e computaram as densidades de bactérias endofíticas de quatro cultivares agrícolas, incluindo o milho, e 27 espécies de plantas das pradarias norte americanas e, embora não tenham especificado as densidades bacterianas obtidas em cada uma das plantas, os autores relataram que os valores variaram entre 0 e $6 \log_{10}$ UFC/g de amostra vegetal. Os autores também selecionaram alguns dos isolados de milho e sorgo e analisaram sua capacidade de recolonizar suas hospedeiras em estufa e em campo, recuperando posteriormente densidades microbianas entre 3,4 e $6,1 \log_{10}$ UFC/g por períodos de até 78 dias.

Para avaliar se as variações de densidades bacterianas foram significativas entre os tratamentos de adubação fosfatada (presença e ausência) e entre as partes da planta utilizadas para o isolamento das bactérias (seiva, folhas e raízes), foram utilizados Modelos Lineares Generalizados (MLGs) (Tabela 2). De modo geral, é possível observar que a densidade de bactérias endofíticas não sofreu efeito da adubação fosfatada ($p= 0,851$), mas variou com a parte da planta ($p = 0,002$). As maiores densidades foram observadas nas raízes, seguidas pelas folhas e seivas (Figuras 1 e 2).

Tabela 3: Resultados da aplicação de Modelos Lineares Generalizados (MLG) com erros gama e funções de ligação identidade para avaliar possíveis associações entre adubação fosfatada e partes da planta de milho (folha, raiz e seiva) na variação de densidade das suas comunidades de bactérias endofíticas associadas.

Hipótese	Graus de liberdade (G.L.)	Desvio residual	G.L. do resíduo	Desvio	Pr(>Chi)	AIC
Nulidade			41	0,325		74,97
Fosfato	1	0,0002	40	0,325	0,851	
Parte	2	0,077	38	0,247	0,002	

Dados originais normalizados por Box-Cox. Modelos de seleção se encontram no apêndice B.

Cluster -1			Cluster -2			Cluster -3		
4400		33100	348000		2452000	54000		286533
Fosfatado	Não fosfatado		Fosfatado	Não fosfatado		Fosfatado	Não fosfatado	
8	10		4	5		9	6	
Raízes	Folhas	Seiva	Raízes	Folhas	Seiva	Raízes	Folhas	Seiva
5	7	6	6	3	0	7	8	0

Figura 1: Representações esquemáticas desenhadas a partir dos dados de agrupamento pelo método de k-means. Números superiores, em cor destacada, indicam a amplitude da densidade bacteriana (UFC por g ou mL de amostra) em cada agrupamento. Demais números indicam a frequência de densidades encontradas para cada tratamento e parte da planta, por *cluster*. Densidade no Cluster 1 < Cluster 3 < Cluster 2.

Variações da densidade bacteriana entre as diferentes partes de uma planta já foram descritas por outros autores (COMPANT et al., 2010; HEINHOLD-HUREK & HUREK, 2011). No estudo realizado por Sobral (2003) focado na análise das

comunidades de bactérias endofíticas de soja (*Glycine max*), foi observado que a densidade de bactérias variou não somente entre as partes da planta, tendo sido maior nas raízes, seguida por caules e folhas, como também entre os estágios de desenvolvimento da planta (vegetativo, florescimento e maturação). Estas observações suportam a hipótese de que os micro-organismos endofíticos apresentam uma trama de derivações fisiológicas com especificidades funcionais que os permitem colonizar os diferentes nichos da endosfera das plantas de maneira diferenciada (BAIS et al., 2006; HARDOIM et al., 2008; SESSITSCH et al., 2012).

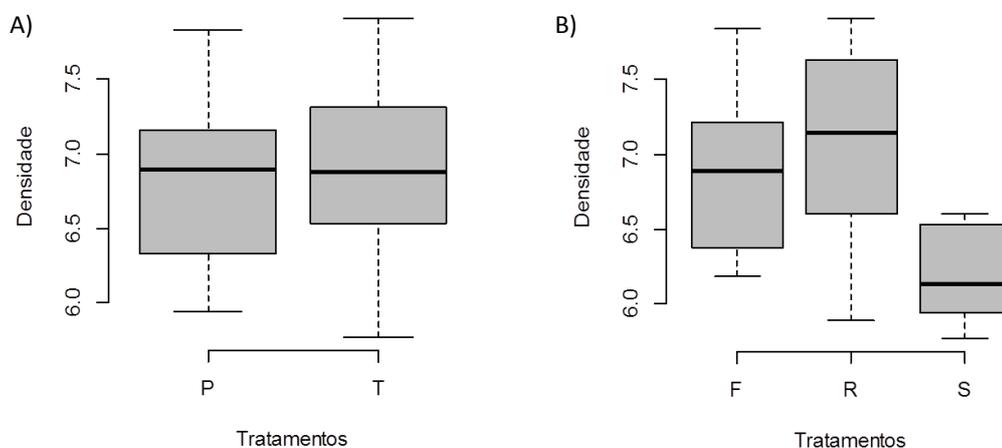


Figura 2: Comportamento da variável densidade normalizada via transformação Box-Cox. A) Tratamentos de adubação fosfatada (T – adubação fosfatada; P – sem adubação fosfatada) e B) Partes da planta (F – folhas; R – raízes; S – seiva). A mediana (linha grossa), o erro padrão (caixa cinza) e o desvio padrão (linhas tracejadas) são representados.

O solo tem sido considerado a principal fonte de bactérias endofíticas e as raízes a principal porta de entrada para sua colonização (HARDOIM, 2011; REINHOLD-HUREK & HUREK, 2011), o que pode explicar a maior densidade bacteriana associada a esse habitat. As fontes de colonização de micro-organismos das partes aéreas da planta, por outro lado, são mais pontuais, como a transmissão por insetos ou herança vertical desde o estágio de semente, além da disseminação da microbiota endorrízica via sistema vascular (HARDOIM, 2011). Por sua vez, a colonização do sistema vascular parece se dar principalmente pelos vasos xilemáticos da planta, que fornecem uma via contínua à propagação microbiana através das perfurações dos elementos traqueais. Esta via requer produção de enzimas hidrolíticas dos componentes de parede celular vegetal apenas durante as etapas iniciais de colonização deste sistema (COMPANT et al., 2011). Talvez pelas

condições osmóticas e nutritivas da seiva bruta do xilema, relativamente pobre em compostos orgânicos, a capacidade de colonização permanente deste nicho pelas bactérias seja mais restrita.

Por outro lado, a ausência de efeito de fatores ambientais, como a adubação fosfatada, sobre a densidade de bactérias endofíticas de uma planta também tem sido observada por diversos autores. Laheurte e Berthelin (1988) relataram que a exposição de mudas de milho a diferentes concentrações de fósforo solúvel (entre 0 e 25 p.p.m.) não afetavam a capacidade da bactéria *Enterobacter agglomerans* colonizar a rizosfera de mudas de milho. No trabalho anteriormente mencionado, Sobral (2003) também relatou que os fatores cultivar de soja, variação sazonal de colheita e aplicação do herbicida glifosato não apresentaram efeito sobre as densidades de bactérias endofíticas, porém apresentaram efeito sobre sua diversidade. Isso sugere que diversos fatores ambientais, como a adubação fosfatada, podem afetar as densidades populacionais de diferentes grupos sem alteração da densidade total, o que poderia inclusive ter reflexo sobre a diversidade fenotípica de produção de fatores de crescimento vegetal pelos isolados.

5.2. Identificação molecular das bactérias endofíticas

Devido ao grande número de isolados obtidos a partir das plantas de milho, foram selecionados 178 isolados, sendo 33 provenientes da seiva, 65 das folhas e 80 das raízes. Desse total, 84 foram provenientes de plantas do tratamento que recebeu adubação fosfatada e 94 daquelas que não receberam adubação fosfatada. Como critério de seleção foram utilizadas as características macro morfológicas das colônias.

Do total de isolados, 132 foram identificados pelo menos no nível de gênero a partir do sequenciamento de regiões do gene rDNA 16S, e outros dois isolados foram identificados no nível de família (Apêndice C). Dez gêneros apresentaram pelo menos um isolado para o qual não foi possível aferir a identificação no nível de espécie: *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Leuconostoc*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Serratia* e *Staphylococcus*. Os gêneros *Serratia* e *Staphylococcus*, assim como alguns isolados de outros gêneros, apresentaram dois isolados cada com problemas devido à qualidade do produto de extração e/ou purificação do DNA total ou das PCRs, apresentando sequências de

boa qualidade menores que 400 pares de base. Assim, a repetição do processo de sequenciamento para estes isolados pode resolver o problema. Porém, a dificuldade de identificação da maioria dos isolados se deu pela alta similaridade (maior que 97%) infragenérica da sequência parcial do rDNA 16S dos isolados e linhagens de referência relacionadas. Embora a técnica de sequenciamento do gene rDNA 16S seja muito útil em trabalhos de classificação bacteriana, para várias bactérias ela apresenta baixo poder discriminatório no nível de espécie e também para alguns gêneros (JANDA & ABBOTT, 2007). Nestes casos, a resolução das espécies requer a análise da sequência de outros genes conservados do genoma bacteriano e/ou outras técnicas analíticas.

Dos 27 isolados do gênero *Microbacterium* encontrados, 18 não puderam ter sua espécie identificada pela técnica de sequenciamento parcial do rDNA 16S. Diversos autores têm sugerido o uso de técnicas como hibridização DNA-DNA, métodos bioquímicos e utilização de outros marcadores moleculares, como as subunidades B da DNA girase (*gyrB*) e da RNA-polimerase (*rpoB*) para a resolução da identificação de diversas espécies do grupo, já que os níveis de similaridade entre as sequência de rDNA 16S de suas espécies muitas vezes está na faixa de 98-99%, podendo ser tão alta quanto 99,9%, como relatado para as espécies *M. oxydans* e *M. luteolum* (SCHUMANN et al., 1999; KRISHNAMURTHI et al., 2012). Análises bioquímicas do peptídeoglicano e sistema de quinonas também podem ser de grande valia durante a identificação de espécies deste grupo, pois espécies deste gênero contêm a estrutura do peptídeoglicano contendo lisina (B1 α ou B1 β) ou ornitina (B2 α ou B2 β) e sistemas de quinonas, principalmente, do tipo MK-10 e MK-11, MK-11 e MK-12, MK-12, MK-12 e MK-13 ou MK-13 E MK-14. Esta variação é incomum, visto que estes dois marcadores são considerados altamente conservados e diferenças deste nível entre espécies de um mesmo gênero raramente são observadas (BUCZOLITS et al., 2008).

Cinco dos 18 isolados de *Bacillus* deste trabalho também não puderam ter sua identificação resolvida no nível de espécie. De fato, comumente os índices de similaridade das sequencias do gene rDNA 16S entre as espécies deste gênero superam a marca de 97%, particularmente entre os grupos *Cereus* e *Subtilis*, cuja taxonomia ainda não foi completamente elucidada (QI et al., 2001; SATOMI et al., 2006; JANDA & ABBOTT, 2007). Além de *Microbacterium* e *Bacillus*, *Pseudomonas*,

Enterobacter e *Pantoea* também apresentam citações recorrentes na literatura por tal motivo (JANDA & ABBOTT, 2007; BODILIS et al., 2012; MOHAMED et al., 2013).

Quanto aos dois isolados que tiveram sua identificação resolvida apenas no nível de família, ambos foram identificados como Enterobacteriaceae, apresentando sequências do gene rDNA 16S com 99% de similaridade com espécies dos gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella* (Figura 3). Este fato tem sido observado por outros autores, e dentre as famílias descritas para as quais não foi possível discriminar os gêneros, usando como marcador o gene rDNA 16S, a Enterobacteriaceae está entre as mais recorrentes (JANDA & ABBOTT, 2007). Os motivos variam entre indisponibilidade de sequências específicas de um taxon nos bancos de dados consultados, alto grau de conservação intergenérica na sequência do rDNA 16S, ocorrência de novas espécies, dentre outros (MIGNARD & FLANDROIS, 2006; JANDA & ABBOTT, 2007).

A análise de sequenciamento da região rDNA 16S do isolado FP2A-32 o agrupou com a Proteobacteria *Pantoea ananatis* e o Bacteroidetes *Flavobacterium acidificum*, e de fato, a literatura confirma essa inesperada afiliação de *F. acidificum* e a família Enterobacteriaceae, com índice de 99,9% de similaridade da região rDNA 16S com a bactéria *P. ananatis* (PARTE, 2013 – LPSN).

Dentre as bactérias identificadas, houve uma predominância de isolados gram-positivos, com 94 isolados (70,1%), contra apenas 40 gram-negativos (29,9%, tabela 2). Em folhas, a proporção de bactérias gram-positivas encontradas foi de 76,4% e em seiva, de 82,1%, ao passo que nas raízes essa proporção foi bem menor, de 57%. Grönemeyer e colaboradores (2012) relataram que dos 14 isolados endofíticos obtidos de raízes de variedades de milho nativas da Namíbia, dez eram gram-positivos, identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Microbacterium*, *Brevibacillus* e *Curtobacterium*. Zinniel e colaboradores (2002) também observaram uma maior proporção de bactérias gram-positivas (164 isolados) em relação a gram-negativas (136 isolados) entre os isolados endofíticos das partes aéreas de plantas de milho. Assim como no presente trabalho, também foi observado uma maior frequência dos gêneros *Microbacterium* e *Bacillus* entre os isolados. Por outro lado, também há relatos de autores que encontraram uma maior proporção de bactérias endofíticas gram-negativas entre os isolados de uma planta. Pereira e Castro (2014) isolaram 56 bactérias endofíticas de raízes e partes aéreas de milho, e constataram que mais de 90% da microbiota das raízes era composta

por bactérias gram-negativas, principalmente Alpha e Gammaproteobacteria, embora nas partes aéreas da planta 53% dos isolados eram gram-positivos.

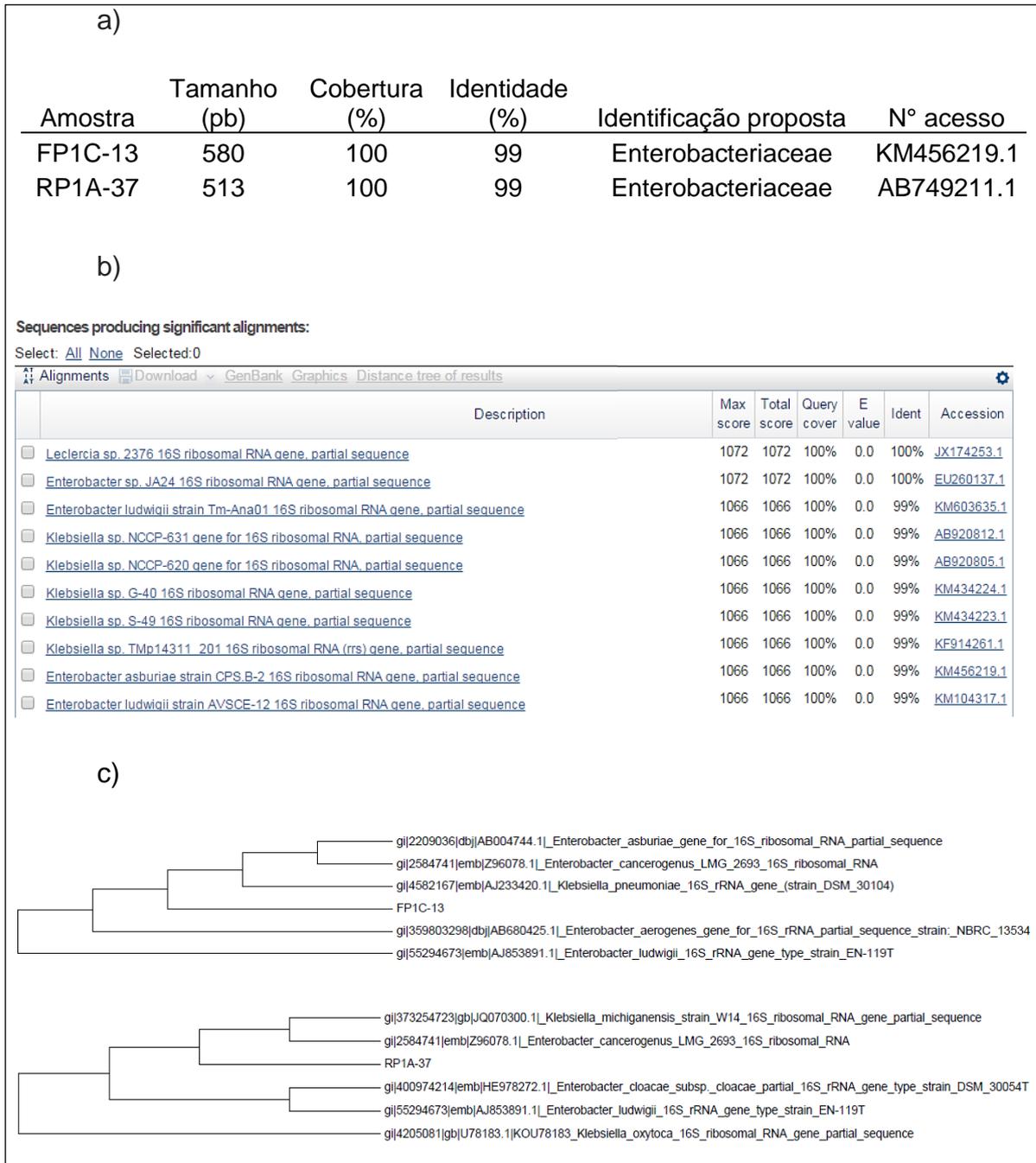


Figura 3: a) Identificações proposta para os isolados FP1C-13 e FP1A-37. b) Resultados do BLASTn (banco de dados nr), das seqüências de 580 pares de base do gene rDNA 16S do isolado FP1C-13. c) Dendrogramas de distância nucleotídica utilizando as seqüências dos isolados FP1C-13 e RP1A-37 e as seqüências depositadas no GenBank de linhagens de referência filogeneticamente próximas.

Os isolados gram-positivos encontrados foram distribuídos entre os filos Actinobacteria, com 45 isolados, e Firmicutes, com 49, ao passo que dos 40 isolados gram-negativos encontrados, 39 foram Proteobacteria, e um isolado, o RT3B-41 (*Flavobacterium acidificum*), foi um Bacteroidetes. Também pôde ser destacado que das 39 proteobactérias encontradas, 36 eram Gammaproteobacteria. Os outros dois isolados foram duas Alphaproteobacteria (*Agrobacterium tumefaciens* ST2-19; *Rhizobium pusense* RP3B-211) e uma Betaproteobacteria (*Alcaligenes faecalis* FT2C-13).

Das 45 actinobactérias encontradas neste trabalho, apenas cinco foram isoladas das raízes de milho, com as demais distribuídas entre os isolados de seiva (19 isolados) e folhas (21). Por outro lado, apenas quatro dos 49 firmicutes e cinco das 39 proteobactérias foram isolados da seiva. Os demais Firmicutes foram encontrados de maneira equivalente entre os isolados de folhas (21 isolados) e raízes (24). As proteobactérias, por outro lado, se concentraram principalmente nas raízes, com 21 isolados, e 13 isolados encontrados nas folhas. Pereira e Castro (2014) também encontraram uma maior proporção de actinobactérias nas folhas e de proteobactérias nas raízes de milho, embora neste trabalho a frequência total de firmicutes encontrados pelos autores foi extremamente baixa em relação ao presente trabalho (3%) e a de proteobactérias nas raízes extremamente alta (86%). Já Grönemeyer e colaboradores (2013) também observaram que a maior parte dos isolados endofíticos de raízes de milho (43%) pertenciam ao filo Firmicutes, seguido por Proteobacteria (36%) e Actinobacteria (21%).

A maior diversidade de famílias foi encontrada nos filos Firmicutes (6 famílias) e Proteobacteria (5). Os 46 isolados de firmicutes se distribuíram entre as famílias Bacillaceae (20 isolados), Staphylococcaceae (11), Streptococcaceae (8), Leuconostacaceae (4), Paenibacillaceae (2) e Enterococcaceae (1), enquanto as 39 proteobactérias foram agrupados nas famílias Enterobacteriaceae (22), Pseudomonadaceae (11), Moraxellaceae (4), Rhizobiaceae (2) e Alcaligenaceae (1) (Tabela 3). Já 36 dos 45 isolados de Actinobacteria pertenciam a família das Microbacteriaceae, enquanto os demais pertenciam às famílias Micrococcaceae (7) e Nocardiaceae (2) (Tabela 3).

Ao todo, foram identificadas 43 espécies, pertencentes a 27 gêneros, sendo os mais frequentes *Microbacterium* (27 isolados), *Bacillus* (18), *Staphylococcus* (12), *Pseudomonas* (11), *Lactococcus* (nove), *Curtobacterium* (sete), *Enterobacter* (sete),

Serratia e *Pantoea* (cinco isolados cada), e *Psychrobacter*, *Leuconostoc* e *Arthrobacter* (quatro isolados cada). Foram encontrados ainda dois isolados de *Exiguobacterium*, *Kocuria*, *Paenibacillus*, *Pseudoclavibacter* e *Rhodococcus*, e um isolado de *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Leucobacter*, *Micrococcus*, *Obesumbacterium* e *Rhizobium* (Apêndice C). Todos esses gêneros já foram observados como componentes da microbiota endofítica de diversas plantas, incluindo o milho, bem como outros ambientes associados à plantas, como solo rizosférico e superfície epifítica, ou ainda na condição de fitopatógeno (CHANWAY, 1998; SOBRAL, 2003; FERREIRA et al., 2008; THOMAS & SOLY, 2009; HARDOIM, 2011; SUN et al., 2013; PEREIRA & CASTRO, 2014; ABRAHAM et al., 2015; SWARNALATHA et al., 2015).

Tabela 4: Grupos taxonômicos encontrados entre os isolados identificados pelo sequenciamento de regiões do gene rDNA16S.

Gram-positivas (94)							
Filo (frequência)	Actinobacteria (45)			Firmicutes (49)			
	Folhas (21)	Seiva (19)	Raízes (5)	Folha (21)	Seiva (4)	Raiz (24)	
Família (frequência)							
		Microbacteriaceae (36)			Bacillaceae (22)		
		Micrococcaceae (7)			Enterococcaceae (1)		
		Nocardiaceae (2)			Leuconostocaceae (4)		
					Paenibacillaceae (2)		
					Staphylococcaceae (12)		
				Streptococcaceae (8)			
Gram-negativas (40)							
Filo (frequência)	Proteobacteria (39)			Bacteroidetes (1)			
	Folhas (13)	Seiva (5)	Raízes (21)	Raízes (1)			
Família (frequência)							
		Alcaligenaceae (1)			Flavobacteriaceae (1)		
		Enterobacteriaceae (21)					
		Moraxellaceae (4)					
		Pseudomonadaceae (11)					
	Rhizobiaceae (2)						

Porém, comparando-se diferentes trabalhos realizados com bactérias endofíticas de milho em todo o mundo, juntamente com os dados de isolamento deste trabalho, observa-se que existe uma grande variação entre a riqueza de espécies encontradas (ZINNIEL et al., 2002; MONTAÑEZ et al., 2009; OROLE & ADEJUMO, 2011; PEREIRA & CASTRO (2014). Essa variação é esperada e

justifica-se pelo fato de grande parte da microbiota endofítica das plantas ter origem do ambiente, principalmente do solo, e não por transferência horizontal desde o estágio de semente (JONSTHON-MONJE & RAIZADA, 2011), tal como reforçado em estudo de Rashid e colaboradores (2012), que demonstraram que plantas de tomate de mesma origem parental semeadas em solos oriundos de diferentes partes do mundo apresentavam microbiotas bacterianas endofíticas distintas.

Dos 27 isolados de seiva identificados, 19 foram classificados como Acinobacteria, dos quais 16 pertencem ao gênero *Microbacterium*. Este gênero é frequentemente isolado de solos, água, ar, fungos, plantas e humanos, tendo importância biotecnológica e na área de saúde relatada quanto à produção de biossurfactantes, degradação de óleos crus, degradação de xilana, promoção de crescimento vegetal, patogenicidade humana, dentre outros (LAFFINEUR et al., 2003; KIM et al., 2005; SCHIPPERS et al., 2005; ANISZEWSKY et al., 2010; LIN et al., 2012). Apenas dois *Microbacterium* foram isolados das raízes de milho, e nove foram isolados das folhas.

Além de *Microbacterium*, a microbiota das folhas apresentou uma alta frequência de bactérias gram-positivas dos gêneros *Staphylococcus* (9 isolados), *Curtobacterium* e *Lactococcus* (7 isolados cada). Nesta parte da planta, os gêneros *Pantoea* (4 isolados) e *Psychrobacter* (3 isolados) foram os principais representantes gram-negativos. Os isolados de *Staphylococcus* foram identificados como *S. epidermidis* e *S. warneri*, ambas espécies associadas a patologias humanas (NUNES et al., 2006). Os isolados de *Pantoea* foram identificados como *P. ananatis*, espécie já descrita como causadora de doenças em diversas culturas agrícolas de di e monocotiledôneas, incluindo o milho, e *P. vagans*, uma bactéria comercialmente registrada como agente de controle biológico de uma doença de macieiras e pereiras causada pela bactéria *Erwinia amylovora* (COUTINHO & VENTER, 2009; SMITS et al., 2010). Nenhum dos isolados de *Curtobacterium* sp. foi identificado no nível de espécie, mas sabe-se que pelo menos a espécie *C. flaccumfaciens* apresenta potencial fitopatogênico (VALENTINI et al., 2010). Como um dos pré-requisitos legislativos para que um micro-organismo possa ser utilizado como bioinoculante em culturas agrícolas é que este não apresente potencial patogênico à plantas ou humanos, faz-se necessário que estes isolados sejam identificados no nível de espécie.

Em raízes, os gêneros predominantes foram os gram-positivos *Bacillus* (11 isolados) e *Leuconostoc* (4 isolados), e os gram-negativos *Enterobacter* (6 isolados), *Pseudomonas* (7 isolados) e *Serratia* (5 isolados). Dois dos *Leuconostoc* foram identificados como *L. pseudomesenteroides*, principal bactéria ácido-láctica utilizada na produção de chucrute, embora também esteja relacionada a doenças nosocomiais (BARRANGOU et al., 2002; BOU et al., 2008).

Do ponto de vista do potencial biotecnológico de uso como promotor de crescimento vegetal, a identificação no nível de espécie também é necessária aos isolados de *Enterobacter*, pois muitas de suas espécies apresentam potencial patogênico, o que poderia limitar sua aplicação como bioinoculantes de plantas (KANG et al., 2012). Todos os cinco isolados de *Serratia* foram isolados das raízes, dos quais três foram identificados como *S. marcescens*, outra bactéria frequentemente relacionada à doenças nosocomiais (HEJAZI & FALKINER, 1997) e doenças fitopatogênicas (GILLIS et al., 2014; WANG et al., 2015).

5.3. Produção de fatores de crescimento vegetal

5.3.1. Produção de Ácido 3-indol acético (AIA)

Os ensaios quantitativos para avaliação do potencial dos isolados de produzirem moléculas auxínicas foram realizados em meio líquido suplementado do aminoácido triptofano e expressos em $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$ de meio. Observou-se que dos 178 isolados avaliados, 101 (56,7%) apresentaram essa capacidade com produção variando entre 4,45 e 111,22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figuras 5 e 6; apêndice F.1).

A frequência de isolados positivos para a produção de AIA em relação aos isolados totais por parte da planta foi maior entre os isolados provenientes da seiva, não diferindo entre os isolados de folhas e raízes (Teste do χ^2 , $p = 0,05$; Apêndice D.6 e D.8). A frequência de isolados produtores de AIA também foi menor dentre o isolados provenientes das plantas que receberam adubação fosfatada (Teste do χ^2 , $p = 0,05$; Apêndice D.7).

Para avaliar se as variações nos padrões (níveis) de produção de AIA dos isolados foram significativas entre os tratamentos de presença e ausência de adubação fosfatada e entre as partes da planta utilizadas para o isolamento das bactérias (seiva, folhas e raízes), foram utilizados MLGs (Tabela 4). A análise indicou que as variações encontradas nos níveis de produção de AIA se devem à

interação entre o efeito das partes da planta e tratamento fosfatado ($p = 0,0002$), sendo que as partes da planta apresentaram uma contribuição maior para este efeito que o tratamento de adubação fosfatada ($p = 0,024$) (Tabela 4). Os maiores níveis de produção de AIA foram observados nos isolados provenientes da seiva, seguidos pelos isolados da folha e raiz (Figura 4). Por sua vez, a adubação fosfatada teve um efeito positivo no perfil de produção de AIA, sendo que houve predomínio de isolados com maiores níveis de produção deste hormônio nas amostras que receberam adubação fosfatada (T) (Figura 4).

Tabela 5: Resultados da aplicação de Modelos Lineares Generalizados com erros gama e funções de ligação identidade para avaliar possíveis associações entre adubação fosfatada e partes da planta de milho (folha, raiz e seiva) na variação das taxas de produção de AIA pelos isolados endofíticos.

Hipótese e modelo	Graus de liberdade	Desvio residual	G.L. do resíduo	Desvio	Pr(>Chi)	AIC
Nulidade			296	30.3890		1074.5
Fosfato	1	0.4202	295	29.9690	0.0240	
Parte	2	3.9927	293	25.9760	0.0000	
Fosfato:Parte	2	1.4296	291	24.5470	0.0002	

Dados originais normalizados por Box-Cox. Modelos de seleção se encontram no apêndice B.

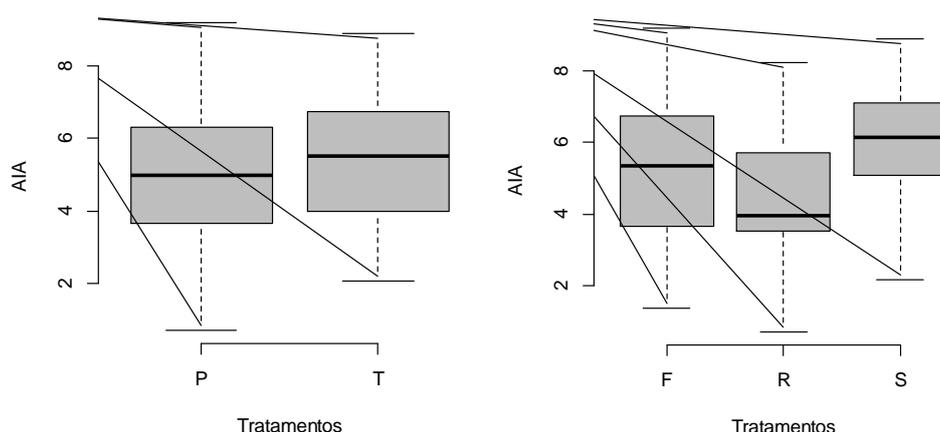
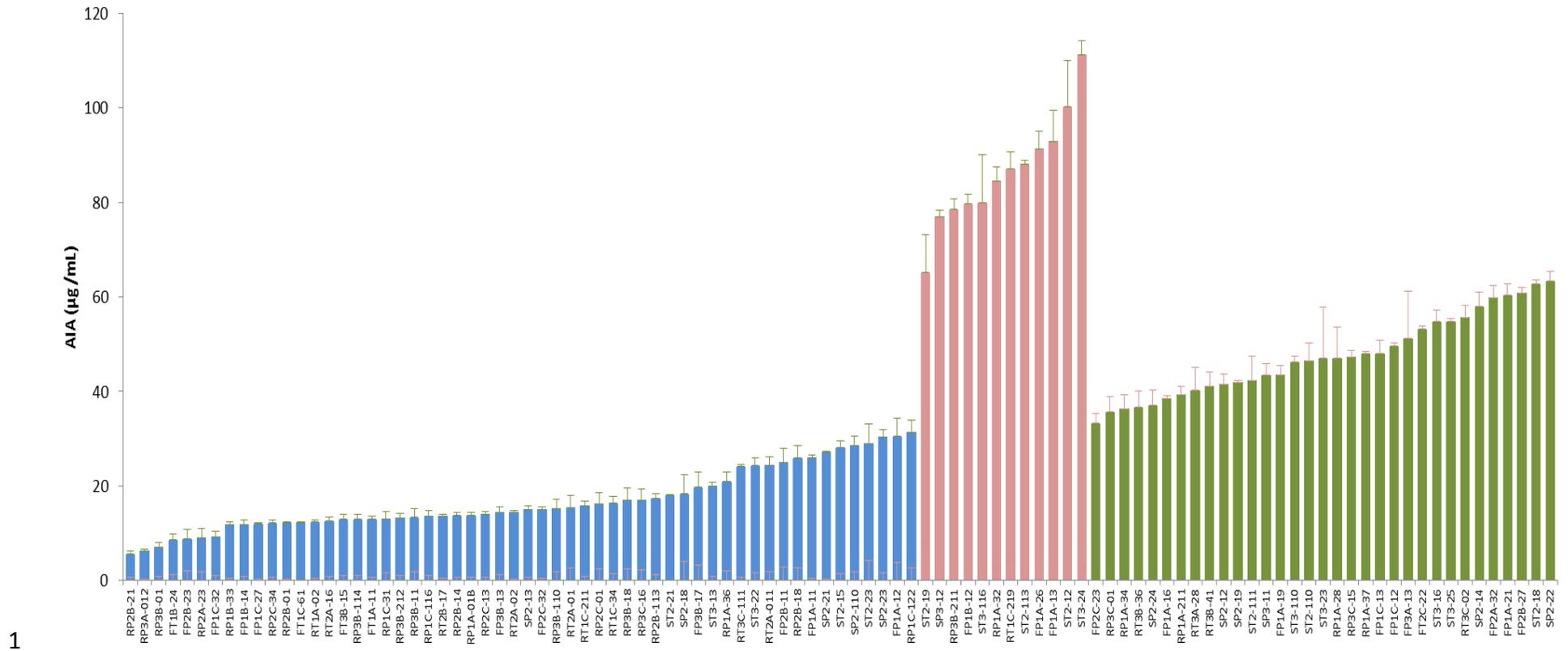


Figura 4: Representações *Box-plots* das taxas de produção de ácido indol acético (AIA - $\mu\text{g}/\text{mL}$) e suas repostas aos tratamentos de adubação fosfatada e partes da planta. Tratamentos: T – adubação fosfatada; P – sem adubação fosfatada. Partes da planta: F – folhas; R – raízes; S – seiva. Dados originais transformados por Box-Cox. As linhas grossas representam as medianas, as caixas os erros-padrões e as linhas tracejadas os desvios-padrões.



2 **Figura 5:** Valores de produção de AIA pelos isolados endofíticos. Colunas azuis indicam os isolados do *cluster 1*, em vermelho os isolados do
3 *cluster 2*, em verde os isolados do *cluster 3* e barras os desvios-padrões. Médias de três repetições.

Procedeu-se também o agrupamento dos isolados de acordo com seus níveis de produção de AIA (Figura 6; apêndice E.2). Os isolados foram particionados em 3 *clusters* pela análise de *K-means*: *cluster 1* (4,45 a 31,3 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$), *cluster 2* (65,13-111,22 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) e *cluster 3* (33,3 a 63,36 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$). A distribuição dos isolados de seiva nos três *clusters* foi mais homogênea quando comparado aos isolados das folhas e raízes. O número de isolados de folhas no *cluster 2* dos melhores produtores de AIA foi baixo (3 isolados), e os isolados de raízes se concentraram principalmente no *cluster 1* dos produtores de índices mais baixos. Os isolados do tratamento sem adubação fosfatada também se concentraram no *cluster 1* dos produtores de AIA menos efetivos, embora a análise dos diagramas de caixa sugere que esta impressão esteja relacionada ao maior desvio-padrão das taxas de produção de AIA dos isolados provenientes do tratamento sem adubação fosfatada (Figura 5).

Cluster -1			Cluster -2			Cluster -3					
4,45		31,33		65,13		111,22		33,29		63,36	
T		P		T		P		T		P	
18		38		6		6		12		21	
R	F	S		R	F	S		R	F	S	
32	14	10		3	3	6		10	10	13	

Figura 6: Representações esquemáticas desenhadas a partir dos dados de agrupamento pelo método de k-means. Números superiores, em cor destacada, indicam as faixas de produção de AIA ($\mu\text{g/mL}$). Demais números indicam a frequência de isolados encontrados para cada tratamento e parte da planta, por *cluster*. Taxas de produção de AIA do *cluster 1* < *cluster 3* < *cluster 2*.

Em estudo realizado por Sobral (2003), com foco na caracterização qualitativa da capacidade de produção de AIA de 373 bactérias endofíticas isoladas de caules, folhas e raízes de soja, não foi observado efeito de nenhuma das partes da planta sobre a frequência de isolados produtores de AIA. Baseado na literatura científica é difícil compreender o significado biológico do efeito positivo da seiva sobre a frequência de bactérias produtoras de AIA e suas taxas de produção. Mas, algumas considerações podem ser feitas em relação ao efeito negativo do sítio raízes e ausência de adubação no

nível de produção de AIA pelos isolados bacterianos. Sabe-se que uma das respostas das plantas a uma condição de maior escassez de fósforo é o estímulo da produção de raízes, de modo a permiti-las explorar melhor o ambiente em que estão crescendo (VANCE et al., 2011). Contudo, uma das maneiras de se inibir o alongamento das raízes é justamente pela exposição deste órgão a elevadas dosagens de AIA (EVANS et al., 1994). Assim, talvez uma das maneiras utilizadas pelas plantas na modulação de sua microbiota nas diferentes partes das plantas esteja relacionada à habilidade desta de produzir moléculas do tipo AIA. Estudos adicionais são necessários para comprovar a veracidade desta teoria. Porém, no contexto biotecnológico, o fato dos isolados provenientes das plantas do tratamento não fosfatado e os das raízes terem uma menor média de produção de AIA pode ser considerado um fator positivo, visando uma futura aplicação agrícola destes isolados, já que uma maior produção de raízes pelas plantas implica em maior capacidade destas de assimilar os nutrientes e água do solo, acarretando em maiores índices de crescimento e produtividade.

Dentre os 101 isolados positivos identificados para a produção de AIA foram observados 16 gêneros (32 espécies), sendo os mais frequentes *Microbacterium* (19 isolados), *Pseudomonas* (10 isolados), *Bacillus* (8), *Enterobacter* (6), e *Curtobacterium*, *Serratia* e *Pantoea*, com 5 isolados cada. Estes gêneros já foram descritos na literatura como produtores de AIA e para alguns deles, como *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Pantoea*, dentre outros menos frequentes, a capacidade de promover crescimento vegetal pôde ser comprovadamente atribuída à produção de auxinas (SPAEPEN et al., 2008; JOHNSTON-MOJE & RAZADA, 2011; MONTAÑEZ et al., 2012; NAVEED et al., 2014; SUAREZ et al., 2014).

Variações intragenéricas de produção de AIA foram observadas em todos os gêneros neste trabalho (Apêndice F.1), ficando, por exemplo, entre 5,5 e 102,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados de *Bacillus*, 10,7 e 76,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados de *Microbacterium* e 7,3 e 111,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os isolados de *Pseudomonas*. Este padrão de variações intragenéricas na produção de AIA já foi relatado em outros estudos (MONTANEZ et al., 2012; RESENDE, 2014), tal como encontrado por Rashid e colaboradores (2014) que apresentaram índices

de produção entre 22 e 76,1 μg de AIA mL^{-1} para *Bacillus*, 96 e 143,3 μg de mL^{-1} para *Microbacterium* e 34 e 39,9 μg de AIA mL^{-1} para *Pseudomonas*. Neste trabalho, com exceção de dois dos cinco isolados de *Bacillus*, todos os demais conferiram aumentos no alongamento de raízes de mudas de canola.

Doze isolados se destacaram na produção de AIA (Figura 4), sendo dois do gênero *Pseudomonas* (isolados ST3-24 e RT1C-219), um *Bacillus gibsonii* (FP1A-26), uma *Agrobacterium tumefaciens* (ST2-19), um *Microbacterium laevaniformans* (SP3-12), um *Curtobacterium* (FP1B-12), um *Rhizobium* (RP3B-211) e outros cinco isolados não identificados (ST2-12, ST2-113, ST3-116, FP1A-13 e RP1A-32), mostrando que esta característica está associada a um grande número de gêneros bacterianos. De fato, 16 diferentes gêneros foram encontrados entre os isolados positivos para a produção de AIA, e todos estes merecem atenção em relação ao potencial de promover crescimento vegetal, já que diversos trabalhos têm demonstrado que mesmo micro-organismos com baixas taxas de produção desse hormônio podem ser bons promotores de crescimento vegetal quando analisados *in vivo* (NASSAR et al., 2005; FARIA et al., 2013; NAVEED et al., 2014b). Em trabalho com bactérias diazotróficas endofíticas de milho e seu potencial como promotoras de crescimento vegetal, Montañez e colaboradores (2012) relataram que não foi observada relação direta entre o nível de produção de AIA de seus isolados e a capacidade destes de promover crescimento de plantas de milho inoculadas, além de respostas distintas terem sido observadas quando os isolados foram testados em variedades diferentes de milho. No estudo, um isolado de *P. fluorescens*, que produziu 56,4 μg de AIA mL^{-1} , foi o único dentre os testados capaz de estimular o alongamento radicular de sementes de milho inoculadas. Por outro lado, quando este e outro isolado de *P. fluorescens* com índices ainda maiores de produção de AIA (130,7 μg AIA mL^{-1}) foram inoculados em duas variedades de milho, cada uma das bactérias foi capaz de estimular a produção de biomassa aérea de apenas uma das variedades de milho testadas. Esta resposta diferenciada da planta aos inoculantes pode ser explicada pela produção de outros fatores promotores de crescimento além da produção de AIA, bem como pela capacidade do micro-organismo de melhor modular o ambiente fisiológico interno da planta para o seu próprio

desenvolvimento. Naveed e colaboradores (2014a) observaram que o isolado *Enterobacter* sp. FD17, caracterizado por apresentar baixos níveis de produção de AIA em meio suplementado com L-triptofano ($12,3 \mu\text{g AIA mL}^{-1}$), apresentou os melhores índices de solubilização de fosfatos dentre os isolados testados, o que parece ter refletido nos aumentos de até 40% na taxa de germinação de sementes de milho, 42% na produção de biomassa, 9% na eficiência fotossintética e ainda antecipar o período de florescimento em até 10 dias.

5.3.2. Capacidade de solubilizar fosfato inorgânico

A capacidade dos isolados de solubilizar fosfatos inorgânicos foi inicialmente analisada em meio sólido, onde os isolados positivos identificados pela presença de halos translúcidos de solubilização em torno das colônias foram avaliados quantitativamente quanto a capacidade de solubilizarem fosfato de cálcio em meio líquido.

Dos 178 isolados avaliados, 55 (30,9%) foram selecionados em meio sólido e tiveram sua capacidade de solubilizar fosfato de cálcio quantificada em meio líquido. Os índices de solubilização do fosfato de cálcio variaram entre $10,28$ e $526,88 \mu\text{g P}_i \text{ mL}^{-1}$, tendo sido agrupado em três *clusters* (Apêndice E.3): *cluster 1* – isolados que apresentaram os menores índices de solubilização de fosfato inorgânico, entre $10,3$ e $194,7 \mu\text{g P}_i \text{ mL}^{-1}$; *cluster 2* – isolados que apresentaram os maiores índices de solubilização, entre $393,1$ e $526,9 \mu\text{g P}_i \text{ mL}^{-1}$; e *cluster 3* – isolados com índices intermediários de solubilização, entre $197,9$ e $363,6 \mu\text{g P}_i \text{ mL}^{-1}$ (Figura 7). Estes valores são equivalentes ou superiores a índices relatados para bactérias solubilizadoras de fosfato na literatura. No trabalho realizado por Bakhshandeh e colaboradores (2014), o potencial de solubilização de fosfato de 52 rizobactérias isoladas de arroz sob diferentes condições de estresse foi avaliado em condições próximas a do presente trabalho (meio líquido Pikovskaya, 100 rpm, e 28°C por cinco dias). Os maiores índices de solubilização de fosfato de cálcio encontrados foram de $263 \mu\text{g mL}^{-1}$, inferiores aos observados para alguns dos isolados do *cluster 3* e isolados do *Cluster 2*.

Em outro trabalho, com rizobactérias isoladas de araucária (*Araucaria angustifolia*), Ribeiro (2010) relatou que os valores de solubilização de fosfato de cálcio de 27 de seus isolados variou entre 57 e cerca de 450 $\mu\text{g Pi mL}^{-1}$ de meio NBRIP, ou seja, índices próximos ao deste trabalho.

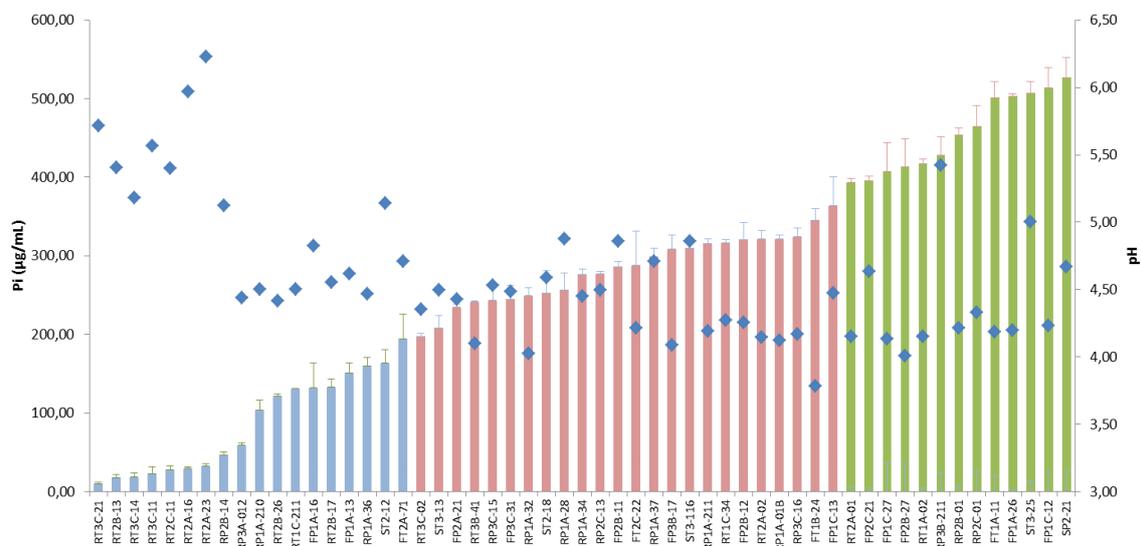


Figura 7: Valores de solubilização de fosfato e pH no meio NBRIP conferidos pelos isolados endofíticos. Colunas azuis indicam os isolados do *cluster* 1, em vermelho os isolados do *cluster* 3, em verde os isolados do *cluster* 2, barras os desvios-padrões e os pontos azuis indicam os valores de pH. Médias de três repetições.

Analisando-se os isolados separadamente em relação a sua origem de isolamento, observou-se que não houve alteração na frequência dos isolados solubilizadores em relação aos isolados totais para cada parte do milho avaliada (teste do χ^2 , $p > 0,05$ – Apêndice D.4), sendo que 32 foram obtidos das raízes de milho, 17 foram isolados das folhas e seis foram isolados da seiva do milho. Em consonância com esses dados, Sobral (2003) também relatou que a frequência de isolados endofíticos de soja (*Glycine max*) solubilizadores de fosfato era estatisticamente idêntica à dos isolados totais de folhas, caules e raízes obtidos.

O tratamento de adubação fosfatada também não apresentou efeito sobre a frequência dos isolados solubilizadores de fosfato (Teste do χ^2 , $p > 0,05$, apêndices D.5 e 6), sendo que dos 55 isolados positivos para este

ensaio, 25 foram isolados das plantas do tratamento fosfatado e 30 do tratamento não fosfatado. A análise dos MLGs (tabela 6, apêndice B), no entanto, indicou que tanto o tratamento de adubação fosfatada quanto as partes da planta (seiva, folhas e raízes) apresentaram efeito significativo sobre os níveis de solubilização de fosfato ($p = 6,81 \times 10^{-6}$ e $p = 1,44 \times 10^{-11}$, respectivamente), sendo que a interação entre os dois preditores foi o modelo que melhor explicou as variações observadas ($p = 0,03$). Tanto a adubação fosfatada quanto o sítio raiz exerceram um efeito negativo sobre as taxas de solubilização de fosfato inorgânico dos isolados, tal como pode ser visualizado pelos diagramas de caixa (Figura 9), assim como pelos agrupamentos de *k-means* (Figura 8).

Tabela 6: Resultados da aplicação de Modelos Lineares Generalizados (GL) com erros gama e funções de ligação identidade para avaliar possíveis associações entre adubação fosfatada e partes da planta de milho (folha, raiz e seiva) sobre as variações das taxas de solubilização de fosfato de cálcio pelos isolados endofíticos.

Hipóteses e modelo	Graus de liberdade	Desvio residual	G.L. do resíduo	Desvio	Pr (>Chi)	AIC
Nulidade			158	14,340		1074,1
Fosfato	1	1,267	157	13,072	6,81E-06	
Parte	2	3,125	155	9,947	1,44E-11	
Fosfato:Parte	2	0,411	153	9,536	0,037	

Dados originais normalizados por Box-Cox. Modelos de seleção se encontram no apêndice B.

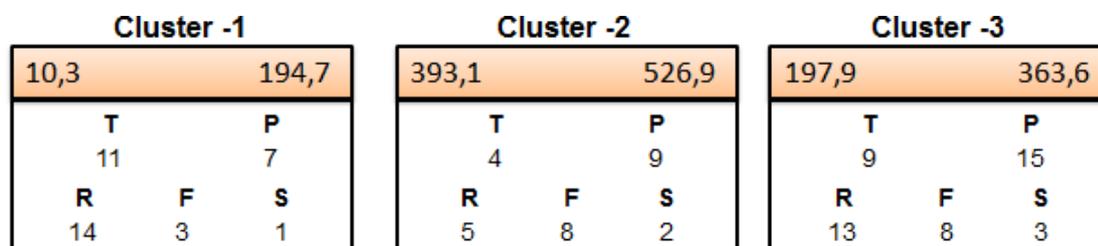


Figura 8: Representações esquemáticas desenhadas a partir dos dados de agrupamento pelo método de *k-means*. Números superiores, em cor destacada, indicam as faixas de solubilização de fosfato de cálcio ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Demais números indicam a frequência de isolados encontrados para cada tratamento e parte da planta, por *cluster*. Taxas de produção de AIA do *cluster* 1 < *cluster* 3 < *cluster* 2.

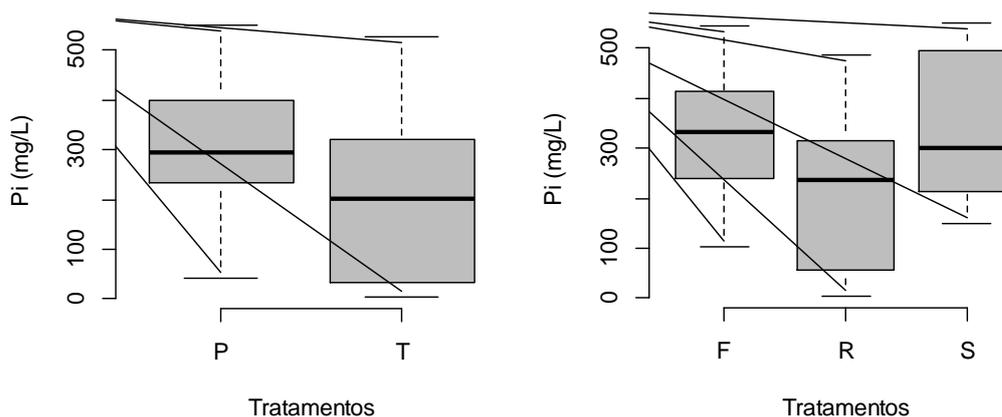


Figura 9: Comportamento da variável solubilização de fosfato inorgânico normalizada via transformação Box-Cox por A) Tratamentos de adubação fosfatada (T – adubação fosfatada; P – sem adubação fosfatada) e B) Partes da planta (F – folhas; R – raízes; S – seiva). A mediana (linha grossa), o erro padrão (caixa cinza) e o desvio padrão (linhas tracejadas) estão representados.

O efeito da adubação fosfatada sobre a capacidade de bactérias solubilizadoras de fosfato promoverem crescimento vegetal de suas hospedeiras tem sido avaliado em alguns poucos trabalhos, tal como no estudo *in vivo* de Laheurte e Berthelin (1988), cujos resultados embasam o efeito negativo da adubação fosfatada sobre a atividade solubilizadora de fosfato dos isolados deste trabalho. Os autores relataram que a capacidade de promover o crescimento da parte aérea de mudas de milho pela rizobactéria *Enterobacter agglomerans* sob diferentes concentrações de fósforo solúvel (entre 0 e 25 ppm) só era significativa entre 5 e 15 ppm de fósforo, assim como a 5 ppm para a produção de raízes (gramas de massa seca). Os autores concluíram que sob condições de alta disponibilidade fósforo (20, 25 ppm), o crescimento das plântulas pareceu atingir sua máxima eficiência, não sofrendo mais efeitos da atividade da bactéria solubilizadora. Igualmente, pode-se concluir que sob condições de maior disponibilidade de fósforo, o estímulo metabólico e pressão seletiva para apresentar atividade solubilizadora pela própria bactéria também é menor.

A literatura consultada não nos dá muitas pistas em relação aos possíveis efeitos das partes da planta sobre a atividade solubilizadora de fosfato dos isolados. Lira-Cadete e colaboradores (2012) analisaram em meio sólido o potencial solubilizador de 42 bactérias diazotróficas endofíticas de

folhas e raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), agrupando seus isolados em três *clusters* de acordo com sua eficácia em solubilizar fosfato de cálcio (medida dos halos de solubilização). Assim como neste trabalho, os autores também relataram uma maior frequência de isolados de raízes entre os *clusters* de menores índices de solubilização. Especificamente, nenhum dos isolados de raízes foi agrupado no *cluster* dos melhores solubilizadores de fosfato. Taurian e colaboradores (2010), por outro lado, observaram que, de maneira geral, bactérias endofíticas solubilizadoras de fosfato das raízes de amendoins (*Arachis hypogaea*) apresentaram halos de solubilização de fosfato tricálcico maiores que as bactérias isoladas das folhas. Possivelmente, outros fatores interferentes podem estar relacionados ao efeito distinto observado pelas partes da planta neste último trabalho, como o fato deste se dar com microbiota de uma dicotiledônea fixadora de nitrogênio, ao passo que tanto o milho quanto a cana-de-açúcar são membros da família Poaceae.

Dos 55 isolados solubilizadores de fosfato deste trabalho, 22 foram identificados no nível de espécie, 13 no nível de gênero e dois no nível de família. *Serratia marcescens* foi a única espécie recorrente, com três isolados, todos do grupo dos 13 melhores solubilizadores de fosfato de cálcio (agrupamento de *k-means* – apêndice E.3). Outro gênero bem representado foi o *Bacillus*, com seis isolados, e embora cinco destes tenham apresentado baixos índices de solubilização (incluídos no *cluster* 1 – apêndice E.3), um deles, *B. gibsonii* FP1A-26, foi um dos cinco melhores solubilizadores de fosfato (teste de Scott-Knott, $p < 0,05$), juntamente com *Microbacterium testaceum* SP2-21, o único representante solubilizador do gênero. Outros gêneros recorrentes foram *Pantoea* e *Enterobacter* (quatro isolados cada), *Pseudomonas* (três isolados), e *Curtobacterium* e *Staphylococcus* (dois isolados cada), todos frequentemente citados em trabalhos de prospecção de bactérias solubilizadoras de fosfato (INUI, 2009; JOHNSTON-MOJE & RAIZADA, 2011; BHATTACHARYYA & JHA, 2012; SOWMYA et al., 2013; NAVEED et al., 2014; BAKHSHANDEH et al., 2014). No trabalho de Bakhshandeh e colaboradores (2014), citado no início deste capítulo, das 55 bactérias solubilizadoras de fosfato descritas procedeu-se a identificação molecular das três melhores, as quais foram identificadas como *Pantoea*

ananatis ($172 \mu\text{g Pi mL}^{-1}$) e *Enterobacter sp.* ($254 \mu\text{g Pi mL}^{-1}$), além de uma *Rahnella aquatilis* ($263 \mu\text{g Pi mL}^{-1}$), gênero não encontrado neste trabalho.

Sabe-se que a capacidade dos micro-organismos de solubilizarem fosfatos inorgânicos está relacionada principalmente a sua habilidade de diminuir os valores de pH do meio, tanto por extrusão direta de íons H^+ como pela capacidade de produzir ácidos orgânicos, sendo sua eficácia atribuída aos diferentes tipos e combinações de ácidos que são produzidos e liberados, dentre os quais se destacam os ácidos cítrico, glucônico, propiônico, láctico e succínico (CHEN et al., 2006). Para verificar se a redução do pH poderia ter contribuído para a solubilização de fosfato de cálcio pelas bactérias em estudo, procedeu-se a aferição do pH do meio NBRIP ao fim do período de incubação das bactérias. Os valores de pH dos meios de cultura líquidos variaram entre 6,23 e 3,78. Foi observada uma correlação inversa entre os níveis de solubilização de fosfato de cálcio e os valores de pH ($r_s = -0,56$; $p = 4,75 \times 10^{-15}$) (Figura 10).

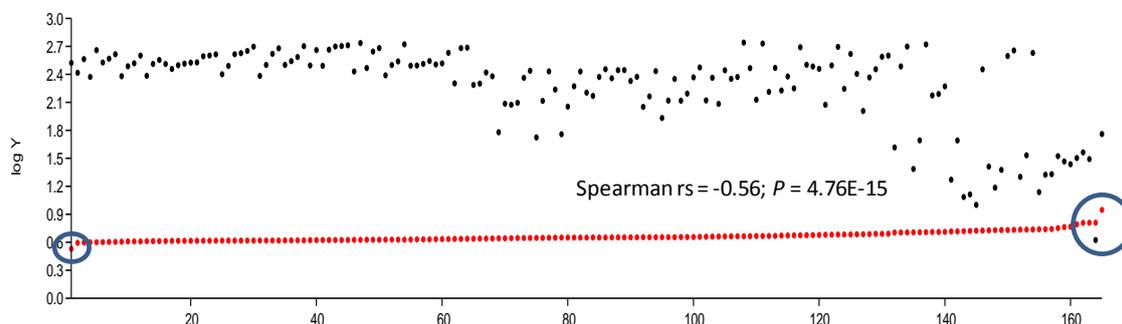


Figura 10: Comportamento das variáveis taxas de fosfato solubilizado ($\mu\text{g Pi /mL}$) e pH (vermelho) via correlação de Spearman. Valores discrepantes são destacados.

Os isolados também foram agrupados pelo método de *k-means* em quatro *clusters* em relação aos fatores solubilização de fosfato inorgânico e redução de pH do meio (Figura 11). É possível observar que os isolados dos *clusters* 1 e 2, de fato, apresentaram reduzidas taxas de solubilização de fosfato inorgânico. Por exemplo, *Bacillus sp.* RT3C-21, que apresentou o menor índice de solubilização de fosfato dentre os isolados positivos ($10,28 \mu\text{g Pi /mL}$), também teve constatado o segundo maior valor de pH no meio de

cultura ao término deste ensaio (pH 5,71), enquanto *B. gibsonii* FP1A-26, que apresentou uma das maiores reduções no pH do meio NBRIP (de 6,5 para 4,2), também apresentou um dos maiores índices de solubilização de fosfato (503,49 $\mu\text{g P}_i$ /mL).

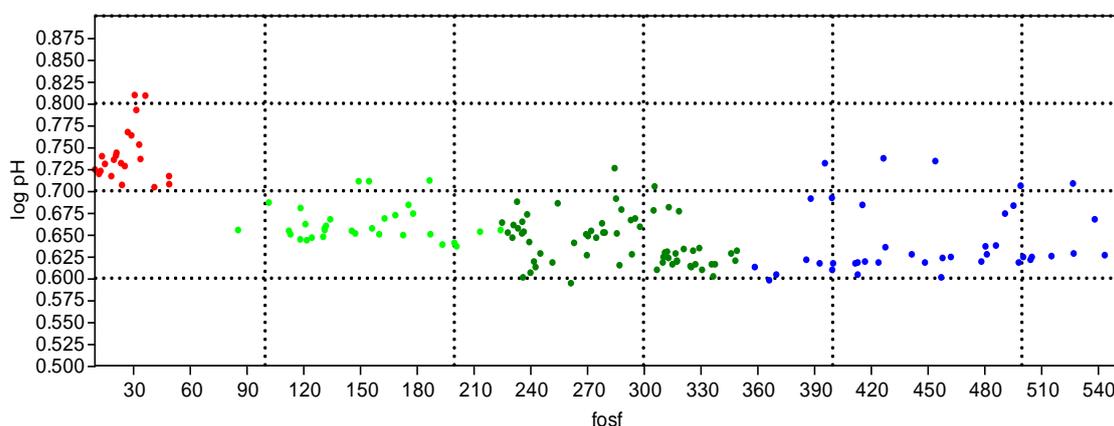


Figura 11: Relação entre os índices de solubilização de fosfato ($\mu\text{g P}_i$ /mL) e pH das culturas dos isolados endofíticos. As cores dos pontos indicam *clusters k-means* dos isolados agrupados de acordo com as duas variáveis (Apêndice E.6). Cluster 1 (vermelho) – 10 a 49,3 $\mu\text{g P}_i$ /mL; cluster 2 (verde claro) – 85,7 a 224,4 $\mu\text{g P}_i$ /mL; cluster 3 (verde escuro) – 225,2 a 349,4 $\mu\text{g P}_i$ /mL; cluster 4 (azul) – 358,8 a 550,7 $\mu\text{g P}_i$ /mL.

Este padrão já foi descrito na literatura por outros autores. Kim e colaboradoras (1997) observaram que a gradual solubilização de hidroxiapatita (um fosfato de cálcio cristalino) ao longo do tempo pela bactéria *Rahnella aquatilis* era acompanhada de um decréscimo de pH do meio inversamente proporcional a liberação de P_i . A mesma correlação também foi observada por Bakhshandeh e colaboradores (2014) com dois isolados de *Pantoea ananatis* e *Enterobacter sp.*, crescidas em meio Pikovskaya com fosfato de cálcio como única fonte de fósforo.

O gráfico da figura 11 também sugere que a capacidade de reduzir o pH do ambiente é limitada a partir de certo ponto, não variando muito entre os *cluster 4* e *3*, e mesmo em relação ao *cluster 2*. Provavelmente outros fatores, como a combinação de ácidos orgânicos liberados pelos isolados, possam afetar a eficácia dos isolados em solubilizar fosfato (CHEN et al., 2006).

5.3.3. Mineralização de fitato

Em média, 50% do teor de fósforo dos solos está complexado a composto orgânicos, principalmente na forma de inositolis fosfatos (fitatos), que são moléculas bioindisponíveis para assimilação pelas plantas (RAGHOTHAMA, 1999; OLIVEIRA et al, 2009). A atividade de enzimas fitases representa a principal forma de liberação dessa fonte de fósforo, em um processo denominado mineralização do fitato, produzindo ortofosfatos (HPO_4^{-2} e $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$) que podem ser assimilados pelas plantas. Sabe-se que a maior parte das enzimas fosfatases encontradas nos solos, incluindo as fitases, tem origem microbiana (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999).

Dessa forma, no presente trabalho foi analisado, qualitativamente, o potencial dos isolados endofíticos de milho de mineralizarem fitato de sódio em meio sólido suplementado com essa substância como única fonte de fósforo. Os resultados positivos foram evidenciados pela formação de um halo translúcido em torno das colônias (figura 12).

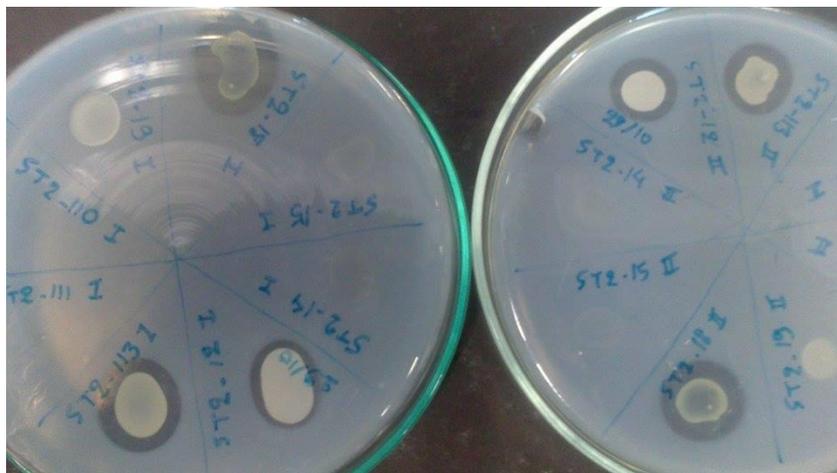


Figura 12: Isolados mineralizadores de fitato evidenciados pela formação de um halo translúcido em torno das colônias.

No total, 74 isolados (41,6%) mineralizadores de fosfato foram encontrados nesse ensaio, sendo sete isolados provenientes da seiva de milho, 15 provenientes de folhas e 52 das raízes (Apêndice F.4). Houve uma maior

proporção de isolados mineralizadores de fitato das raízes que das folhas e seiva de milho (teste do χ^2 , $p < 0,01$; apêndice D.14 e 16). Isto pode ser considerada uma característica relevante para o desenvolvimento da planta hospedeira. Estudos prévios mostram que a capacidade de micro-organismos endofíticos de disponibilizarem fósforo e promoverem o crescimento de plantas está atrelado ao início do processo de colonização (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999; VERMA et al., 2001), já que a fonte de fósforo deve ser absorvida pelas raízes das plantas, que por sua vez é a principal fonte de colonização endofítica (HARDOIM, 2011).

Os tratamentos de adubação fosfatada e não fosfatada, por sua vez, não apresentaram efeito sobre a densidade de bactérias mineralizadoras de fitato, tendo sido observados 38 isolados do tratamento fosfatado e 36 do não fosfatado (teste do χ^2 , $p > 0,05$; apêndice D.15).

O número de isolados mineralizadores de fósforo foi maior que o de isolados solubilizadores de fósforo de cálcio, o que não implica, porém, que todos esses mesmos isolados possam apresentar atividade relevante em ensaios quantitativos em meio líquido. Sabe-se que a autoclavagem do meio de cultura pode acabar hidrolisando uma parte do fitato de sódio, liberando certa quantidade de fósforo inorgânico que pode reagir com os íons de cálcio presentes no meio. Assim, o crescimento e formação dos halos translúcidos no meio opaco pode se dar simplesmente pela utilização de fósforo de cálcio precipitado, e não pela degradação enzimática do fitato de sódio (FREDRIKSON et al., 2002). Apenas oito dos 55 isolados solubilizadores de fósforo inorgânico não foram capazes de mineralizar fitato, enquanto o oposto se deu para 28 isolados mineralizadores de fitato.

Quanto a identificação dos isolados mineralizadores de fitato encontrados, 44 isolados puderam ser agrupados em 16 gêneros, dos quais os mais frequentes foram *Bacillus* (8 isolados), *Pseudomonas* (7), *Pantoea*, *Serratia* e *Enterobacter* (5 isolados cada), *Arthrobacter* (3), *Leuconostoc* e *Paenibacillus* (2 isolados cada) (Figura 13). Para todos esses gêneros foram encontrados relatos de atividade mineralizadora de fitato (SHEDOVA et al., 2008; WEYENS et al., 2009; OH et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; RIBEIRO,

2010), inclusive com habilidade promotora de crescimento vegetal atribuída a essa capacidade. Idriss e colaboradores (2002) observaram que filtrados do sobrenadante da bactéria mineralizadora de fitato *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 eram capazes de promover o crescimento radicular de plântulas de milho em condições com fitato como única fonte de fósforo. Os autores também demonstraram que o sobrenadante de culturas de *Bacillus subtilis* expressando o gene clonado da fitase de FZB45 também era capaz de estimular o crescimento de plântulas de milho, e o mesmo não era observado com o sobrenadante de FZB45 com o gene da fitase nocauteado, indicando que de fato, a promoção do crescimento nas plântulas de milho estava se dando devido a atividade das enzimas fitases produzidas pelo *B. amyloliquefaciens* FZB45.

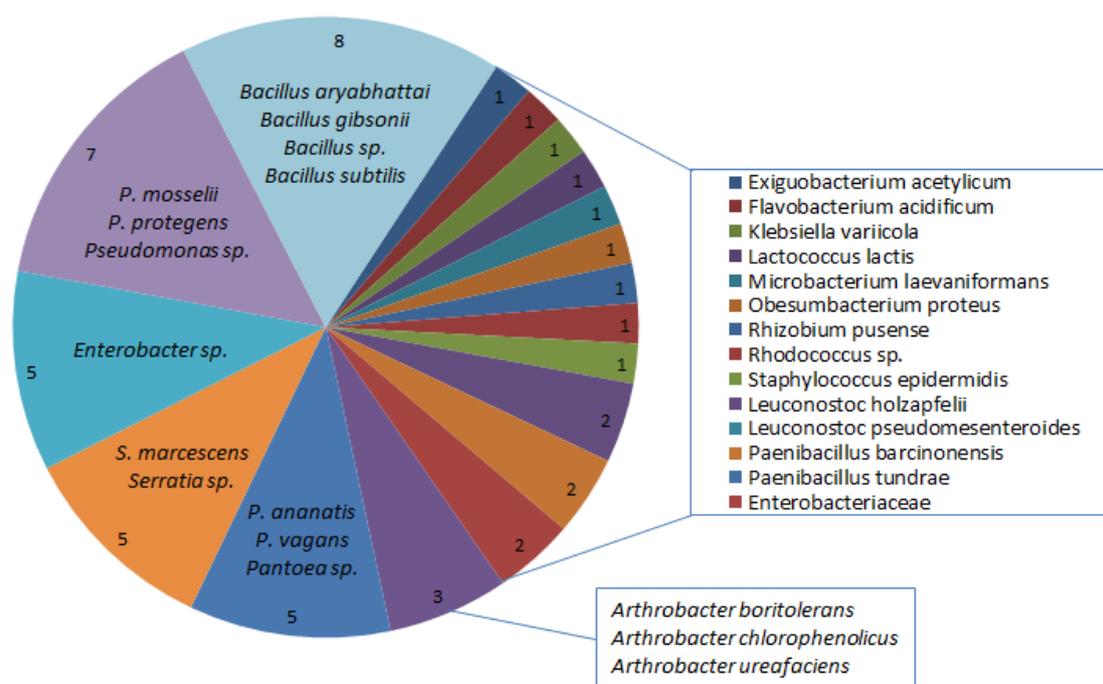


Figura 13: Frequência de gêneros encontrados dos isolados endofíticos mineralizadores de fitato de sódio. Espécies encontradas também são indicadas.

5.3.4. Produção de sideróforos

Além de fósforo, outro elemento frequentemente limitante ao crescimento das plantas é o ferro, pois em geral este se encontra em formas

bastante insolúveis na solução do solo (NEILANDS, 1984). Um dos principais mecanismos das plantas de sequestrar o ferro bioindisponível do solo é pela produção de sideróforos, moléculas com afinidade por esses íons metálicos. Sabe-se que a produção de sideróforos pela microbiota associada às plantas pode otimizar a captação de ferro pelas mesmas, além de poder suprimir o desenvolvimento de micro-organismos fitopatogênicos (CAO et al., 2004; RADZKI et al., 2013).

Neste trabalho, o potencial de produção de sideróforos foi avaliado para os isolados de seiva e folhas de milho em meio KB pobre em Fe, e a quantificação da atividade foi estimada em unidades milimolares equivalentes de EDTA (Eq. EDTA), um composto orgânico, utilizado na construção da curva padrão, que apresenta atividade quelante com diversos íons metálicos, incluindo íons Fe (II) e (III). Foi observado que 41 (42,7% do total de isolados de folhas e seiva) bactérias endofíticas apresentaram produção de sideróforos, tendo sido 27 isoladas das folhas e 14 isoladas da seiva de milho, com produção variando entre 0,40 e 7,45 Eq. EDTA (Apêndice F.4). Os isolados foram agrupados em três *clusters* (método de *k-means*) quanto à produção de sideróforos, e do total, oito se destacaram, apresentando índices de produção entre 4,76 e 7,45 Eq. EDTA (Figuras 14 e 15).

Os dados de frequência de isolamento de bactérias endofíticas produtoras de sideróforos na literatura são variados. Jonshton-Monje e Raizada (2011) analisaram o potencial de 91 bactérias endofíticas de sementes de milho de produzirem fatores de crescimento vegetal, e constataram que apenas cinco de seus isolados apresentaram produção de sideróforos, incluindo três bactérias dos gêneros *Pantoea* e *Pseudomonas*, também encontrados neste trabalho. Por outro lado, também trabalhando com bactérias endofíticas de milho, Pereira e Castro (2014) relataram que todas as 39 bactérias endofíticas isoladas de milho apresentaram produção de sideróforos em meio sólido. Diversos fatores além da disponibilidade de ferro no ambiente podem afetar a produção dessas moléculas. No trabalho de Castro e Pereira (2014), por exemplo, a produção de sideróforos provavelmente foi estimulada pela presença de metais pesados na área de cultivo das plantas.

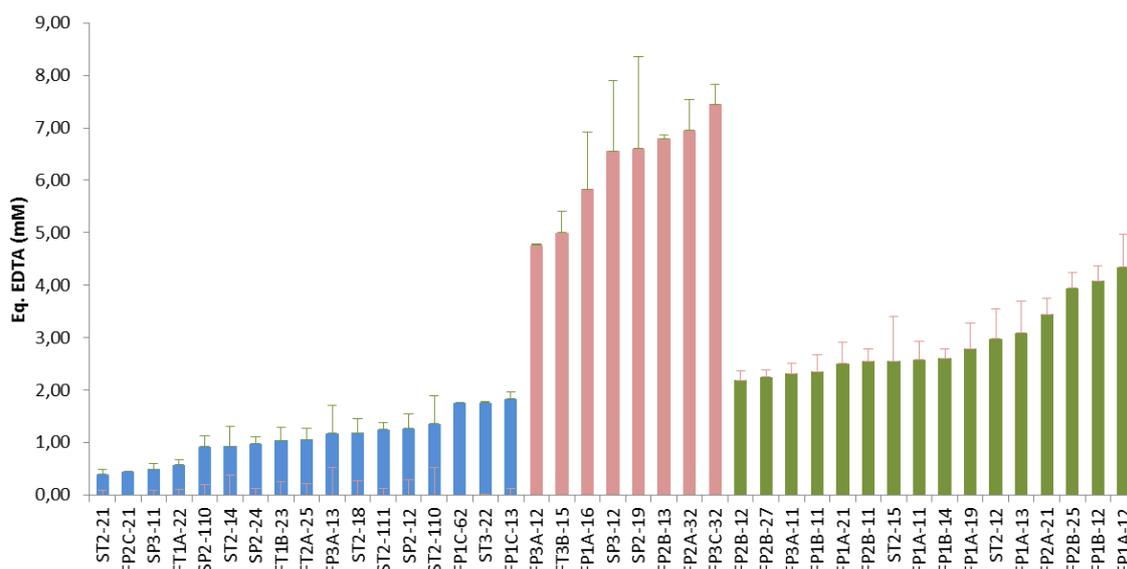


Figura 14: Valores de produção de sideróforos em meio KB pelos isolados endofíticos. Colunas azuis indicam os isolados do *cluster 1*, em vermelho os isolados do *cluster 2*, em verde os isolados do *cluster 3*, barras os desvios-padrões e os pontos azuis indicam os valores de pH. Médias de três repetições.

Cluster -1		Cluster -2		Cluster -3	
0,4	1,84	4,76	7,45	2,19	4,35
T	P	T	P	T	P
9	8	1	7	2	14
F	S	F	S	F	S
7	10	6	2	14	2

Figura 15: Representações esquemáticas desenhadas a partir dos dados de *clustering* pelo método de *k-means*. Números superiores, em cor destacada, indicam as faixas de produção de sideróforos (Eq. EDTA). Demais números indicam a frequência de isolados encontrados para cada tratamento e parte da planta, por *cluster*. Taxas de produção do *cluster 1* < *cluster 3* < *cluster 2*.

Não foi observada diferença sobre a frequência de isolados produtores de sideróforos entre as partes da planta (Teste do χ^2 , $p > 0,05$; apêndice D.17), porém este fator afetou suas taxas de produção (MLG, $p = 0,04$ – Tabela 6), que foram maiores para os isolados provenientes de folhas que os de seiva, como pode ser visualizado nos diagramas de caixa e representações dos agrupamentos de *k-means* dos isolados (Figuras 15 e 16). Já os tratamentos

de adubação fosfatada apresentaram efeito (Teste do χ^2 , $p < 0,05$ – apêndice D.21 e 22; MLGs, $p = 0,034$ – Tabela 6) negativo tanto sobre a frequência de isolados produtores quanto sobre as taxas de produção de sideróforos (Figura 15 e 16).

Tabela 7: Resultados da aplicação de Modelos Lineares Generalizados (MLG) com erros gama e funções de ligação identidade para avaliar possíveis associações entre adubação fosfatada e partes da planta de milho (folha, raiz e seiva) na variação das taxas de produção de sideróforos pelos isolados endofíticos.

Hipótese e modelo	Graus de liberdade	Desvio residual	G.L. do resíduo	Desvio	Pr(>Chi)	AIC
Nulidade			122	0.01		308,71
Adubação fosfatada	1	0.001	121	0.008	0.000	
Parte da planta	2	0.0003	120	0.008	0.034	

Dados originais normalizados por Box-Cox. Modelos de seleção se encontram no apêndice B.

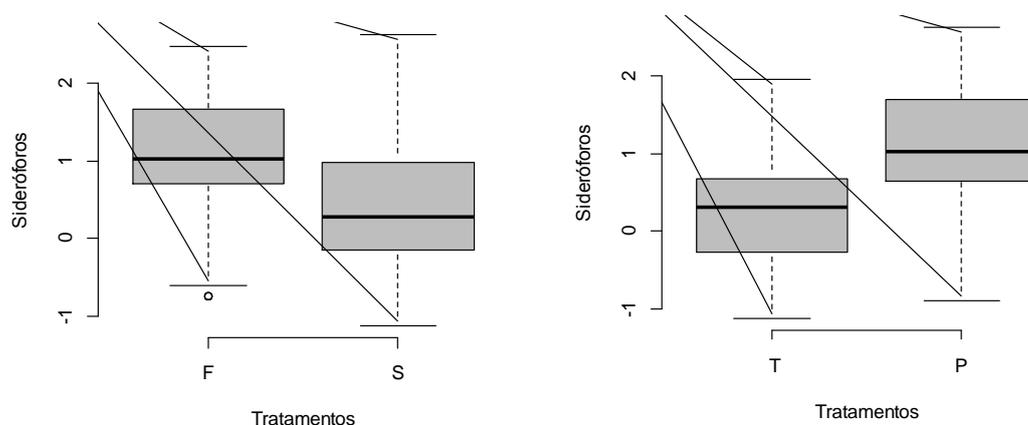


Figura 16: Representações *Box-plots* das taxas de produção de sideróforos (u. EDTA) e suas repostas aos tratamentos de adubação fosfatada e partes da planta. A) Tratamentos: T – adubação fosfatada; P – sem adubação fosfatada. B) Partes da planta: F – folhas; R – raízes; S – seiva. Dados originais transformados por Box-Cox. As linhas grossas representam as medianas, as caixas os erros-padrões e as linhas tracejadas os desvios-padrões.

Como o xilema, considerado o principal reservatório de bactérias endofíticas do sistema vascular das plantas (HARDOIM et al., 2008), é responsável pelo transporte de água e sais minerais absorvidos do solo, incluindo íons férricos (BOLLARD et al., 1960), pode-se considerar que o ganho adaptativo da produção de sideróforos nesse ambiente seja mínimo,

principalmente por estes íons serem transportados na forma solúvel nesse sistema. Nas folhas, por outro lado, onde a disponibilidade de ferro tende a ser menor, a produção de sideróforos poderia apresentar uma vantagem em relação à competição por este elemento com outros micro-organismos endófitos, incluindo fitopatógenos (CAO et al., 2004).

Em relação aos tratamentos de adubação fosfatada, porém, não foi possível elucidar os possíveis fatores que explicassem o efeito positivo da ausência de adubação fosfatada sobre as taxas de produção de sideróforos. Talvez uma das explicações esteja relacionada ao fato de que o fosfato de ferro seja a principal fonte de fósforo das áreas utilizadas para o cultivo do milho neste trabalho, de modo que a produção de sideróforos também auxiliaria a captação de fosforo pelas bactérias endofíticas do tratamento não fosfatado. Análises das fontes de fosfato destes solos seriam necessárias para confirmar esta inferência.

A metodologia adaptada de Schwyn e Neilands (1987) para detecção de sideróforos utilizada neste trabalho baseia-se na capacidade dessas moléculas removerem o ferro do complexo ternário Cromo azulol S:Fe³⁺:HDTMA, alterando sua coloração de azul para laranja, de modo que essa atividade pode ser aferida espectrofotometricamente. Estudos devem ser realizados para confirmar se a atividade solubilizadora de fosfato dos dez isolados que também apresentaram resultados positivos para a produção de sideróforos se deu devido a produção de ácidos orgânicos e se estes apresentam atividade quelante detectável no ensaio de Schwyn e Neilands.

Foram encontrados 15 gêneros de bactérias endofíticas produtoras de sideróforos, dos quais os mais frequentes foram *Microbacterium*, com 12 isolados, sendo que quatro foram agrupados entre os oito melhores produtores, e *Curtobacterium*, com quatro isolados, cujo isolado FP3C-32 apresentou o maior índice de produção dentre os isolados positivos (Figura 14; apêndice F.4). Isolados produtores de sideróforos destes dois gêneros também foram encontrados por Pereira e Castro (2014) dentre 39 isolados endofíticos de milho. Outros isolados que apresentaram elevados índices de produção foram *Obesumbacterium proteus* FP1A-16 e os isolados não identificados FP2A-32 e

FP2B-13 (Figura 14). Em trabalho de Czajkowski e colaboradores (2012), 13 isolados de *Obesumbacterium proteus* e *Pseudomonas putida*, outra espécie encontrada neste trabalho, apresentaram a capacidade de inibir em até 50% a “podridão da batata” causada pela bactéria *Dickey* sp. devido à produção de sideróforos.

O terceiro gênero mais recorrente dentre os isolados produtores de sideróforos foi o *Lactococcus*, com três isolados, todos identificados como *L. lactis*. Do nosso conhecimento, é a primeira vez que a produção de sideróforos é encontrada nesta espécie. Há trabalhos na literatura indicando que linhagens isoladas de produtos lácteos fermentados, dos quais esta bactéria frequentemente é utilizada como cultura *starter*, não apresentam sequer necessidades nutricionais de Fe (PANDEY et al., 1994). Porém, Siezen e colaboradores (2008), ao analisarem o genoma de dois *L. lactis* isolados de plantas encontraram diversos genes não homólogos aos encontrados em genomas de *L. lactis* de origem láctea, incluindo fases de leitura aberta (ORFs) relacionadas à biossíntese de sideróforos e um *cluster* de genes codificadores de um transportador de complexos Fe-sideróforos. É sabido que durante a evolução das linhagens de *L. lactis* de origem de produtos lácteos a partir das linhagens selvagens de origem de material vegetal houve a perda ou regulação negativa de diversos genes que não apresentavam benefícios neste novo ambiente (BACHMANN et al., 2012).

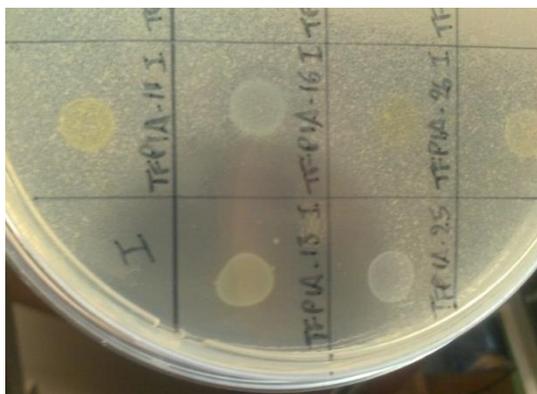
5.3.5. Atividade antagonista

Os 178 isolados deste trabalho foram avaliados quanto a capacidade de antagonizar dois fungos fitopatogênicos e duas bactérias. Os fungos selecionados para este trabalho pertencem às espécies *Colletotrichum graminicola* 03.10M e *Fusarium verticillioides* 193, causadores de doenças de grande impacto popularmente conhecidas como “podridões do milho” (DA COSTA et al., 2010; JUNIOR et al., 2013). As doenças bacterianas, embora bem menos importantes na cultura do milho que as causadas por fungos, podem causar grandes prejuízos na produção agrícola dependendo das condições ambientais de cultivo, como de maior umidade. Elas têm sido cada

vez mais recorrentes devido, por exemplo, à técnicas modernas de cultivo como o plantio direto (SAUER et al., 2010). As bactérias selecionadas para este trabalho foram *Pantoea ananatis* 2103, bactéria gram-negativa causadora da doença “mancha branca” do milho (SAUER et al., 2010), e a gram-positiva *Bacillus subtilis* DSM 3258. Embora a cultura do milho não apresente histórico relevante de doenças causadas por bactérias gram-positivas, *B. subtilis* foi selecionada para este trabalho como modelo para análise do espectro de ação da atividade antibacteriana dos isolados endofíticos.

Ao todo, 26 isolados (14,6% do total de isolados) apresentaram algum nível de atividade antagonista contra pelo menos um dos micro-organismos testes confrontados. Desse total, 15 isolados apresentaram atividade antibacteriana e 20 apresentaram atividade antifúngica (Figuras 17 e 18; tabela 7). Os tratamentos (adubação fosfatada) e origem de isolamento (seiva, folhas e raízes) não apresentaram efeito sobre a frequência de isolados com atividade antagonista (teste do χ^2 , $p > 0,05$ – Apêndice D.9 a 13).

A)



B)



Figura 17: A) Halo de inibição do isolado FP1A-13 contra a bactéria teste *Bacillus subtilis*. B) Halo de inibição do isolado *Staphylococcus warneri* FT3C-14 contra o fungo fitopatogênico *Colletotrichum graminicola*.

O espectro de atividade variou entre os isolados em estudo. Dos 15 isolados com atividade antibacteriana, oito apresentaram atividade apenas contra *B. subtilis*, sete apresentaram atividade contra as duas bactérias testes

avaliadas (RT2A-12, RT3C-11, RT3C-21, RP3C-01, RT2B-13, RT2C-11 e FP1A-13), e nenhum apresentou atividade apenas contra *P. ananatis* (Figura 18). Talvez a maior resistência da *P. ananatis* à atividade antagonista dos isolados se deva a estrutura mais complexa de sua parede celular, formada por uma camada interna de peptídeoglicano e uma membrana externa de lipopolissacarídeos (LPS), mais restritiva ao transporte e ação de moléculas bioativas (LIVERMORE, 2012).

Em relação aos 20 isolados que apresentaram atividade antifúngica, 15 antagonizaram apenas *C. graminicola*, quatro antagonizaram os dois fungos testados (RT2A-12, RT3C-11, RT3C-21 E RP3C-01) e o isolado ST3-116 antagonizou somente *F. verticillioides* (Figura 18).

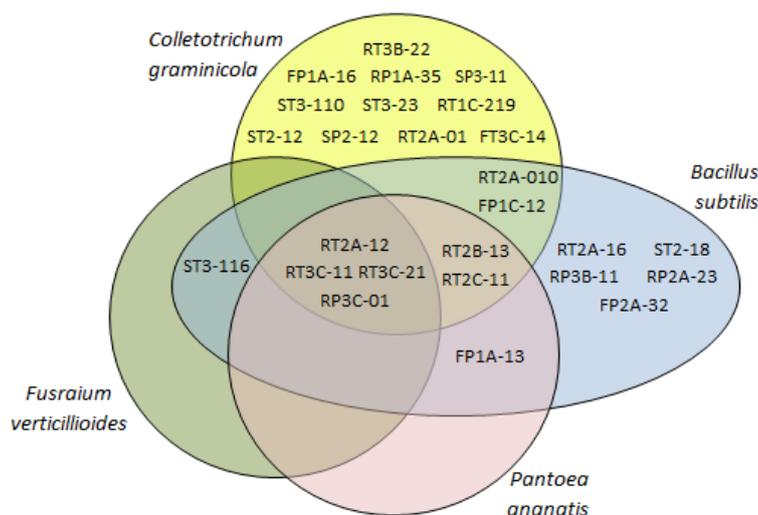


Figura 18: Diagrama de Venn mostrando as diferentes combinações de atividades antagonistas dos isolados contra os micro-organismos testes confrontados.

Dos 26 isolados antagonistas, 20 foram identificados pelo menos no nível de gênero. O gênero que mais se destacou quanto ao número de isolados com atividade antagonista foi *Bacillus*, com dez representantes (38,5% dos isolados antagonistas), todos isolados de raízes de milho, com exceção de *B. subtilis* SP3-11, proveniente de amostras da seiva. Dos nove isolados que apresentaram atividade tanto antibacteriana quanto antifúngica, sete eram do

gênero *Bacillus*, com destaque para os isolados de raízes RT2A-12, RT3C-11, RT3C-21 e RP3C-01, únicos isolados que apresentaram atividade antagonista contra os quatro micro-organismos testados. O potencial de antagonismo de linhagens de *Bacillus* é extensivamente descrito na literatura (HANDELSMAN et al., 1990; ASAKA & SHODA, 1996; RAUPACH et al., 1998; JACOBSEN et al., 2004; NELSON et al., 2014), incluindo a descrição de diversos inoculantes para biocontrole a base de *Bacillus* em comercialização em países como EUA, Alemanha, México, África do Sul, Índia, Chile, Brasil, dentre outros (SCHISLER et al., 2004; BETTIOL et al., 2012). Inoculantes a base de *Bacillus* são desejáveis considerando-se a capacidade destas bactérias de produzirem endósporos, o que garante a estabilidade do produto comercial desde a formulação, estocagem e comercialização, resultando em um maior tempo de prateleira (SCHISLER et al., 2004).

Outro gênero com atividade antagonista recorrente foi *Pseudomonas*, que apresentou o isolado *P. mosselii* RT1C-219 com atividade contra *C. graminicola*, e dois isolados, ST2-18 e RP2A-23, com atividade contra *B. subtilis*, identificados como *P. plecoglossicida* e *P. protegens*, respectivamente. A atividade de *P. protegens* RP2A-23 contra *B. subtilis* foi a maior observada dentre todos os isolados. O gênero *Pseudomonas* também tem sido extensivamente reportado por seu potencial antagonista e como agente de biocontrole de fitopatógenos (LIGON et al., 2000; WELLER, 2007; DE MAEYER, 2012; MERCADO-BLANCO, 2015). Embora não apresente as vantagens relacionadas a estabilidade de estocagem dos bioinoculantes produtores de endósporos, como *Bacillus*, o gênero se destaca pela fácil e rápida colonização da rizosfera e endosfera das plantas e produção de um amplo espectro de compostos bioativos antagonistas (WELLER, 2007; DE MAEYER, 2012).

Tabela 8: Isolados endofíticos que apresentaram atividade antagonista contra os micro-organismos confrontados neste ensaio. Os valores de atividade anti-bacteriana estão expressos como a razão entre o halo de inibição e o diâmetro da colônia do isolado endofítico. Os valores de atividade anti-fúngica estão expressos como a distância, em milímetros, entre as bordas das colônias da bactéria endofítica e do fungo confrontado.

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pantoea ananatis</i>	<i>Colletotrichum graminicola</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>
RT2A-16	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	2 ab	-	-	-
RT2B-13	<i>Bacillus pumilus</i>	1,2 a	1,2 a	1 a	-
RT2A-010	<i>Bacillus safensis</i>	2,4 b	-	2,5 ab	-
RT2A-12	<i>Bacillus sp.</i>	2,1 ab	1,5 ab	2 a	1 a
RT3B-22	<i>Bacillus sp.</i>	-	-	2 a	-
RT3C-11	<i>Bacillus sp.</i>	1,7 ab	1,3 a	1 a	2 a
RT3C-21	<i>Bacillus sp.</i>	1,3 a	1,2 a	1 a	1 a
RP3C-01	<i>Bacillus subtilis</i>	1,2 a	1,2 a	3,5 ab	1,5 a
SP3-11	<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	3,5 ab	-
RT2C-11	<i>Bacillus subtilis</i>	1,5 ab	1,3 a	1,5 a	-
RP3B-11	<i>Bacillus toyonensis</i>	2 ab	-	-	-
RP1A-35	<i>Leuconostoc holzappelii</i>	-	-	2 a	-
ST3-23	<i>Microbacterium sp.</i>	-	-	3,5 ab	-
FP1A-16	<i>Obesumbacterium proteus</i>	-	-	5 ab	-
ST3-110	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	-	-	4 ab	-
RT1C-219	<i>Pseudomonas mosselii</i>	-	-	1 a	-
ST2-18	<i>Pseudomonas moselii</i>	2 ab	-	-	-
RP2A-23	<i>Pseudomonas protegens</i>	5,7 c	-	-	-
RT2A-01	<i>Serratia marcescens</i>	-	-	2,5 ab	-
FT3C-14	<i>Staphylococcus warneri</i>	-	-	3,5 ab	-
FP1A-13	25	5 c	1,2 a	-	-
FP1C-12	56	2 ab	-	3 ab	-
SP2-12	57	-	-	10 b	-
ST3-116	58	1,2 a	-	-	3 ab
ST2-12	60	-	-	2 a	-
FP2A-32	103	1,5 ab	-	-	-

As iniciais dos isolados indicam se eles foram isolados da seiva (S), folhas (F) ou raízes (R) do milho. O segundo dígito indica se eles foram isolados do tratamento fosfatado (T) ou não fosfatado (P). Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficientes de variação de 12,9% para os valores de atividade anti-bacteriana e 69,09% para os valores de atividade anti-fúngica. Médias de duas repetições.

De qualquer modo, todos os isolados aqui selecionados merecem consideração em futuros testes *in vivo*, já que fatores ambientais associados ao cultivo da planta hospedeira podem afetar a atividade antimicrobiana dos isolados. Por exemplo, Mafia e colaboradores (2009), em trabalho onde analisaram o potencial de rizobactérias em antagonizar o fitopatógeno de

eucalipto *Cylindrocladium candelabrum*, constataram que o isolado *P. fulva* Ca, que não se mostrou o antagonista mais promissor nos ensaios em placas de Petri, foi justamente o mais eficiente nos testes *in vivo* realizados em substrato para enraizamento na supressão de *C. candelabrum* em estacas de eucalipto. Foi sugerido que fatores como a capacidade de sobrevivência e manutenção de alta densidade populacional no substrato podem ter sido determinantes para sua atividade antagonista mais eficaz *in vivo*.

5.3.6. Análise do potencial dos isolados como promotores de crescimento vegetal e agentes de controle biológico

As interações entre plantas e micro-organismos envolvem vários mecanismos que afetam o crescimento e fisiologia de ambas as partes dessas associações, e o conhecimento desses mecanismos pode permitir a exploração dessas interações para se alcançar aumentos de produtividade agrícola ou técnicas mais sustentáveis de manejo de lavouras, além de fornecer informações para um melhor entendimento da ecologia microbiana. Bioinoculantes microbianos podem aumentar a produtividade de culturas agrícolas pelo aumento da disponibilidade de nutrientes no solo, produção de compostos que promovem o crescimento vegetal (fitohormônios) e controle de doenças (COCKING, 2003).

Neste trabalho, foram isoladas 178 bactérias endofíticas de milho, das quais 144 (80,9%) apresentaram pelo menos um fator que potencialmente poderia promover o crescimento e aumento de produtividade de culturas agrícolas. Excluindo-se os isolados de raízes, que não tiveram sua atividade de produção de sideróforos analisada, observou-se que não houve efeito da adubação fosfatada ou das partes da planta (seiva e folhas) sobre a frequência de isolados potencialmente promotores do crescimento de plantas (MPCP) (Teste do χ^2 , $p < 0,05$; apêndice D.24 e 25). Por outro lado, quando manteve-se os isolados de raízes e excluiu-se o fator produção de sideróforos, observou-se que embora os tratamentos de adubação fosfatada continuassem não apresentando efeito sobre a frequência de isolados MPCP (Teste do χ^2 , $p < 0,05$; apêndice D.19), o mesmo não se deu para as partes da planta (seiva,

folhas e raízes) (Teste do χ^2 , $p > 0,05$; apêndice D.20). Tal como demonstrado na tabela 8, os testes de χ^2 sugerem que esse efeito parece ter se dado devido a menor frequência de MPCP de folhas em relação aos isolados de seiva e raízes (Teste do χ^2 , $p = 0,05$; apêndices D.21 a 23). Porém, esse efeito poderia ser reflexo da maior proporção de isolados produtores de AIA da seiva (Capítulo 4.3.1, figura 8; apêndices D.6 e 8) e de isolados mineralizadores de fitato das raízes (Capítulo 4.3.3; apêndices 14 e 16). Considerando-se a análise conjunta dos MPCP, excluindo-se os isolados produtores de AIA e de raízes ou mineralizadores de fitato e isolados de seiva, de modo a retirar-se a interferência do efeito positivo da seiva e raízes sobre produção de AIA e mineralização de fitato, respectivamente, observa-se que não há mais efeito das partes da planta sobre a frequência dos MPCP (Tabela 8) (Teste do χ^2 , $p > 0,05$; apêndices D.26 a 27).

Tabela 9: Efeito das partes da planta sobre a frequência de isolados promotores de crescimento vegetal.

Hipótese nula: Partes da planta não apresentam efeito sobre a frequência de isolados MPCP

	Número de isolados			Decisão***
	Seiva	Folhas	Raízes	
População total	33	65	80	-
MPCP**	29	34*	72	Rejeita-se Ho
MPCP, exceto isolados de folhas**	29	-	72	Aceita-se Ho
Isolados produtores de AIA	29*	27	45	Rejeita-se Ho
MPCP, exceto produtores de AIA e isolados de raízes	20	38	-	Aceita-se Ho
Isolados mineralizadores de fitato	7	15	53*	Rejeita-se Ho
MPCP, exceto mineralizadores de fitato e isolados de seiva**	-	33	61	Aceita-se Ho

*Valores *outliers*;

**Exceto isolados produtores de sideróforos (que não tiveram isolados de raízes analisados);

***Teste do χ^2 , $P = 0,05$.

O fator promotor de crescimento vegetal mais frequentemente observado entre os isolados foi a produção de AIA, com 101 isolados, seguido pela capacidade de mineralizar fitato (75 isolados), solubilização de fosfato inorgânico (55) e atividade antagonista contra bactérias e fungos patogênicos (26 isolados). Quarenta e um isolados produtores de sideróforos também foram

observados entre os isolados de seiva e folhas de milho (isolados de raízes não tiveram este fator analisado). O padrão de produção de fatores de crescimento vegetal pode variar entre as bactérias endofíticas. Montañez e colaboradores (2012) observaram que de 22 bactérias diazotróficas endofíticas de milho, todas eram produtoras de AIA, apenas quatro não eram solubilizadoras de fosfato inorgânico e somente uma apresentou produção de sideróforos. Pereira e Castro (2014), por sua vez, observaram que das 39 bactérias endofíticas isoladas de plantas de milho cultivadas em solos contaminados por Zn e Cd, todas eram produtoras de sideróforos e AIA e 13 não apresentavam a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico. Já Johnston-Monje e Raizada (2011) relataram que dentre 91 bactérias endofíticas de sementes de milho e teosinto, 63 eram capazes de solubilizar fosfato, 13 apresentavam atividade antagonista contra bactérias (*E. coli* e/ou *B. subtilis*) e/ou fungos (levedura AH109), seis produziam AIA e cinco produziam sideróforos. Como a origem da microbiota endofítica das plantas está intrinsicamente relacionada ao ambiente em que ela está, principalmente ao solo local, fonte da maior parte dessa microbiota (HARDOIM et al., 2008; COMPANT et al., 2010), é natural que se encontre tamanha variedade fenotípica entre plantas cultivadas em diferentes regiões, já que estas sempre apresentarão microbiotas nativas distintas que podem ainda variar de acordo com fatores ambientais, como clima, umidade, pH, dentre outros. Desse modo, micro-organismos ou material genético microbiano isolados de plantas da mesma espécie oriundas de diferentes localidades podem apresentar potenciais biotecnológicos distintos aplicáveis à indústria agrícola ou outra qualquer, o que justifica a condução de estudos de bioprospecção da microbiota endofítica de milho em diversas regiões do mundo.

Dos 144 isolados MPCP obtidos neste trabalho, 29 se destacaram por apresentarem todas as características promotoras de crescimento vegetal analisadas (Apêndice F). Este número poderia ser diferente, visto que os dados de produção de sideróforos pelos isolados de raízes não foram analisados, sendo desconsiderados, e, além disso, como discutido no capítulo 4.3.3, os dados de mineralização de fitato podem estar superestimados, devido a características inerentes do ensaio qualitativo em meio sólido. Dentre estes 29

isolados, sete se destacaram por ainda apresentarem a capacidade de antagonizar bactérias e/ou fungos (*E. coli*, *B. subtilis*, *C. graminicola* e *F. verticillioides*), sendo eles os isolados *Obesumbacterium proteus* FP1A-13, *Serratia marcescens* RT2A-01, *Arthrobacter ureofaciens* RT2A-16, *Pseudomonas mosselii* ST2-18, a Enterobacteriaceae FP1C-13 e os isolados não identificados FP1A-13 e ST2-12.

A capacidade de antagonizar outros micro-organismos pode se dar pela produção de moléculas bioativas, como antibióticos e moléculas tensoativas, pela produção de enzimas degradadoras de parede celular, ou ainda por competição por nutrientes, que pode se dar, por exemplo, pela produção de sideróforos. Dentre os isolados antagonistas deste estudo, apenas os isolados *O. proteus* FP1A-13 e FP2A-32 apresentaram alta produção de sideróforos (Figura 14 e 18). Diversos estudos já relataram atividade antagonista para os gêneros destes sete isolados. Wietz e colaboradores (2012) relataram a capacidade do isolado *Arthrobacter* sp. WX11 de produzir o antibiótico artrobacilina, capaz de inibir o crescimento de *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella enterica*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio vulnificus*, *Yersinia enterocolitica*, dentre outros. Ordentlish e colaboradores (1988) atribuíram o potencial de controle de *Serratia marcescens* contra o fungo *Sclerotium rolfsii*, um fitopatógeno de diversas mono e dicotiledôneas, à produção de enzimas quitinases degradadoras das paredes celulares do fungo.

Já bactérias do gênero *Pseudomonas*, assim como *Bacillus*, outro gênero de grande destaque entre os isolados MPCP deste trabalho, apresentam amplo histórico de aplicação agrícola tanto como promotores de crescimento vegetal quanto como agentes de controle biológico (BERG, 2009; BETTIOL et al., 2012). Dos 11 isolados de *Pseudomonas* obtidos, apenas um não apresentou pelo menos um fator promotor de crescimento vegetal. O mesmo foi observado para apenas dois dos 19 isolados de *Bacillus*. BlightBlan® (NuFarm©) é um pesticida a base de *P. fluorescens* A506, recomendado para a supressão e controle da doença do “fogo bacteriano”, causado por *Erwinia amylovora* em pereiras, macieiras, pessegueiros e outras árvores frutíferas. FZB24® (ABiTEP GmbH©), por sua vez, é uma linha de produtos a base de *B. amyloliquefaciens* comercializados como fertilizantes

para hortaliças, árvores frutíferas, plantas ornamentais, e culturas como batata e milho.

Dentre os gêneros que merecem destaque neste trabalho também está *Serratia*, do qual todos os cinco isolados obtidos neste trabalho apresentaram todas as características promotoras de crescimento vegetal analisadas, embora apenas um também tenha apresentado atividade antagonista (Apêndice F). Três dos isolados foram identificados como *S. marcescens*, uma bactéria de distribuição ubíqua com amplo relato de atividade antagonista e promotora de crescimento vegetal (LAVANIA et al., 2006; GYANESHWAR et al., 2001; SELVAKUMAR et al., 2008), mas que apresenta restrições legislativas de aplicação direta em culturas agrícolas como bioinoculantes, pois apresenta potencial patogênico nosocomial e, mais recentemente, também tem sido relacionada a doenças em plantas (GILLIS et al., 2014). Wang e colaboradores (2015) foram os primeiros autores a relatarem que a doença “podridão do verticilo” de milho era causada pela bactéria *S. marcescens*.

Além de *Serratia*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, os únicos outros gêneros que já apresentam produtos comerciais registrados são *Rhizobium* e *Pantoea*, tal como citado no capítulo 4.3.5 (Atividade antagonista), sobre a utilização de produtos a base de *P. vagans* como agente de controle biológico do “fogo bacteriano” de frutíferas causado por *E. amylovorans*.

As etapas para seleção e indicação de bactérias potencialmente promotoras de crescimento vegetal incluem etapas *in vitro* e *in vivo*, em casas de vegetação e em campo. Estas duas etapas são necessárias, uma vez que diversos estudos têm demonstrado que a produção de fatores de crescimento vegetal *in vitro* nem sempre resulta em benefícios para a planta quando os isolados produtores são avaliados em casas de vegetação ou em campo, e que os aumentos de crescimento observados nem sempre são proporcionais às taxas de produção destes fatores *in vitro* (SOBRAL et al., 2004; TAURIAN et al., 2010; MONTAÑEZ et al., 2012). Pereira e Catro (2014) inocularam plântulas de milho com 10 isolados endofíticos produtores de AIA e sideróforos, dos quais quatro ainda apresentavam a habilidade de solubilizar fosfato inorgânico, e observaram que apenas metade destes foi capaz de promover

maior crescimento (alongamento das raízes e aumento de peso seco total) em relação aos controles. Ainda neste estudo, o isolado *Frigoribacterium faeni* ZS 3-5, embora tenha apresentado o segundo menor índice de produção de AIA e o menor índice de produção de sideróforos, além de não ter sido um dos isolados solubilizadores de fosfato, foi o único capaz de conferir aumento tanto no alongamento das raízes das plântulas inoculadas quanto na produção de biomassa total.

Outro fator que pode ser determinante para a atividade promotora de crescimento vegetal do MPCP é a espécie da própria planta hospedeira, tal fato evidenciado no estudo de Johnston-Monje e Raizada (2011), que analisaram o potencial de 91 isolados endofíticos de milho promoverem o crescimento de plântulas de batata em condições gnotobióticas, e constataram que apenas um isolado de *Burkholderia phytofirmans* foi capaz de promover o crescimento de partes aéreas das plântulas, assim como apenas um isolados de *Hafnia alvei* foi capaz de promover o crescimento das raízes. Por outro lado, a inoculação de 51 dos isolados resultou na diminuição da produção de partes aéreas pelas plântulas, assim como de 59 isolados resultou na diminuição das taxas de crescimento das raízes. Os autores argumentaram que isso provavelmente não reflita o que aconteça pela colonização de plantas de milho por seus isolados, já que os cultivares de milho e batatas são muito distintos geneticamente, e diversas espécies que induziram uma redução do crescimento das plântulas de batata neste trabalho já tiveram atividade promotora de crescimento em plantas de milho comprovada em outros trabalhos.

Diante destas considerações, como perspectiva, o nosso grupo de pesquisa pretende avaliar os isolados deste estudo quanto a capacidade de promoverem o crescimento de plantas de milho em ensaios em casa de vegetação e/ou campo. Também, esforços serão direcionados para o melhor entendimento dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal dos isolados, tal como a caracterização dos sideróforos e enzimas fitases, assim como dos mecanismos de solubilização de fosfato e atividade antagonista. Todas estas etapas são necessárias e importantes para a obtenção de bionoculantes eficazes e de aplicação ambientalmente sustentável.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivos analisar a comunidade bacteriana endofítica de diferentes partes da planta do milho (*Zea mays*) em relação a aspectos de densidade de colonização, produção de fatores potencialmente promotores de crescimento vegetal ou antagonistas de fitopatógenos, bem como o efeito da adubação fosfatada sobre cada um desses aspectos. De modo geral, concluiu-se que:

- As partes da planta (seiva, folhas e raízes) apresentaram efeito estatístico significativo sobre a densidade de isolados endofíticos encontrados no milho, sendo esta maior nas raízes, seguida por folhas e uma escala de grandeza dez vezes menor na seiva do milho. Porém, o tratamento de adubação fosfatada não apresentou efeito sobre esta variável;

- Comparando-se as espécies encontradas neste trabalho e em outros publicados, percebe-se que este dado pode variar muito entre plantas cultivadas em diferentes localidades, mesmo que estas sejam da mesma espécie. Neste trabalho, a proporção de bactérias gram-positivas foi maior que a de gram-negativas. Os principais grupos taxonômicos encontrados foram Firmicutes, Actinobacteria e Proteobacteria, com Bacteroidetes tendo uma frequência de ocorrência marginal;

- Uma grande proporção (80,9%) da microbiota endofítica do presente trabalho apresenta o potencial de ser utilizada como bioinoculante promotor de crescimento vegetal em cultivares agrícolas, como o milho, por apresentar, *in vitro*, a produção de pelo menos uma dos fatores promotores de crescimento vegetal avaliados. Desta forma, visando este objetivo, é importante que: (1) todos estes isolados sejam identificados no nível de espécie, a fim de se excluir isolados com potencial patogênico ao homem e às plantas, uma exigência legislativa no Brasil para a utilização de micro-organismos vivos como bioinoculantes; (2) que os isolados que não apresentem riscos à saúde humana ou das lavouras agrícolas possam ter sua capacidade de promover o crescimento do milho ou outro cultivar de interesse analisada *in vivo* e (3) que os isolados que venham a ser selecionados nos teste preliminares *in vivo* tenham estudados a regulação desses mecanismos, de modo a compreender as condições necessárias para que apenas os caracteres benéficos destes

isolados sejam expressos de maneira maximizada quando aplicados de maneira comercial;

- As análises genóticas e fenotípicas indicaram que os isolados mais promissores quanto ao potencial promotor de crescimento vegetal pertencem aos generos *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Serratia* e *Enterobacter*.

- As variáveis partes da planta e adubação fosfatada podem apresentar efeito sobre a produção de fatores de crescimento vegetal pelas bactérias endofíticas de milho, de modo que estes fatores devem ser levados em consideração em estudos futuros visando o desenvolvimento de bioinoculantes com estes isolados, em especial o fator adubação fosfatada, que pode ser facilmente manipulado de modo a favorecer a produção de fatores de crescimento dos bioinoculantes; Bactérias endofíticas da espécie *Lactococcus lactis* podem apresentar a capacidade de produzir moléculas do tipo sideróforos;

Finalizando, este trabalho contribuiu para um maior entendimento acerca das microbiota endofítica do milho e seu potencial de produção de fatores de crescimento vegetal, abrindo perspectivas quanto a exploração desta para o desenvolvimento de bioinoculantes promotores de crescimento vegetal ou como agentes de controle biológico. Outra importante possibilidade que se abre é a aplicação destes conhecimentos na pesquisa de melhoramento genético do milho, visando o desenvolvimento de variedades que melhor respondam aos efeitos benéficos dessa microbiota, tal como já é realizado em relação à fertilizantes e pesticidas químicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, A.; PHILIP, S.; JACOB, M. K.; NARAYANAN, S. P.; JACOB, C. K.; KOCHUPURACKAL, J. Phenazine-1-carboxylic acid mediated anti-oomycete activity of the endophytic *Alcaligenes* sp. EIL-2 against *Phytophthora meadii*. Microbiological research, v. 170, p. 229-234, 2015.

ACUÑA, J. J.; JORQUERA, M. A.; MENEZES-BLACKBURN, D.; FERNÁNDEZ, M. T.; MARSCHNER, P.; GREINER, R.; MORA M. L. Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metal. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, v. 11, p. 1-12, 2011.

ADEJUMO, T. O.; OROLE, O. O. Effect of pH and moisture content on endophytic colonization of maize roots. Scientific Research and Essays, v. 5, p. 1655-1661, 2010.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological research, v. 163, n. 2, p. 173-181, 2008.

AI'SHAH, O. N.; AMIR, H. G.; KENG, C. L.; OTHMAN, A. R. Influence of various combinations of diazotrophs and chemical n fertilizer on plant growth and N₂ fixation capacity of oil palm seedlings (*Elaeis guineensis* Jacq.). Thai Journal of Agricultural Science, v. 42, n. 3, p. 139-149, 2009.

ANISZEWSKI, E.; PEIXOTO, R. S.; MOTA, F. F.; LEITE, S. G. F.; ROSADO, A. S. Bioemulsifier production by *Microbacterium* sp. strains isolated from mangrove and their application to remove cadmium and zinc from hazardous industrial residue. Brazilian Journal of Microbiology, v. 41, n. 1, p. 235-245, 2010.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 43, n. 4, 5 p., 2000.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Applied and Environmental Microbiology, v. 68(10), p. 4906-4914, 2002.

ARNOLD, A. E.; LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? Ecology, v. 88, n. 3, p. 541-549, 2007.

ARSHAD, M.; FRANKENBERGER JR, W. T. Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. Advances in Agronomy, v. 62, p. 45-151, 1997.

ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and environmental microbiology, v. 62, n. 11, p. 4081-4085, 1996.

ASSUMPÇÃO, L. C., LACAVA, P. T., DIAS, A. C. F., DE AZEVEDO, J. L., MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44(5), p. 503-510, 2009.

AUSTIN, M.P. Spatial prediction of species distribution: an interface between ecological theory and statistical modeling. *Ecological Modelling*, v. 157, 2–3, p. 101–118, 2002.

BACHMANN, Herwig et al. Microbial domestication signatures of *Lactococcus lactis* can be reproduced by experimental evolution. *Genome research*, v. 22, n. 1, p. 115-124, 2012.

BAIS, H. P., WALKER, T. S., SCHWEIZER, H. P., & VIVANCO, J. M. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 40(11), p. 983-995, 2002.

BAIS, H. P.; PARK, S. W.; WEIR, T. L.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends in Plant Science*, v. 9(1), p. 26-32, 2004.

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, p. 233-266, 2006.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. LD. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.

BARRANGOU, R.; YOON, S. S.; BREIDT JR, F.; FLEMING, H. P.; KLAENHAMMER, T. R. Identification and characterization of *Leuconostoc fallax* strains isolated from an industrial sauerkraut fermentation. *Applied and environmental microbiology*, v. 68, n. 6, p. 2877-2884, 2002.

BARTEL, B. Auxin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, v. 48, n. 1, p. 51-66, 1997.

BASU, Paramita; BROWN, Kathleen M.; PAL, Anupam. Detailed quantitative analysis of architectural traits of basal roots of young seedlings of bean in response to auxin and ethylene. *Plant physiology*, v. 155, n. 4, p. 2056-2065, 2011.

BAUER, W. D. Infection of legumes by rhizobia. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 32, n. 1, p. 407-449, 1981.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, v. 204, n. 2, p. 153-168, 1998.

BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, n. 1, p. 11-18, 2009.

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 51, n. 2, p. 215-229, 2005.

BETTIOL, W., MORANDI, M. A. B., PINTO, Z. V., PAULA JUNIOR, T. J., CORREA, E. B., MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. C. B.; BEZERRA, J. L. Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente (Documento) 113p, 2012.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.

BHORE, S. J.; RAVICHANTAR, N.; LOH, C. Y. Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of Sambung Nyawa [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds. *Bioinformation*, v. 5, n. 5, p. 191, 2010.

BIVI, M. R.; FARHANA, M. S. N.; KHAIRULMAZMI, A.; IDRIS, A. Control of *Ganoderma boninense*: A causal agent of basal stem rot disease in oil palm with endophyte bacteria in vitro. *International Journal of Agriculture and Biology*, v. 12(6), p. 833-839, 2010.

BODILIS, J.; NSIGUE-MEILO, S.; BESAURY, L.; QUILLET, L. Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas*. *PloS one*, v. 7, n. 4, p. e35647, 2012.

BOHM, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, v. 20, p. 526-533, 2007.

BOLLARD, E. G. Transport in the xylem. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 11, n. 1, p. 141-166, 1960.

BORDIEC, S.; PAQUIS, S.; LACROIX, H.; DHONDT, S.; BARKA, E. A.; KAUFFMANN, S.; JEANDET, P.; MAZEYRAT-GOURBEYRE, F.; CLÉMENT, C.; BAILLIEUL, F.; DOREY, S. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in grapevine cell suspensions. *Journal of experimental botany*, v. 62(2), p. 595-603, 2011.

BOU, G.; SALETA, J. L.; NIETO, J. A. S.; TOMÁS, M.; VALDEZATE, S.; SOUSA, D.; LLINARES, P. Nosocomial outbreaks caused by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. *Emerging infectious diseases*, v. 14, n. 6, p. 968, 2008.

BOX, G. EP; COX, D. R. An analysis of transformations. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), p. 211-252, 1964.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid In Situ Assay for Indoleacetic Acid Production by Bacteria Immobilized on a Nitrocellulose Membrane. Applied and environmental microbiology, v. 57, no. 2, p. 535-538, 1991.

BUCZOLITS, S., SCHUMANN, P., VALENS, M., ROSSELLÓ-MORA, R.; BUSSE, H. J. Identification of a bacterial strain isolated from the liver of a laboratory mouse as *Microbacterium paraoxydans* and emended description of the species *Microbacterium paraoxydans*. Indian journal of microbiology, v. 48, n. 2, p. 243-251, 2008.

CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. The evolution and future of Earth's nitrogen cycle. Science, v. 330, n. 6001, p. 192-196, 2010.

CAO, L., QIU, Z., YOU, J., TAN, H., ZHOU, S. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. FEMS microbiology letters, v. 247(2), p. 147-152, 2005.

CARNEIRO, A. A.; GOMES, E. A.; SOUZA, E. T. S.; COELHO, G. T.; MARRIEL, I. E.; PEREIRA, M. F.; VASCONCELOS, M. J. V. OLIVEIRA, M. T. S.; CARNEIRO, V. P.; SILVA, P. G. Fungos mineralizadores de fitato isolados da risosfera de milho. Embrapa Milho e Sorgo, Circular Técnica 109, 2008.

CARVALHO, C. R., GONÇALVES, V. N., PEREIRA, C. B., JOHANN, S., GALLIZA, I. V., ALVES, T. M., RABELLO, A. SOBRAL, M. E. G., ZANI, C. L. ROSA, C. A., ROSA, L. H. (2012). The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. *Symbiosis*, 57(2), 95-107.

CASTILLO, U. F., STROBEL, G. A., FORD, E. J., HESS, W. M., PORTER, H., JENSEN, J. B., YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. Microbiology, v. 148(9), p. 2675-2685, 2002.

CHADWICK, Arthur V.; BURG, Stanley P. An explanation of the inhibition of root growth caused by indole-3-acetic acid. Plant Physiology, v. 42, n. 3, p. 415-420, 1967

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Immunolocalization of Dinitrogenase Reductase Produced by *Klebsiella pneumoniae* in Association with *Zea mays* L. Applied and environmental Microbiology, v. 66, n. 2, p. 783-787, 2000.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. Microbial Ecology, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

CHEN, Y. P.; CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their

tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied soil ecology*, v. 34, n. 1, p. 33-41, 2006.

CHERNIN, L. & CHET, I. Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests. In: BURNS, R. AND DICK, R., Eds., Marcel Dekker Inc., New York, NY, p. 171–225, 2002.

CHRISTIANSEN-WENIGER, C.; VANDERLEYDEN, J. Ammonium-excreting *Azospirillum sp.* become intracellularly established in maize (*Zea mays*) para-nodules. *Biology and fertility of soils*, v. 17, n. 1, p. 1-8, 1994.

COCKING, E. C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil*, v. 252, n. 1, p. 169-175, 2003.

COLLAVINO, M. M., SANSBERRO, P. A., MROGINSKI, L. A., & AGUILAR, O. M. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils*, v. 46(7), p. 727-738, 2010.

COLWELL, R.; MAO, C. X.; CHANG, J. Interpolationg, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology*, v. 85, p. 2717-2727, 2004.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Séries históricas. 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=&Pagina_objcmsconteudo_s=3#A_objcmsconteudos>. Acesso em: 10 mar. 2015.

COMPANT, S., DUFFY, B., NOWAK, J., CLÉMENT, C., BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, v. 71(9), p. 4951-4959, 2005a.

COMPANT, S., KAPLAN, H., SESSITSCH, A., NOWAK, J., BARKA, E. A., & CLÉMENT, C. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS microbiology ecology*, v. 63, n. 1, p. 84-93, 2008.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia sp.* strain PsJN. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71(4), p. 1685-1693, 2005b.

COOLEY, M. B.; MILLER, W. G.; MANDRELL, R. E. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 8, p. 4915-4926, 2003.

COUTINHO, T. A.; VENTER, S. N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen. *Molecular plant pathology*, v. 10, n. 3, p. 325-335, 2009.

CRAWLEY, M.J. *The R Book*. John Wiley & Sons, Chichester, 2013.

CZABAN, J.; GAJDA, A.; WROBLEWSKA, B. The motility of bacteria from rhizosphere and different zones of winter wheat roots. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 16, n. 2, p. 301, 2007.

CZAJKOWSKI, R., DE BOER, W. J., VAN VEEN, J. A.; VAN DER WOLF, J. M. Characterization of bacterial isolates from rotting potato tuber tissue showing antagonism to *Dickeya* sp. biovar 3 in vitro and in planta. *Plant Pathology*, v. 61, n. 1, p. 169-182, 2012.

DA COSTA, R. V.; DA SILVA, D. D.; COTA, L. V.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, A. D.; S., CASELA, C. R. Incidência de *Colletotrichum graminicola* em colmos de genótipos de milho. *Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em periódico indexado (ALICE)*, 2010.

DART, P. J.; DAY, J. M.; HARRIS, D. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (Vienna). Use of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops. Vienna, 1972, p. 85-100. (IAEA. Technical Report, 149).

DE MAEYER, K. The versatile role of quorum sensing and phenazines in the biocontrol strain *Pseudomonas* sp. CMR12a. 2012. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Agricultura e Ciência dos Alimentos). Ghent University, Ghent, Bélgica

DÉFAGO, G. 2, 4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathology*, v. 42, n. 3, p. 311-312, 1993.

DENANCÉ, N., SÁNCHEZ-VALLET, A., GOFFNER, D., MOLINA, A. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in plant science*, v. 4, 2013.

DOBBELAERE, S., CROONENBORGH, A., THYS, A., BROEK, A. V., VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, v. 212(2), p. 153-162, 1999.

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

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de biologia*, v. 1, p. 261-272, 1958.

DON, R. H., COX, P. T., WAINWRIGHT, B. J., BAKER, K., & MATTICK, J. S. 'Touchdown'PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic acids research*, v. 19, n. 14, p. 4008, 1991.

DORR, J.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Type IV, pili are involved in plant–microbe and fungus–microbe interactions. *Molecular Microbiology*, v. 30, p. 7-17, 1998.

DOWNIE, J. A. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS microbiology reviews*, v. 34, n. 2, p. 150-170, 2010.

DUARTE, J. O. Introdução e importância econômica do milho. Embrapa Milho e Sorgo, 2000. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/importancia.htm>>. Acesso em: 14 ago. 2013.

EVANS, M. L.; ISHIKAWA, H.; ESTELLE, M. A. Responses of *Arabidopsis* roots to auxin studied with high temporal resolution: comparison of wild type and auxin-response mutants. *Planta*, v. 194, n. 2, p. 215-222, 1994.

EVENSON, R. E.; GOLLIN, D. Assessing the impact of the Green Revolution, 1960 to 2000. *Science*, v. 300, n. 5620, p. 758-762, 2003.

FAO. FAOSTAT. 2013. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/rankings/countries_by_commodity/E>. Acesso em: 15 fev. 2015.

FARIA, D. C., DIAS, A. C. F., MELO, I. S., & DE CARVALHO COSTA, F. E. Endophytic bacteria isolated from orchid and their potential to promote plant growth. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29(2), p. 217-221, 2013.

FAVARO, L. C. L.; DE SOUZA SEBASTIANES, F. L.; ARAUJO, W. L. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *PloS one*, v. 7, n. 6, p. e36826, 2012.

FERREIRA, A.; QUECINE, M. C.; LACAVA; P. T., ODA, S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. *FEMS microbiology letters*, v. 287, n. 1, p. 8-14, 2008.

FORCHETTI, G., MASCIARELLI, O., ALEMANO, S., ALVAREZ, D., ABDALA, G. Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 76(5), p. 1145-1152, 2007.

FRANKENBERGER, W. T.; POTH, M. Biosynthesis of indole-3-acetic acid by the pine ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius*. *Applied and environmental microbiology*, v. 53, n. 12, p. 2908-2913, 1987.

FREDRIKSON, M.; ANDLID, T.; HAIKARA, A.; SANDBERG, A. S. Phytate degradation by micro-organisms in synthetic media and pea flour. *Journal of applied microbiology*, v. 93, n. 2, p. 197-204, 2002.

FUENTES-RAMIREZ, L., JIMENEZ-SALGADO, T., ABARCA-OCAMPO, I. R., CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil*, v. 154(2), p. 145-150, 1993.

GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 68, n. 2, p. 280-300, 2004.

GAO, F. K.; DAI, C. C.; LIU, X. Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, v. 4, p. 1346-1351, 2010.

GELVIN, S. B. Crown gall disease and hairy root disease A sledgehammer and a tackhammer. *Plant physiology*, v. 92, n. 2, p. 281-285, 1990.

GHORBANI, R.; GREINER, R.; ALIKHANI, H. A.; HAMED, J. Identification and determination of extracellular phytate-degrading activity in actinomycetes. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, v. 28, p. 2601-2608, 2012.

GILLIS, A.; RODRÍGUEZ, M.; SANTANA, M. A. *Serratia marcescens* associated with bell pepper (*Capsicum annuum* L.) soft-rot disease under greenhouse conditions. *European journal of plant pathology*, v. 138, n. 1, p. 1-8, 2014.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, v. 251, n. 1, p. 1-7, 2005.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indolacetic acid. *Plant Physiology*, 26, p.192-195, 1951.

GREINER, R. Purification and properties of a phytate-degrading enzyme from *Pantoea agglomerans*. *The Protein Journal*, v. 23, p. 567–576, 2004.

GUAN, L. L., KANO, K., KAMINO, K. Effect of exogenous siderophores on iron uptake activity of marine bacteria under iron-limited conditions. *Applied and environmental microbiology*, v. 67(4), p. 1710-1717, 2001.

GUNNELL, D.; EDDLESTON, M.; PHILLIPS, M. R.; KONRADSEN, F. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC public health*, v. 7(1), p. 357, 2007.

GUTIERREZ-ZAMORA, M. L.; MARTINEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). *Journal of biotechnology*, v. 91, n. 2, p. 117-126, 2001.

GYANESHWAR, P., JAMES, E. K., MATHAN, N., REDDY, P. M., REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 8, p. 2634-2645, 2001.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 14, n. 5, p. 669-673, 1998.

HANDELSMAN, J.; RAFFEL, S.; MESTER, E. H.; WUNDERLICH, L.; GRAU, C. R. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 3, p. 713-718, 1990.

HARDOIM, P. R. Bacterial Endophytes of Rice – Their Diversity, Characteristics and Perspectives. 2011, 219p. Tese (PhD em Ciências Naturais) – Universidade de Groningen, Holanda, 2011.

HARDOIM, P. R.; HARDOIM, C. C.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PLoS One*, v. 7, n. 2, p. e30438, 2012.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

HARTMANN, A.; SCHMID, M.; VAN TUINEN, D.; BERG, G. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil*, v. 321, p. 235-257, 2009.

HEJAZI, A.; FALKINER, F. R. *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 46, n. 11, p. 903-912, 1997.

HIDER, R. C.; KONG, X.. Chemistry and biology of siderophores. *Natural product reports*, v. 27, n. 5, p. 637-657, 2010.

IKEDA, S.; KANEKO, T.; OKUBO, T.; RALLOS, L. E.; EDA, S.; MITSUI, H.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; MINAMISAWA, K. Development of a bacterial cell enrichment method and its application to the community analysis in soybean stems. *Microbial ecology*, v. 58(4), p. 703-714, 2009.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; CARTER, H. D.; AHMER, B. M.; STONE, J. M.; TRIPLETT, E. W. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. *Molecular plant-microbe interactions*, v. 18(2), p. 169-178. 2005.

INUI, R. N. Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar. 90. 2009. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2009.

JACCARD, P. The distribution of the flora in the alpine zone. 1. *New phytologist*, v. 11, n. 2, p. 37-50, 1912.

JACOBSEN, B. J.; ZIDACK, N. K.; LARSON, B. J. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. *Phytopathology*, v. 94, n. 11, p. 1272-1275, 2004.

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PloS One*, v. 7, n. 3, p. 33306, 2012.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, 2007.

JHA, P.; KUMAR, A. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microbial ecology*, v. 58, n. 1, p. 179-188, 2009.

JOHNSTON-MONJE, David; RAIZADA, Manish N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS One*, v. 6, n. 6, p. e20396, 2011.

JONER, E. J.; VAN AARLE, I. M.; VOSATKA, M. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae: a review. *Plant and Soil*, v. 226, n. 2, p. 199-210, 2000.

JONES, J. D. G; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature*, v. 444, n. 7117, p. 323-329, 2006.

JÚNIOR, P. R. K.; STUMPF, R.; SPOLTI, P.; DEL PONTE, E. M. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. *Ciência Rural*, v. 43, n. 4, p. 583-588, 2013.

KANG, C. I., CHUNG, D. R., KO, K. S.; PECK, K. R.; SONG, J. H.; KOREAN NETWORK FOR STUDY OF INFECTIOUS DISEASES (KONSID). Clinical predictors of *Enterobacter* bacteremia among patients admitted to the ED. *The American journal of emergency medicine*, v. 30, n. 1, p. 165-169, 2012.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, n. 3, p. 473-480, 2004.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 27, n. 1, p. 29-43, 2007.

KHAN, Z.; DOTY, S. L. Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. *Plant and soil*, v. 322, n. 1-2, p. 197-207, 2009.

KIM, K. K.; PARK, H. Y.; PARK, W.; KIM, I. S.; LEE, S. T. *Microbacterium xylanilyticum* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from a biofilm. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 55, n. 5, p. 2075-2079, 2005.

KIM, K. Y.; JORDAN, D.; KRISHNAN, H. B. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite¹. *FEMS microbiology letters*, v. 153, n. 2, p. 273-277, 1997.

KLOEPPER, J. W.; RYU, C.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* *Phytopathology*, v. 94, n. 11, p. 1259-1266, 2004.

KRISHNAMURTHI, S.; BHATTACHARYA, A.; SCHUMANN, P.; DASTAGER, S. G.; TANG, S. K.; LI, W. J.; CHAKRABARTI, T. *Microbacterium immunditiarum* sp. nov., an actinobacterium isolated from landfill surface soil, and emended description of the genus *Microbacterium*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 62, n. Pt 9, p. 2187-2193, 2012.

KUCEY, R. M. N.; JANZEN, H. H.; LEGGETT, M. E. Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in Agronomy*, v. 42, p. 199-228, 1989.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 73, p. 331-371, 1998.

LAFFINEUR, K.; AVESANI, V.; CORNU, G.; CHARLIER, J.; JANSSENS, M.; WAUTERS, G.; DELMÉE, M. Bacteremia Due to a Novel *Microbacterium* Species in a Patient with Leukemia and Description of *Microbacterium paraoxydans* sp. nov. *Journal of clinical microbiology*, v. 41, n. 5, p. 2242-2246, 2003.

LAVANIA, M., CHAUHAN, P. S., CHAUHAN, S. V. S., SINGH, H. B.; NAUTIYAL, C. S. Induction of plant defense enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Current microbiology*, v. 52, n. 5, p. 363-368, 2006.

LEACH, A. W.; MUMFORD, J. D. Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. *Environmental pollution*, v. 151, n. 1, p. 139-147, 2008.

LEIFERT, C.; WAITES, W. M.; NICHOLAS, J. R. Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. *Journal of Applied Microbiology*, v. 67, n. 4, p. 353-361, 1989.

LEITE, T. S.; CNOSSEN-FASSONI, A.; PEREIRA, O. L.; MIZUBUTI, E. S. G.; ARAÚJO, E. F.; QUEIROZ, M. V. Novel and highly diverse fungal endophytes in soybean revealed by the consortium of two different techniques. *Journal of Microbiology*, v. 51(1), p. 56-69, 2013.

LEVENE, Howard. Robust tests for equality of variances¹. *Contributions to probability and statistics: Essays in honor of Harold Hotelling*, v. 2, p. 278-292, 1960.

LIBBERT, E.; FISCHER, E.; DRAWERT, A.; SCHRÖUDER, R. Pathways of IAA production from tryptophan by plants and by their epiphytic bacteria: A comparison. *Physiologia Plantarum*, v. 23(2), p. 278-286, 1970.

LIGON, J. M.; HILL, D. S.; HAMMER, P. E.; TORKEWITZ, N. R.; HOFMANN, D.; KEMPF, H. J.; PÉE, K. H. V.. Natural products with antifungal activity from

Pseudomonas biocontrol bacteria. Pest Management Science, v. 56, n. 8, p. 688-695, 2000.

LIN, L., GUO, W., XING, Y., ZHANG, X., LI, Z., HU, C.; LI, S.; LI, Y. AN, Q. The actinobacterium *Microbacterium* sp. 16SH accepts pBBR1-based pPROBE vectors, forms biofilms, invades roots, and fixes N₂ associated with micropropagated sugarcane plants. Applied microbiology and biotechnology, v. 93, n. 3, p. 1185-1195, 2012.

LIRA-CADETE, L.; DE FARIAS, A. R. B.; DE SOUZA RAMOS, A. P.; DA COSTA, D. P., FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. Bioscience Journal, v. 28, n. 1, 2012.

LIU, L.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology, v. 85, n. 6, p. 695-698, 1995.

LIVERMORE, D. M. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. The Korean journal of internal medicine, v. 27, n. 2, p. 128-142, 2012.

LOOMAN, J.; CAMPBELL, J. B. Adaptation of Sorensen's K (1948) for estimating unit affinities in prairie vegetation. Ecology, v. 41, n. 3, p. 409-416, 1960.

MA, L.; CAO, Y. H.; CHENG, M. H.; HUANG, Y.; MO, M. H.; WANG, Y.; YANG, F. X. Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. Antonie van Leeuwenhoek, v. 103, n. 2, p. 299-312, 2013.

MA, Y. et al. Inoculation of Ni-resistant plant growth promoting bacterium *Psychrobacter* sp. strain SRS8 for the improvement of nickel phytoextraction by energy crops. International journal of phytoremediation, v. 13, n. 2, p. 126-139, 2010.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; MAFFIA, L. A.; FERREIRA, E. M.; BINOTI, D. H. B.; MAFIA, G. M. V.. Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. Tropical Plant Pathology, v. 34, n. 1, p. 10-17, 2009.

MAKI, C. S. Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.). 2006, 128p. Tese (Doutorado em Agronomia) – ESALQ, Piracicaba, SP, 2006.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas, v. I, p. 369-409, 1993.

MÁRQUEZ, L. M.; REDMAN, R. S.; RODRIGUEZ, R. J.; ROOSSINCK, M. J. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. Science, v. 315(5811), p. 513-515, 2007.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis—model and research methods. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 43, n. 5, p. 883-894, 2011.

MATSUOKA, Y.; VIGOUROUX, Y.; GOODMAN, M. M.; SANCHEZ, J.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99(9), p. 6080-6084, 2002.

MAURHOFER, M., REIMMANN, C., SCHMIDLI-SACHERER, P., HEEB, S., HAAS, D., DÉFAGO, G. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, v. 88(7), p. 678-684, 1998.

MCINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. *Canadian journal of microbiology*, v. 41, n. 10, p. 895-901, 1995.

MELHORANÇA, A. L. *et al.* Introdução e importância econômica do milho. *Embrapa Milho e Sorgo*, 2012. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_8ed/index.htm>. Acesso em: 14 ago. 2013.

MERCADO-BLANCO, J. *Pseudomonas* Strains that Exert Biocontrol of Plant Pathogens. In: *Pseudomonas*. Springer Netherlands, 2015. p. 121-172.

MICHÉ, L.; BATTISTONI, F.; GEMMER, S.; BELGHAZI, M.; REINHOLD-HUREK, B. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. *Molecular plant-microbe interactions*, v. 19(5), p. 502-511, 2006.

MIGNARD, S.; FLANDROIS, J. P. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *Journal of microbiological methods*, v. 67, n. 3, p. 574-581, 2006.

MILLER, S. A.; BEED, F. D.; HARMON, C. L. Plant disease diagnostic capabilities and networks. *Annual Review of Phytopathology*, v. 47, p. 15-38, 2009.

MIRLEAU, P., DELORME, S., PHILIPPOT, L., MEYER, J. M., MAZURIER, S., LEMANCEAU, P. Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. *FEMS microbiology ecology*, v. 34(1), p. 35-44, 2000.

MOCKAITIS, K.; ESTELLE, M. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 24, p. 55-80, 2008.

MOHAMED, E. A.; ABE, M.; GHANEM, K. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R.; NAKAGAWA, Y.; EL-HELOW, E. R. Diversity of *Bacillus* genotypes in soil samples from El-Omayed biosphere reserve in Egypt. 2013.

MONTAÑEZ, A., BLANCO, A. R., BARLOCCO, C., BERACOCHEA, M., SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. Applied Soil Ecology, v. 58, p. 21-28, 2012.

MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. (2009). Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ¹⁵N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. Biology and fertility of soils, v. 45(3), p. 253-263, 2009.

MORRIS, P. F.; BONE, E.; TYLER, B. M. Chemotropic and contact responses of *Phytophthora sojae* hyphae to soybean isoflavonoids and artificial substrates. Plant Physiology, v. 117, p. 1171–78, 1998.

M'PIGA, P., BELANGER, R. R., PAULITZ, T. C., BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 50(5), p. 301-320, 1997.

MÜLLER, C.; RIEDERER, M. Plant surface properties in chemical ecology. Journal of chemical ecology, v. 31, n. 11, p. 2621-2651, 2005.

MÜLLER, H.; WESTENDORF, C.; LEITNER, E.; CHERNIN, L.; RIEDEL, K.; SCHMIDT, S.; EBERL, L.; BERG, G. Quorum-sensing effects in the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* HRO-C48. FEMS microbiology ecology, V. 67(3), P. 468-478, 2009.

MURPHY, J. & RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica Chimica Acta, v. 27, p. 31-36, 1962.

NARSIAN, V.; SAMAHA, S. M. A. A.; PATEL, H. H. Rock phosphate dissolution by specific yeast. Indian Journal of Microbiology, v. 50, p.57–62, 2010.

NASSAR, A. H.; EL-TARABILY, K. A.; SIVASITHAMPARAM, K. Promotion of Plant Growth by an Auxin-Producing Isolate of the Yeast *Williopsis saturnus* Endophytic in Maize (*Zea mays* L.) Roots, Biology and Fertility of Soils, v. 42, no. 2, p. 97–108, 2005.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. FEMS Microbiology Letters, v. 170, p. 265–270.

NAVEED, M.; MITTER, B.; YOUSAF, S.; PASTAR, M.; AFZAL, M.; SESSITSCH, A. The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. Biology and fertility of soils, v. 50, n. 2, p. 249-262, 2014a.

NAVEED, M.; QURESHI, M. A.; ZAHIR, Z. A.; HUSSAIN, M. B.; SESSITSCH, A.; MITTER, B. L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Annals of Microbiology*, p. 1-9, 2014b.

NEILANDS, J. B. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiological sciences*, v. 1, n. 1, p. 9-14, 1984.

NELSON, BETH A.; RAIMADA, P.; LEON, A. F.; R. K. CRINKLAW, A.; JOLKOVSKY, E.; CRANE, J. C.; BERGSTROM, G. C.; M. W. Complete genome sequence for the *Fusarium* head blight antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* strain TrigoCor 1448. *Genome announcements*, v. 2, n. 2, p. e00219-14, 2014.

NIELSEN, T. H., SØRENSEN, D., TOBIASEN, C., ANDERSEN, J. B., CHRISTOPHERSEN, C., GIVSKOV, M., SØRENSEN, J. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas spp.* from the sugar beet rhizosphere. *Applied and environmental microbiology*, v. 68(7), p. 3416-3423, 2002.

NIFTAL & FAO. Legume inoculants and their use. 1984. Disponível em: <<http://www.ctahr.hawaii.edu/bnf/>>. Acesso em: 16 ago. 2013.

NUNES, A. P. F., TEIXEIRA, L. M., IORIO, N. L. P., BASTOS, C. C. R., DE SOUSA FONSECA, L., SOUTO-PADRÓN, T., & DOS SANTOS, K. R. N. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *International journal of antimicrobial agents*, v. 27, n. 4, p. 307-315, 2006.

OBLEDO, E. N., BARRAGÁN-BARRAGÁN, L. B., GUTIÉRREZ-GONZÁLEZ, P., RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, B. C., RAMÍREZ, J. J., & RODRÍGUEZ-GARAY, B. Increased photosynthetic efficiency generated by fungal symbiosis in *Agave victoria-reginae*. *Plant cell, tissue and organ culture*, v. 74(3), p. 237-241, 2003.

OH, N.; IN, M. Phytate degradation by *Leuconostoc mesenteroides* KC51 cultivation in soymilk. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, n. 13, 2009.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 26, n. 12, p. 1591-1601, 1994.

OLIVEIRA, C. A., ALVES, V. M. C., MARRIEL, I. E., GOMES, E. A., SCOTTI, M. R., CARNEIRO, N. P., GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 41(9), p. 1782-1787, 2009.

OLSTORPE, M.; SCHNÜRER, J.; PASSOTH, V. Screening of yeast strains for phytase activity. *FEMS Yeast Research*, v. 9, p. 478-488, 2009.

OMAR, S. A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 14, n. 2, p. 211-218, 1997.

ORDENTLICH, A.; ELAD, Y.; CHET, I. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology (USA)*, 1988.

OROLE, O. O.; ADEJUMO, T. O. Bacterial and fungal endophytes associated with grains and roots of maize. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, v. 3, p. 298-303, 2011.

OVIEDO, C.; RODRÍGUEZ, J. EDTA: the chelating agent under environmental scrutiny. *Quimica Nova*, v. 26, n. 6, p. 901-905, 2003.

PANDEY, A.; BRINGEL, F.; MEYER, J. Iron requirement and search for siderophores in lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 40, n. 5, p. 735-739, 1994.

PANDEY, P.; KANG, S. C.; MAHESHWARI, D. K. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Current Science*, v. 89, n. 1, p. 177-180, 2005.

PARTE, A. C. LPSN — list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic acids research*, p. gkt1111, 2013.

PAULA, M. A.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum spp.*), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Biology and fertility of soils*, v. 11, n. 2, p. 111-115, 1991.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. *Biociência*, Brasília, n. 29, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/edicoes/ed29.php>>. Acesso em: 10 ago. 2013.

PENG, X.; CHEN, H. Microbial oil accumulation and cellulase secretion of the endophytic fungi from oleaginous plants. *Annals of microbiology*, v. 57, n. 2, p. 239-242, 2007.

PEREIRA, S. I. A.; CASTRO, P. M. L. Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 24, p. 14110-14123, 2014.

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

PIERIK, R.; THOLEN, D.; POORTER, H.; VISSER, E. J.; VOESENEK, L. A. The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in plant science*, v. 11(4), p. 176-183, 2006.

PILEGGI, S. A. V. Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss. Por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico. 2006, 141 p. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2006.

PIMENTEL, D. Energy Production from Maize (Produkcja Energii z Kukurydzy). *Problemy Ekorożwoju - Problems of Sustainable Development*, v. 7, n. 2, p. 15-22, 2012.

PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, v. 8, n. 4, p. 151-156, 1989.

PRADHAN, N.; SUKLA, L. B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, v. 5 (10), p. 850-854, 2005.

QI, Y.; PATRA, G.; LIANG, X.; WILLIAMS, L. E.; ROSE, S.; REDKAR, R. J.; DELVECCHIO, V. G. Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*. *Applied and environmental microbiology*, v. 67, n. 8, p. 3720-3727, 2001.

R CORE TEAM. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

RAAIJMAKERS, J. M.; VLAMI, M.; DE SOUZA, J. T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 81, n. 1-4, p. 537-547, 2002.

RADZKI, W., MAÑERO, F. G., ALGAR, E., GARCÍA, J. L., GARCÍA-VILLARACO, A., SOLANO, B. R. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 104, p.321-330, 2013.

RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate acquisition. *Annual review of plant biology*, v. 50, n. 1, p. 665-693, 1999.

RAUPACH, G. S.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology*, v. 88, n. 11, p. 1158-1164, 1998.

REDDY, P. V.; LAM, C. K.; BELANGER, F. C. Mutualistic fungal endophytes express a proteinase that is homologous to proteases suspected to be important in fungal pathogenicity. *Plant Physiology*, v. 111, n. 4, p. 1209-1218, 1996.

REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, v. 298(5598), p. 1581-1581, 2002.

REINHOLD-HUREK, B.; MAES, T.; GEMMER, S.; VAN MONTAGU, M.; HUREK, T. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. BH72. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, v. 19, p. 181-188, 2006.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current opinion in plant biology*, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.

RENNIE, R. J. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 8-14, 1981.

RESENDE, A. A. Leveduras associadas a frutos da macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex mart): diversidade e caracterização quanto à produção de exoenzimas e fatores de crescimento. 192p. 2014. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2014.

RIBEIRO JÚNIOR, JOSÉ IVO. Análises estatísticas no Excel – guia prático. Editora UFV, Viçosa, 249 p., 2011.

RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N.. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). *Microbiological research*, v. 167, n. 2, p. 69-78, 2012.

RIBEIRO, Carlos Marcelo. Isolamento, seleção e caracterização de rizobactérias com potencial para promoção do crescimento em *Araucaria angustifolia*. 101 p. 2010. Dissertação de mestrado (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2010.

RICHARDSON, A. E.; HADOBAS, P. A. Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 509–516, 1997.

RICHERT, K.; BRAMBILLA, E.; STACKEBRANDT, E. The phylogenetic significance of peptidoglycan types: Molecular analysis of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* based upon sequence comparison of gyrB, rpoB, recA and ppk and 16SrRNA genes. *Systematic and applied microbiology*, v. 30, n. 2, p. 102-108, 2007.

RODRIGUEZ, H., FRAGA, R., GONZALEZ, T., BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and soil*, v. 287(1-2), p. 15-21, 2006.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology advances*, v. 17, n. 4, p. 319-339, 1999.

RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J.; VAN VOLKENBURGH, E.; HOY, M.; WRIGHT, L.; BECKWITH, F.; KIM, Y.; REDMAN, R. S. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME journal*, v. 2(4), p. 404-416, 2008.

RODRIGUEZ, R. J.; WHITE, J.; ARNOLD, A. E.; REDMAN, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, v. 182, n. 2, p. 314-330, 2009.

ROSA, L. H.; VAZ, A. B. M.; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C. A. Endo'hytic fungi associated with the Antarctic Grass *Deschampsia Antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biology*, v. 32, p. 161-167, 2009.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

RYAN, G. S.; HARPER, D. A. T.; WHALLEY, J. S. PALSTAT, *Statistics for Palaeontologist*. Chapman & Hall, London, 1995.

SAKIYAMA, C. C. H.; PAULA, E. M.; PEREIRA, P. C.; BORGES, A. C.; SILVA, D. O. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. *Letters in applied microbiology*, v. 33(2), p. 117-121, 2001.

SALEEM, M.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, S.; BHATTI, A. S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v. 34(10), p. 635-648, 2007.

SANTAMARÍA, J.; BAYMANM P. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, v. 50, p. 1-8.

SATOMI, M.; LA DUC, M. T.; VENKATESWARAN, K. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 56, n. 8, p. 1735-1740, 2006.

SAUER, A. V.; FIGUEIREDO, J.; BABA, V.; PEDRO, E.; MEIRELLES, W.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Sobrevivência de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho, em restos culturais de milho. In: Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28.; SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE A LAGARTA DO CARTUCHO, 4., 2010, Goiânia. Potencialidades, desafios e sustentabilidade: resumos expandidos. Goiânia: ABMS, 2010.

SCHIPPERS, A.; BOSECKER, K.; SPRÖER, C.; SCHUMANN, P. *Microbacterium oleivorans* sp. nov. and *Microbacterium hydrocarbonoxydans* sp. nov., novel crude-oil-degrading Gram-positive bacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 55, n. 2, p. 655-660, 2005.

SCHISLER, D. A. SLININGER, P. J.; BEHLE, R. W.; JACKSON, M. A. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. *Phytopathology*, v. 94, n. 11, p. 1267-1271, 2004.

SCHUMANN, P.; RAINEY, F. A.; BURGHARDT, J.; STACKEBRANDT, E.; WEISS, N. Reclassification of *Brevibacterium oxydans* (Chatelain and Second 1966) as *Microbacterium oxydans* comb. nov. *International journal of systematic bacteriology*, v. 49, n. 1, p. 175-177, 1999.

SERGEEVA, E.; LIAIMER, A.; BERGMAN, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta*, v. 215, n. 2, p. 229-238, 2002.

SESSITSCH, A., REITER, B., PFEIFER, U., & WILHELM, E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 39(1), p. 23-32, 2002.

SESSITSCH, A.; HARDOIM, P.; DÖRING, J.; WEILHARTER, A.; KRASE, A.; WOYKE, T.; MITTER, B.; HAUBERG-LOTTE, L.; FRIEDRICH, F.; RAHALKAR, M.; HUREK, T.; SARKAR, A.; BODROSSY, A., VAN OVERBEEL, L.; BRAR, D.; VAN ELSAS, J. D.; REINHOLD-HUREK, B. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 25, n. 1, p. 28-36, 2012.

SHAH, J. Plants under attack: systemic signals in defence. *Current opinion in plant biology*, v. 12, n. 4, p. 459-464, 2009.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, p. 591-611, 1965.

SHEDOVA, E., LIPASOVA, V., VELIKODVORSKAYA, G.; OVADIS, M.; CHERNIN, L.; KHMEL, I. Phytase activity and its regulation in a rhizospheric strain of *Serratia plymuthica*. *Folia microbiologica*, v. 53, n. 2, p. 110-114, 2008.

SHEN, Shu Yi. Bacterial Endophytes: Exploration of Methods and Analysis of Community Variation. 2013. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Ecologia e Biologia Evolutiva). Universidade de Toronto, Toronto, Canadá, 2013.

SIEZEN, Roland J. et al. Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from plants identifies mechanisms of adaptation to the plant niche. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 2, p. 424-436, 2008.

SIKORA, R.A. Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.*, v. 53/2b, p. 867-878, 1988.

SILVA, F. A. S. E.; DE AZEVEDO, C. A. V. Assistat computational program version for the Windows operating system. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais (Brazil)*, 2002.

SIMON, L. BOUSQUET, J.; LÉVESQUE, R. C.; LALONDE, M. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, p. 67-69, 1993.

SINGHAI, P. K.; SARMA, B. K.; SRIVASTAVA, J. S. Biological management of common scab of potato through *Pseudomonas* species and vermicompost. *Biological Control*, v. 57, n. 2, p. 150-157, 2011.

SIRRENBORG, A.; GÖBEL, C.; GROND, S.; CZEMPINSKI, N.; RATZINGER, A.; KARLOVSKY, P.; SANTOS, P.; FEUSSNER, I.; PAWLOWSKI, K. *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia plantarum*, v. 131(4), p. 581-589, 2007.

SMITS, T. H., REZZONICO, F., KAMBER, T., GOESMANN, A., ISHIMARU, C. A., STOCKWELL, V. O., FREY, J. E.; DUFFY, B. Genome sequence of the biocontrol agent *Pantoea vagans* strain C9-1. *Journal of bacteriology*, v. 192, n. 24, p. 6486-6487, 2010.

SOBRAL, J. K. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta. 108p. 2003. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 2003.

SOBRAL, J. K., ARAÚJO, W. L., MENDES, R., GERALDI, I. O., PIZZIRANI-KLEINER, A. A., & AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

SOUZA, J. T., DE BOER, M., DE WAARD, P., VAN BEEK, T. A., RAAIJMAKERS, J. M. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and environmental microbiology*, v. 69(12), p. 7161-7172, 2003.

SOWMYA, S.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B. Isolation, Identification and Characterization of *Curtobacterium* sp. YU-SS-C-67 for phosphate Solubilization and Uranium Tolerance. *International Research Journal of Biological Sciences*, v. 2, n. 12, p. 102-106, 2013.

SPAEPEN, S., DOBBELAERE, S., CROONENBORGH, A., & VANDERLEYDEN, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*, v. 312(1-2), p. 15-23, 2008.

SPEARMAN, Charles. Correlation calculated from faulty data. *British Journal of Psychology*, 1904-1920, v. 3, n. 3, p. 271-295, 1910.

STACKEBRANDT, ERKO, AND MICHAEL GOODFELLOW. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Son Ltd, 370 p., 1991.

STRZELCZYK, E.; POKOJSKA-BURDZIEJ, A. Production of auxins and gibberellin-like substances by mycorrhizal fungi, bacteria and actinomycetes

isolated from soil and the mycorrhizosphere of pine (*Pinus silvestris* L.). *Plant and Soil*, v. 81, n. 2, p. 185-194, 1984.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 162-167, 1998.

SUAREZ, D. E. C.; GIGON, A.; PUGA-FREITAS, R.; LAVELLE, P.; VELASQUEZ, E.; BLOUIN, M. Combined effects of earthworms and IAA-producing rhizobacteria on plant growth and development. *Applied Soil Ecology*, v. 80, p. 100-107, 2014.

SUN, H.; HE, Y.; XIAO, Q.; YE, R.; TIAN, Y. Isolation, characterization, and antimicrobial activity of endophytic bacteria from *Polygonum cuspidatum*. *African Journal of Microbiology Research*, v. 7, n. 16, p. 1496-1504, 2013.

SUN, L.; QIU, F.; ZHANG, X.; DAI, X.; DONG, X.; SONG, W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, v. 55, n. 3, p. 415-424, 2008.

SUTO, M.; TAKEBAYASHI, M.; SAITO, K.; TANAKA, M.; YOKOTA, A.; TOMITA, F. Endophytes as producers of xylanase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 93(1), p. 88-90, 2002.

SWARNALATHA, Y.; SAHA, B.; CHOUDARY, L. BIOACTIVE COMPOUND ANALYSIS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ENDOPHYTIC BACTERIAL EXTRACT FROM ADHATHODA BEDDOMEI. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 8, n. 1, 2015.

TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, AND KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; FABRA, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant and soil*, v. 329, n. 1-2, p. 421-431, 2010.

TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm *Trachycarpus fortunei* within and outside its natural geographic range. *New Phytology*, v. 142, p. 335-346, 1999.

THOMAS, P. & SOLY, T. A. Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa sp.*) cv. Grand Naine and the affinity of endophytes to the host. *Microbial ecology*, v. 58, n. 4, p. 952-964, 2009.

THRALL, P. H.; HOCHBERG, M. E.; BURDON, J. J.; BEVER, J. D. Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 22(3), p. 120-126, 2007.

TOGAWA, Roberto C.; BRÍGIDO, Marcelo Macedo. PHPH: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In: 1 st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology-IcoBiCoBi. Ribeirão Preto. 2003.

TON, J.; DAVISON, S.; VAN WEES, S. C.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. The Arabidopsis ISR1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant physiology*, v. 125(2), p. 652-661, 2001.

TORRES, M.; DOLCET, M. M.; SALA, N.; CANELA, R. Endophytic fungi associated with Mediterranean plants as a source of mycelium-bound lipases. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 51(11), p. 3328-3333, 2003.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C. M.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. The human microbiome project. *Nature*, v. 449(7164), p. 804-810, 2007.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Production, supply and distribution Online. 2015. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdQuery.aspx>>. Acessado em: 10 mar. 2015.

UNNO, Y., OKUBO, K., WASAKI, J., SHINANO, T., OSAKI, M. Plant growth promotion abilities and microscale bacterial dynamics in the rhizosphere of Lupin analysed by phytate utilization ability. *Environmental microbiology*, v. 7(3), p. 396-404, 2005.

VALENTINI, G.; GUIDOLIN, A. F.; DA CRUZ BALDISSERA, J. N.; COIMBRA, J. L. M. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: etiologia, detecção e medidas de controle. *Biotemas*, v. 23, n. 4, p. 1-8, 2010.

VAN OVERBEEK, L. & VAN ELSAS, J. D. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiology Ecology* 64, 283–296, 2008.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, v. 157, n. 3, p. 423-447, 2003.

VAZ, A. B. M.; BRANDÃO, L. R.; VIEIRA, M. L.; PIMENTA, P. B. M.; SOBRAL, G.; ROSA, L. H.; ROSA, C. A. Diversity and antimicrobial activity of fungal endophyte communities associated with plants of Brazilian savanna ecosystems. *African Journal of Microbiology Research*, v. 6(13), p. 3173-3185, 2012.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, v. 5, p. 25-40, 1994.

WANG, X. Q., BI, T., LI, X. D., ZHANG, L. Q.; LU, S. E. First Report of Corn Whorl Rot Caused by *Serratia marcescens* in China. *Journal of Phytopathology*, 2015.

WELLER, David M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*, v. 97, n. 2, p. 250-256, 2007.

WEYENS, N., VAN DER LELIE, D., TAGHAVI, S.; NEWMAN, L.; VANGRONSVELD, J. Exploiting plant-microbe partnerships to improve biomass production and remediation. *Trends in biotechnology*, v. 27, n. 10, p. 591-598, 2009.

WHITE, P. J.; BROWN, P. H. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, v. 105, n. 7, p. 1073-1080, 2010.

WHITE, T.J., T. BRUNS, S. LEE, AND J.W. TAYLOR. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. INNIS, M.A., D.H. GELFAND, J.J. SNINSKY, AND T.J. WHITE. Academic Press, Inc., New York, p. 315-322, 1990.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, v. 69, p. 99-151, 1999.

WIETZ, M., MÅNSSON, M., BOWMAN, J. S., BLOM, N., NG, Y.; GRAM, L. Wide distribution of closely related, antibiotic-producing *Arthrobacter* strains throughout the Arctic Ocean. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 6, p. 2039-2042, 2012.

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

ZAKHIA, F.; JEDER, H.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; DE LAJUDIE, P. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for *nifH*-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial ecology*, v. 51, n. 3, p. 375-393, 2006.

ZEHNDER, G., KLOEPPER, J., YAO, C., WEI, G. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Economic Entomology*, v. 90(2), p. 391-396, 1997.

ZHANG, Y. F.; HE, L. Y.; CHEN, Z. J.; ZHANG, W. H.; WANG, Q. Y.; QIAN, M.; SHENG, X. F. Characterization of lead-resistant and ACC deaminase-producing endophytic bacteria and their potential in promoting lead accumulation of rape. *Journal of hazardous materials*, v. 186(2), p. 1720-1725, 2011.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, v. 61, p. 49, 2010.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria

from agronomic crops and prairie plants. *Applied and environmental microbiology*, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

ZUO, Y.; ZHANG, F.. Soil and crop management strategies to prevent iron deficiency in crops. *Plant and soil*, v. 339, n. 1-2, p. 83-95, 2011.

APÊNDICE A: Tabela de densidades de bactérias endofíticas apresentadas em cada região morfológica das plantas, para cada tratamento (presença de adubação fosfatada).

DENSIDADE (UFC/ML)				
TRATAMENTO	PLANTA	SEIVA*	FOLHAS	RAÍZES
FOSFATADO	A	33100	11600	1668000
FOSFATADO	B		15900	1816000
FOSFATADO	C		16500	608000
FOSFATADO	A	6500	88800	7107
FOSFATADO	B		18600	154133
FOSFATADO	C		75700	92867
FOSFATADO	A	10800	162800	25800
FOSFATADO	B		18800	1040000
FOSFATADO	C		1008000	169000
NÃO FOSFATADO	A	4400	32900	2452000
NÃO FOSFATADO	B		133200	832000
NÃO FOSFATADO	C		218000	277733
NÃO FOSFATADO	A	9600	348000	33000
NÃO FOSFATADO	B		54000	58800
NÃO FOSFATADO	C		204000	286533
NÃO FOSFATADO	A	27900	72400	8880
NÃO FOSFATADO	B		14400	103200
NÃO FOSFATADO	C		1872000	5800

*As amostras de seiva de cada bloco foram agrupadas em uma amostra composta, devido ao baixo rendimento da seiva recuperada.

APÊNDICE B: Modelos lineares generalizados (MLGs) de análise do efeito dos tratamentos e partes da planta sobre a produção dos diferentes fatores de crescimento vegetal e a densidade bacteriana obtida no isolamento.

Planilha A: Seleção de modelos baseado no ΔAIC . MLGs como erros gama e função de ligação de identidade. Os modelos selecionados ($\Delta AIC < 2$) estão destacados em negrito.

Models	Predicted terms included	AIC	ΔAIC
<i>Pi (mg/L)</i>			
M1	Fosfato+Parte	1076,90	2,80
M2	Fosfato:Parte	1074,10	0,00
M3	Fosfato	1117,00	42,90
M4	Parte	1100,10	26,00
<i>AIA</i>			
M1	Fosfato+Parte	1087.60	13.10
M2	Fosfato:Parte	1074.50	0.00
M3	Fosfato	1126.70	52.20
M4	Parte	1086.20	11.70
<i>Sideróforos</i>			
M1	Fosfato+Parte	308,71	0,00
M2	Fosfato:Parte	308,71	0,00
M3	Fosfato	311,21	2,50
M4	Parte	316,95	8,24
<i>Densidade</i>			
M1	Fosfato+Parte	74,97	1,96
M2	Fosfato:Parte	76,25	3,23
M3	Fosfato	82,38	9,37
M4	Parte	73,02	0,00

Planilha B: Parâmetros fixados dos modelos selecionados. MLGs com erros gama e função de ligação de identidade. Os modelos incluem o efeito dos tratamentos de adubação fosfatada (presença ou não) e partes da planta (seiva, folhas e raízes), bem como efeito de variáveis fixadas (Planilha A).

Hypothesis and model	df	Deviance Residual	df Residual	Deviance	Pr(>Chi)	AIC
<i>Pi (mg/L)</i>						
NULL			158	14,3406		1074,10
Fosfato	1	1,26772	157	13,0729	6,81E-06	
Parte	2	3,12571	155	9,9472	1,44E-11	
Fosfato:Parte	2	0,41106	153	9,5361	0,03753	
<i>AIA</i>						
NULL			296	30.3890		1074.50
Fosfato	1	0.4202	295	29.9690	0.0240	
Parte	2	3.9927	293	25.9760	0.0000	
Fosfato:Parte	2	1.4296	291	24.5470	0.0002	
<i>Sideróforos</i>						
NULL			122	0,010		308,71
Fosfato	1	0,0015	121	0,008	0,000	
Parte	1	0,0003	120	0,008	0,034	
<i>Densidade</i>						
NULL			41	0,3253		74,97
Fosfato	1	0,0002	40	0,3250	0,8514	
Parte	2	0,0772	38	0,2478	0,0024	

APÊNDICE C: Tabela de identificações moleculares dos isolados endofíticos de milho, mostrando o tamanho (pb) da sequência de nucleotídeos utilizada para a identificação, as porcentagens de cobertura e identidade com as espécies tipo, bem como o número de acesso dessas no *GenBank*.

Amostra	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Identificação	Nº acesso
ST2-19	694	100	100	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	D14500.1
FT2C-13	733	100	99	<i>Alcaligenes faecalis</i>	AB680368.1
RP1B-210	678	100	100	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	CP001341.1
FT2A-72	241	100	99	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	X80743.1
RT2A-16	723	100	99	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i>	X80743.1
RT1A-01	611	100	100	<i>Arthrobacter boritolerans</i>	KJ529047.1
RT3C-14	531	100	100	<i>Bacillus aryabhatai</i>	EF114313.2
FP1A-26	753	100	100	<i>Bacillus gibsonii</i>	X76446.1
RT2A-015	540	100	100	<i>Bacillus gibsonii</i>	X76446.1
RT2A-017	800	100	100	<i>Bacillus gibsonii</i>	X76446.1
SP2-13	736	100	100	<i>Bacillus gibsonii</i>	EF433410.1
SP2-15	530	100	99	<i>Bacillus gibsonii</i>	EF433410.1
FT2A-25	705	100	100	<i>Bacillus ginsengi</i>	EF371375.1
RT2B-13	589	100	100	<i>Bacillus pumilus</i>	AY456263.1
RT2A-010	568	100	100	<i>Bacillus safensis</i>	LK985476.1
RP3B-01	561	100	100	<i>Bacillus samanii</i>	FN433015.1
FP2C-32	303	100	100	<i>Bacillus sp.</i>	KC150855.1
RT2A-12	445	100	100	<i>Bacillus sp.</i>	KJ812208.1
RT3B-22	540	100	100	<i>Bacillus sp.</i>	KJ826575.1
RT3C-11	535	100	100	<i>Bacillus sp.</i>	KJ812208.1
RT3C-21	543	100	100	<i>Bacillus sp.</i>	KP004439.1

Amostra	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Identificação	N° acesso
SP3-11	526	100	100	<i>Bacillus subtilis</i>	AJ276351.1
FT1C-61	489	100	100	<i>Bacillus subtilis</i>	AJ276351.1
RP3C-01	672	100	100	<i>Bacillus subtilis</i>	AJ276351.1
RT2C-11	594	100	100	<i>Bacillus subtilis</i>	AJ276351.1
RP3B-11	495	100	100	<i>Bacillus toyonensis</i>	CP006863.1
FP3B-17	605	100	100	<i>Curtobacterium albidum</i>	AB046363.1
FT1A-24	742	100	100	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	AJ312209.1
FP1A-11	487	100	100	<i>Curtobacterium sp.</i>	AB759080.1
FP1A-19	619	100	100	<i>Curtobacterium sp.</i>	NR_114967.1
FP1B-12	573	100	100	<i>Curtobacterium sp.</i>	KJ607223.1
FP1C-32	366	100	99	<i>Curtobacterium sp.</i>	KJ184990.1
FP3C-32	252	100	100	<i>Curtobacterium sp.</i>	KJ459006.1
FT1A-11	546	100	100	<i>Enterobacter sp.</i>	KM406451.1
RP1A-211	530	100	99	<i>Enterobacter sp.</i>	KF307673.1
RP1A-34	527	100	99	<i>Enterobacter sp.</i>	KM104317.1
RP1C-120	501	100	99	<i>Enterobacter sp.</i>	KF307673.1
RP2C-13	527	100	99	<i>Enterobacter sp.</i>	KM538690.1
RP2C-34	573	100	99	<i>Enterobacter sp.</i>	KF307673.1
RP3B-18	529	100	99	<i>Enterobacter sp.</i>	KM538690.1
RT1C-22	532	100	100	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	AB680246.1
RP1A-01 ^a	555	100	100	<i>Exiguobacterium indicum</i>	AJ846291.1
RT3B-41	624	100	100	<i>Flavobacterium acidificum</i>	JX986959.1
FP2C-21	616	100	100	<i>Klebsiella variicola</i>	AJ783916.1
FT3C-41	691	100	99	<i>Kocuria palustres</i>	Y16263.1
FT2A-21	541	100	100	<i>Kocuria turfanensis</i>	DQ531634.2
FP1A-25	567	100	100	<i>Lactococcus lactis</i>	AB100803.1

Amostra	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Identificação	N° acesso
FP1B-11	531	100	100	<i>Lactococcus lactis</i>	AB100803.1
FP1C-22	665	100	100	<i>Lactococcus lactis</i>	AB100803.1
FP2A-21	309	100	100	<i>Lactococcus lactis</i>	AB100803.1
FP2B-25	605	100	100	<i>Lactococcus lactis</i>	AB100803.1
FP3B-16	628	100	100	<i>Lactococcus lactis</i>	AB100803.1
FT2B-11	687	100	100	<i>Lactococcus lactis</i>	AB100803.1
RP2C-33	493	100	100	<i>Lactococcus lactis</i>	AB100803.1
RP2B-17	382	100	100	<i>Lactococcus lactis</i>	AB100803.1
RT1C-214	592	100	100	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	AB023237.1
RT3A-19	731	100	99	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	AB023237.1
RP1A-35	514	100	99	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	AB904779.1
RP2B-113	543	100	99	<i>Leuconostoc sp.</i>	AB904779.1
ST2-111	526	100	100	<i>Microbacterium binotii</i>	EF567306.1
RT2B-25	560	100	99	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	Y17234.1
SP3-12	508	100	100	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	Y17234.1
FP3A-12	295	100	99	<i>Microbacterium sp.</i>	KJ648175.1
FP3B-12	320	100	99	<i>Microbacterium sp.</i>	KJ185039.1
FP3B-13	587	100	100	<i>Microbacterium sp.</i>	KF534779.1
FT1A-13	294	100	100	<i>Microbacterium sp.</i>	GU086414.1
FT2A-24	372	100	99	<i>Microbacterium sp.</i>	KJ778662.1
RP2B-18	443	100	100	<i>Microbacterium sp.</i>	KJ542133.1
SP2-110	558	100	100	<i>Microbacterium sp.</i>	KC788108.1
SP2-14	448	100	99	<i>Microbacterium sp.</i>	KJ184984.1
SP2-18	549	100	99	<i>Microbacterium sp.</i>	AB004722.1
SP2-19	542	100	99	<i>Microbacterium sp.</i>	KJ184984.1
SP2-22	580	100	100	<i>Microbacterium sp.</i>	HE681737.1

Amostra	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Identificação	N° acesso
SP2-23	350	100	99	<i>Microbacterium sp.</i>	KJ782627.1
SP2-24	517	100	100	<i>Microbacterium sp.</i>	KJ567112.1
ST2-110	360	100	99	<i>Microbacterium sp.</i>	KJ200387.1
ST2-15	501	100	99	<i>Microbacterium sp.</i>	KJ472816.1
ST2-22	376	100	99	<i>Microbacterium sp.</i>	KJ546452.1
ST2-23	474	100	100	<i>Microbacterium sp.</i>	JQ659823.1
ST3-23	399	100	99	<i>Microbacterium sp.</i>	KF241157.1
FP1A-12	531	100	100	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445.1
FT1A-22	360	100	100	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445.1
FT1B-21	624	100	100	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445.1
SP2-21	532	100	100	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445.1
ST2-21	609	100	100	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445.1
FT3B-15	709	100	100	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445.1
FP1A-21	528	100	100	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	FJ214355.2
FP1A-16	516	100	100	<i>Obesumbacterium proteus</i>	AJ233422.1
RP1C-25	551	100	100	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	AJ716019.1
RT3B-34	570	100	99	<i>Paenibacillus tundrae</i>	EU558284.1
FT1B-24	738	100	100	<i>Pantoea ananatis</i>	U80196.1
FP2B-27	491	100	100	<i>Pantoea sp.</i>	KF912872.1
FT2C-22	331	100	99	<i>Pantoea sp.</i>	KM091726.1
RP3C-16	582	100	100	<i>Pantoea sp.</i>	KF475803.1
FP2B-11	381	100	100	<i>Pantoea vagans</i>	AY173021
ST2-14	496	100	100	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	X77440.1
ST3-110	554	100	99	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	X77440.1
ST3-13	752	100	99	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	AB046999
RT3C-31	509	100	100	<i>Pseudomonas koreensis</i>	AF468452.1

Amostra	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Identificação	N° acesso
RT1C-219	616	100	100	<i>Pseudomonas mosselii</i>	AF072688.2
ST2-18	553	100	100	<i>Pseudomonas mosselii</i>	AF072688
RP2A-23	505	100	100	<i>Pseudomonas protegens</i>	AJ278812.1
FP3A-13	291	100	99	<i>Pseudomonas sp.</i>	KJ601750.1
RT3A-28	508	100	100	<i>Pseudomonas sp.</i>	KF439821.1
RT3B-36	477	100	100	<i>Pseudomonas sp.</i>	KF439821.2
RT3C-02	628	100	100	<i>Pseudomonas sp.</i>	D84020.1
RT3C-111	529	100	100	<i>Pseudomonas sp.</i>	AM293565.1
ST3-24	618	100	100	<i>Pseudomonas sp.</i>	EU103629.2
ST3-16	429	100	100	<i>Psychrobacter faecalis</i>	AJ421528.1
FP2B-23	580	100	100	<i>Psychrobacter faecalis</i>	AJ421528.1
FT2C-11	689	100	100	<i>Psychrobacter faecalis</i>	AJ421528.1
FT1B-23	701	100	100	<i>Psychrobacter pulmonis</i>	HQ698579.1
RP3B-211	514	100	100	<i>Rhizobium pusense</i>	FJ969841.2
FT1A-16	404	100	99	<i>Rhodococcus sp.</i>	HG942152.1
ST3-22	297	100	100	<i>Rhodococcus sp.</i>	KJ598030.1
RP2C-01	556	100	100	<i>Serratia marcescens</i>	AJ233431.1
RT1A-02	539	100	100	<i>Serratia marcescens</i>	AJ233431.1
RT2A-01	561	100	100	<i>Serratia marcescens</i>	AJ233431.1
RP1A-01B	369	100	100	<i>Serratia sp.</i>	KM091723.1
RP3A-012	305	100	99	<i>Serratia sp.</i>	KM091723.1
FP1C-62	627	100	100	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AB681292.1
FP3A-21	554	100	100	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AB681292.1
FT1B-61	554	100	100	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AB681292.1
FT2A-71	627	100	100	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AB681292.1

Amostra	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	Identidade (%)	Identificação	N° acesso
FT3A-51	585	100	100	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AB681292.1
FT3A-52	375	100	100	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AB681292.1
RT2C-14	559	100	100	<i>Staphylococcus equorum</i>	AB009939.1
ST2-24	520	100	100	<i>Staphylococcus equorum</i>	AB009939.1
FP3C-31	319	100	100	<i>Staphylococcus sp.</i>	HG942161.1
FT2A-22	373	100	100	<i>Staphylococcus sp.</i>	KJ956665.1
FP3A-11	564	100	100	<i>Staphylococcus warneri</i>	L37603.1
FT3C-14	437	100	100	<i>Staphylococcus warneri</i>	L37603.1
FP1C-13	559	100	99	Enterobacteriaceae	KM456219.1
RP1A-37	513	100	99	Enterobacteriaceae	AB749211.1

As iniciais dos isolados indicam se eles foram isolados da seiva (S), folhas (F) ou raízes (R) do milho. O segundo dígito indica se eles foram isolados do tratamento fosfatado (T) ou não fosfatado (P).

APÊNDICE D: Testes do χ^2 (FO: frequências observadas; FE: frequências esperadas) para as seguintes hipóteses:

1.

Hipótese nula: Tratamentos de adubação fosfatada não apresentam efeito sobre a frequência das bactérias endofíticas isoladas

	FO	H ₀	FE	Alfa	
					0,05
Fosf	84	1	89	K	2
Não fosf	94	1	89	k-1	1
	178	2	178	χ^2 cal	0,561797753
				χ^2 tab	3,841458821
				Decisão	Não rejeitar Ho
				Signif	0,453536806
					0,453536806
				Decisão	Não rejeitar Ho

2.

Hipótese nula: Partes da planta não apresentam efeito sobre a frequência das bactérias isoladas

	FO	H ₀	FE	Alfa	
					0,01
Seiva	33	1	59,33333	K	3
Folha	65	1	59,33333	k-1	2
Raiz	80	1	59,33333	χ^2 yates	18,55196629
	178	3		χ^2 tab	9,210340372
FO-FE				Decisão	Rejeitar Ho
26,33333				Signif	9,36465E-05
5,666667					6,04627E-05
20,66667				Decisão	Rejeitar Ho

3.

Hipótese nula: populações de folhas e raízes são equivalentes entre si

	FO	H ₀	FE	Alfa	
					0,05
Folha	65	1	72,5	K	2
Raíz	80	1	72,5	k-1	1
	145	2	145	χ^2 cal	1,551724138
				χ^2 tab	3,841458821
				Decisão	Não rejeitar Ho
				Signif	0,212881092
					0,212881092
				Decisão	Não rejeitar Ho

4.

Hipótese nula: proporção de bactérias solubilizadoras de fosfato é a mesma dos isolados totais

	FO	Totais	FE	Alfa		0,05
Seiva	6	33	10,19663	K		3
Folha	17	65	20,08427	k-1		2
Raiz	32	80	24,7191	χ^2 cal	4,345403687	
	55	178		χ^2 tab	5,991464547	
				Decisão	Não rejeitar Ho	
				Signif	0,113869543	
					0,113869543	
				Decisão	Não rejeitar Ho	

5.

Hipótese nula: Frequência de solubilizadores de fosfato inorgânico é proporcional a pop. total em relação aos tratamentos de adubação

	FO	Totais	FE	Alfa		0,05
Fosf	25	84	25,95506	K		2
Não fosf	30	94	29,04494	k-1		1
	55	178		55 χ^2 cal	0,066546928	
				χ^2 tab	3,841458821	
				Decisão	Não rejeitar Ho	
				Signif	0,796432443	
					0,796432443	
				Decisão	Não rejeitar Ho	

6.

Hipótese nula: proporção de bactérias endofíticas produtoras de AIA é a mesma dos isolados totais

	FO	Totais	FE	alfa		0,05
Seiva	29	33	18,72472	k		3
Folha	27	65	36,88202	k-1		2
Raiz	45	80	45,39326	χ^2 Yates	7,490050111	
	101	178		χ^2 tab	5,991464547	
				Decisão	Rejeitar Ho	
				Signif	0,023635037	
					0,01584528	
				Decisão	Rejeitar Ho	

7.

Hipótese nula: população de produtores de AIA é proporcional à população total em relação aos tratamentos de adubação fosfatada

	FO	Totais	FE	alfa		0,05
Fosf	36	84	47,66292	k		2
Não fosf	65	94	53,33708	k-1		1
	101	178		101 χ^2 cal	4,950706963	
				χ^2 tab	3,841458821	
				Decisão	Rejeitar Ho	
				Signif	0,026080002	
					0,020089102	
				Decisão	Rejeitar Ho	

8.

Hipótese nula: proporção de bactérias de folhas e raízes produtoras de AIA é a mesma dos isolados totais

	FO	Totais	FE	Alfa	0,05
				K	2
Folha	27	65	32,72414	k-1	1
Raiz	46	80	40,27586	χ^2 cal	1,814805058
	73	145	73	χ^2 tab	3,841458821
				Decisão	Não rejeitar Ho
				Signif	0,177932891
					0,177932891
				Decisão	Não rejeitar Ho

9.

Hipótese nula: proporção de bactérias antagonistas é a mesma dos isolados totais

	FO	Totais	FE	Alfa	0,05
Seiva	7	33	5,005618	K	3
Folha	5	65	9,859551	k-1	2
Raiz	15	80	12,13483	χ^2 cal	3,866280325
	27	178		χ^2 tab	5,991464547
				Decisão	Não rejeitar Ho
				Signif	0,144693124
					0,144693124
				Decisão	Não rejeitar Ho

10.

Hipótese: população de antagonistas é proporcional à população total em relação aos tratamentos de adubação fosfatada

	FO	Totais	FE	alfa	0,05
Fosf	16	84	12,26966	k	2
Não fosf	10	94	13,73034	k-1	1
	26	178	26	χ^2 cal	2,147611254
				χ^2 tab	3,841458821
				Decisão	Não rejeitar Ho
				Signif	0,1427919
					0,1427919
				Decisão	Não rejeitar Ho

11.

Hipótese: população de antagonistas com atividade antibacteriana é proporcional à população de antifúngicos

	FO	FE	alfa	0,05
Antibact	15	17	K	2
Antifung	19	17	k-1	1
	34	34	χ^2 cal	0,470588235
			χ^2 tab	3,841458821
			Decisão	Não rejeitar Ho
			Signif	0,492716677
				0,492716677
			Decisão	Não rejeitar Ho

12.

Hipótese: pop. de antagonistas com atividade antibacteriana é proporcional à pop. total em relação aos tratamentos de adubação

	FO	Totais	FE	Alfa		0,05
Fosf	9	84	7,078652	K		2
Não fosf	6	94	7,921348	k-1		1
	15	178		15	χ^2 cal	0,987537994
					χ^2 tab	3,841458821
					Decisão	Não rejeitar Ho
					Signif	0,320344856
						0,320344856
					Decisão	Não rejeitar Ho

13.

Hipótese nula: pop. de antagonistas com atividade antifúngica é proporcional à pop. total em relação aos tratamentos de adubação

	FO	Totais	FE	Alfa		0,05
Fosf	13	84	8,966292	K		2
Não fosf	6	94	10,03371	k-1		1
	19	178		19	χ^2 cal	3,436276862
					χ^2 tab	3,841458821
					Decisão	Não rejeitar Ho
					Signif	0,063779267
						0,063779267
					Decisão	Não rejeitar Ho

14.

Hipótese nula: proporção de endofíticos mineralizadores de fitato é a mesma dos isolados totais

	FO	Totais	FE	alfa		0,01
Seiva	7	33	13,90449	k		3
Folha	15	65	27,38764	k-1		2
Raiz	53	80	33,70787	χ^2 Yates		18,58640967
	75	178		χ^2 tab		9,210340372
				Decisão		Rejeitar Ho
				Signif		9,20476E-05
						4,37707E-05
				Decisão		Rejeitar Ho

15.

Hipótese nula: população de mineralizadores de fitato é proporcional à população total em relação aos tratamentos de adubação fosfatada

	FO	Totais	FE	alfa		0,05
Fosf	38	84	35,39326	k		2
Não fosf	37	94	39,60674	k-1		1
	75	178		75	χ^2 cal	0,363552854
					χ^2 tab	3,841458821
					Decisão	Não rejeitar Ho
					Signif	0,546539662
						0,546539662
					Decisão	Não rejeitar Ho

16.

Hipótese nula: proporção de mineralizadores de fitato da seiva e folhas é a mesma dos isolados totais

	FO	Totais	FE	Alfa	0,05
Seiva	7	33	7,408163	K	2
Folha	15	65	14,59184	k-1	1
	22	98		22	χ^2 cal
					0,033905488
					χ^2 tab
					3,841458821
				Decisão	Não rejeitar Ho
				Signif	0,853907997
					0,853907997
				Decisão	Não rejeitar Ho

17.

Hipótese nula: proporção de produtores de sideróforos da seiva e folhas é a mesma dos isolados totais

	FO	Totais	FE	Alfa	0,05
Seiva	14	33	13,80612	K	2
Folha	27	65	27,19388	k-1	1
	41	98		41	χ^2 cal
					0,004104838
					χ^2 tab
					3,841458821
				Decisão	Não rejeitar Ho
				Signif	0,948915276
					0,948915276
				Decisão	Não rejeitar Ho

18.

Hipótese nula: população de produtores de sideróforos é proporcional à população total em relação aos tratamentos

	FO	FE	alfa	0,05
Fosf	12	1	20,5	k
Não fosf	29	1	20,5	k-1
	41	2	41	χ^2 yates
				6,243902439
				χ^2 tab
				3,841458821
				Decisão
				Rejeitar Ho
				Signif
				0,012462158
				0,007931924
				Decisão
				Rejeitar Ho

19.

H₀: pop. de promotoras de crescimento vegetal (exceto produtoras de sideróforos) é proporcional à pop. total em relação aos tratamentos

	FO	Totais	FE	alfa	0,05
Fosf	61	84	63,70787	k	2
Não fosf	74	94	71,29213	k-1	1
	135	178		135	χ^2 cal
					0,217948141
					χ^2 tab
					3,841458821
				Decisão	Não rejeitar Ho
				Signif	0,640607799
					0,640607799
				Decisão	Não rejeitar Ho

20.

Hipótese: proporção de promotoras de crescimento vegetal (exceto produtoras de sideróforos) é proporcional à população total

	FO	Totais	FE	Alfa	0,05
Seiva	29	33	25,02809	K	3
Folha	34	65	49,29775	k-1	2
Raiz	72	80	60,67416	χ^2 Yates	6,855091621
	135	178		χ^2 tab	5,991464547
FO-FE				Decisão	Rejeitar Ho
3,97191				Signif	0,032466522
15,29775					0,023616853
11,32584				Decisão	Rejeitar Ho

21.

Hipótese: proporção de promotoras de crescimento vegetal (exceto produtoras de sideróforos) é proporcional à população total

	FO	Totais	FE	Alfa	0,05
Seiva	29	33	29,49558	K	2
Raiz	72	80	71,50442	k-1	1
	101	113	101	χ^2 cal	0,011761176
				χ^2 tab	3,841458821
				Decisão	Não rejeitar Ho
				Signif	0,913639569
					0,913639569
				Decisão	Não rejeitar Ho

22.

Hipótese: proporção de promotoras de crescimento vegetal (exceto produtoras de sideróforos) é proporcional à população total

	FO	FE	alfa	0,053	
Seiva	29	33	21,21429	k	2
Folha	34	65	41,78571	k-1	1
	63	98	63	χ^2 Yates	3,772494172
				χ^2 tab	3,743918986
FO-FE				Decisão	Rejeitar Ho
7,785714				Signif	0,052101887
7,785714					0,037932309
				Decisão	Rejeitar Ho

23.

Hipótese: proporção de promotoras de crescimento vegetal (exceto produtoras de sideróforos) é proporcional à população total

	FO	FE	Alfa	0,02	
Raiz	72	80	58,48276	K	2
Folha	34	65	47,51724	k-1	1
	106	145	106	χ^2 Yates	6,463454735
				χ^2 tab	5,411894431
FO-FE				Decisão	Rejeitar Ho
13,51724				Signif	0,011011535
13,51724					0,008290969
				Decisão	Rejeitar Ho

24.

Hipótese: proporção de promotoras de crescimento vegetal (incluindo sideróforos, exceto raíz) é proporcional à população total

	FO	Totais	FE	Alfa		0,05
Seiva	29	33	24,58163	K		2
Folha	44	65	48,41837	k-1		1
	73	98		73	χ^2 cal	1,197362455
					χ^2 tab	3,841458821
				Decisão	Não rejeitar Ho	
				Signif	0,273849477	
					0,273849477	
				Decisão	Não rejeitar Ho	

25.

Hipótese: pop. de promot. de cresc. vegetal (incluindo sideróforos, exceto raízes) é proporcional à pop. total em relação aos tratamentos

	FO	Totais	FE	Alfa		0,05
Fosf	29	84	34,44944	K		2
Não fosf	44	94	38,55056	k-1		1
	73	178		73	χ^2 cal	1,632350696
					χ^2 tab	3,841458821
				Decisão	Não rejeitar Ho	
				Signif	0,201378222	
					0,201378222	
				Decisão	Não rejeitar Ho	

26.

Hipótese: proporção de promotoras de crescimento vegetal (exceto produtoras de AIA e isolados de raíz) é proporcional à população total

	FO	Totais	FE	alfa		0,05
Seiva	20	33	19,53061	k		2
Folha	38	65	38,46939	k-1		1
	58	98		58	χ^2 cal	0,017008279
					χ^2 tab	3,841458821
				Decisão	Não rejeitar Ho	
				Signif	0,896237472	
					0,896237472	
				Decisão	Não rejeitar Ho	

27.

Hipótese: proporção de promotoras de crescimento vegetal (exceto mineralizadoras e isolados de seiva) é proporcional à população total

	FO	Totais	FE	alfa		0,05
Raíz	61	80	51,86207	k		2
Folha	33	65	42,13793	k-1		1
	94	145		94	χ^2 cal	3,591704173
					χ^2 tab	3,841458821
				Decisão	Não rejeitar Ho	
				Signif	0,058068666	
					0,058068666	
				Decisão	Não rejeitar Ho	

APÊNDICE E: Agrupamento de *k-means*:

1. Agrupamento das variáveis de densidade bacteriana obtidas no isolamento;

Tratamento (adubação)	Planta	Parte da planta	Densidade (UFC/g ou mL)	Cluster
Fosfatado	C	Folha	1008000	1
Não fosfatado	A	Folha	348000	1
Não fosfatado	C	Folha	1872000	1
Fosfatado	A	Raíz	1668000	1
Fosfatado	B	Raíz	1816000	1
Fosfatado	C	Raíz	608000	1
Fosfatado	B	Raíz	1040000	1
Não fosfatado	A	Raíz	2452000	1
Não fosfatado	B	Raíz	832000	1
Fosfatado	A	Folha	88800	2
Fosfatado	C	Folha	75700	2
Fosfatado	A	Folha	162800	2
Não fosfatado	B	Folha	133200	2
Não fosfatado	C	Folha	218000	2
Não fosfatado	B	Folha	54000	2
Não fosfatado	C	Folha	204000	2
Não fosfatado	A	Folha	72400	2
Fosfatado	B	Raíz	154133	2
Fosfatado	C	Raíz	92867	2
Fosfatado	C	Raíz	169000	2
Não fosfatado	C	Raíz	277733	2
Não fosfatado	B	Raíz	58800	2
Não fosfatado	C	Raíz	286533	2
Não fosfatado	B	Raíz	103200	2
Fosfatado	A	Folha	11600	3
Fosfatado	B	Folha	15900	3
Fosfatado	C	Folha	16500	3
Fosfatado	B	Folha	18600	3
Fosfatado	B	Folha	18800	3
Não fosfatado	A	Folha	32900	3
Não fosfatado	B	Folha	14400	3
Fosfatado	A	Raíz	7107	3
Fosfatado	A	Raíz	25800	3
Não fosfatado	A	Raíz	33000	3
Não fosfatado	A	Raíz	8880	3
Não fosfatado	C	Raíz	5800	3
Fosfatado	A	Seiva	33100	3
Fosfatado	B	Seiva	6500	3
Fosfatado	C	Seiva	10800	3
Não fosfatado	A	Seiva	4400	3
Não fosfatado	B	Seiva	9600	3
Não fosfatado	C	Seiva	27900	3

2. Agrupamento dos isolados em relação às taxas de produção de ácidos 3-indol acético (AIA). Médias de três repetições.

Isolado	AIA ($\mu\text{g/mL}$)	Cluster	Isolado	AIA ($\mu\text{g/mL}$)	Cluster	Isolado	AIA ($\mu\text{g/mL}$)	Cluster
FP1A-11	26,03	1	RP3B-18	17,02	1	FP1A-16	38,48	3
FP1A-12	30,48	1	RP3B-212	13,21	1	FP1A-19	43,48	3
FP1B-14	11,83	1	RP3C-16	17,04	1	FP1A-21	60,29	3
FP1C-27	11,99	1	RT1A-02	12,38	1	FP1C-12	49,59	3
FP1C-32	9,23	1	RT1C-211	15,82	1	FP1C-13	48,02	3
FP2B-11	25,01	1	RT1C-34	16,32	1	FP2A-32	59,83	3
FP2B-23	8,78	1	RT2A-01	15,41	1	FP2B-27	60,82	3
FP2C-32	15,02	1	RT2A-011	24,44	1	FP2C-23	33,26	3
FP3B-13	14,39	1	RT2A-02	14,42	1	FP3A-13	51,13	3
FP3B-17	19,69	1	RT2A-16	12,53	1	FT2C-22	53,17	3
FT1A-11	12,99	1	RT2B-17	13,62	1	RP1A-211	39,33	3
FT1B-24	8,61	1	RT3C-111	24,09	1	RP1A-28	47,01	3
FT1C-61	12,27	1	SP2-110	28,59	1	RP1A-34	36,36	3
FT3B-15	12,90	1	SP2-13	15,02	1	RP1A-37	47,94	3
RP1A-01B	13,73	1	SP2-18	18,34	1	RP3C-01	35,65	3
RP1A-36	20,94	1	SP2-21	27,15	1	RP3C-15	47,26	3
RP1B-33	11,81	1	SP2-23	30,37	1	RT3A-28	40,25	3
RP1C-116	13,60	1	ST2-15	28,05	1	RT3B-36	36,67	3
RP1C-122	31,33	1	ST2-21	18,06	1	RT3B-41	41,16	3
RP1C-31	13,02	1	ST2-23	28,93	1	RT3C-02	55,61	3
RP2A-23	9,05	1	ST3-13	20,04	1	SP2-12	41,52	3
RP2B-01	12,22	1	ST3-22	24,29	1	SP2-14	57,95	3
RP2B-113	17,30	1	FP1A-13	92,87	2	SP2-19	41,89	3
RP2B-14	13,70	1	FP1A-26	91,29	2	SP2-22	63,36	3
RP2B-18	25,93	1	FP1B-12	79,69	2	SP2-24	36,99	3
RP2B-21	5,58	1	RP1A-32	84,51	2	SP3-11	43,45	3
RP2C-01	16,18	1	RP3B-211	78,47	2	ST2-110	46,50	3
RP2C-13	14,02	1	RT1C-219	87,04	2	ST2-111	42,27	3
RP2C-34	12,12	1	SP3-12	76,94	2	ST2-18	62,75	3
RP3A-012	6,25	1	ST2-113	88,12	2	ST3-110	46,22	3
RP3B-01	7,10	1	ST2-12	100,15	2	ST3-16	54,74	3
RP3B-11	13,33	1	ST2-19	65,13	2	ST3-23	46,97	3
RP3B-110	15,26	1	ST3-116	79,90	2	ST3-25	54,74	3
RP3B-114	12,93	1	ST3-24	111,22	2			

As iniciais dos isolados indicam se eles foram isolados da seiva (S), folhas (F) ou raízes (R) do milho. O segundo dígito indica se eles foram isolados do tratamento fosfatado (T) ou não fosfatado (P). Médias de três repetições.

3. Agrupamento dos isolados em relação às taxas de solubilização de fosfato inorgânico. Médias de três repetições.

Isolado	Pi ($\mu\text{g/mL}$)	Cluster	Isolado	Pi ($\mu\text{g/mL}$)	Cluster	Isolado	Pi ($\mu\text{g/mL}$)	Cluster
FP1A-13	151,1	1	FP1A-26	503,5	2	FP1C-13	363,6	3
FP1A-16	132,0	1	FP1C-12	513,6	2	FP2A-21	234,7	3
FT2A-71	194,7	1	FP1C-27	406,9	2	FP2B-11	286,1	3
RP1A-210	103,8	1	FP2B-27	413,6	2	FP2B-12	321,1	3
RP1A-36	160,0	1	FP2C-21	395,9	2	FP3B-17	308,4	3
RP2B-14	46,8	1	FT1A-11	501,4	2	FP3C-31	244,9	3
RP3A-012	59,0	1	RP2B-01	454,2	2	FT1B-24	345,7	3
RT1C-211	131,2	1	RP2C-01	465,1	2	FT2C-22	288,0	3
RT2A-16	29,6	1	RP3B-211	427,7	2	RP1A-01B	321,5	3
RT2A-23	32,3	1	RT1A-02	417,7	2	RP1A-211	316,0	3
RT2B-13	18,0	1	RT2A-01	393,1	2	RP1A-28	257,0	3
RT2B-17	132,9	1	SP2-21	526,9	2	RP1A-32	249,2	3
RT2B-26	121,7	1	ST3-25	507,4	2	RP1A-34	276,4	3
RT2C-11	27,9	1				RP1A-37	299,0	3
RT3C-11	23,2	1				RP2C-13	277,0	3
RT3C-14	18,8	1				RP3C-15	243,6	3
RT3C-21	10,3	1				RP3C-16	324,1	3
ST2-12	163,8	1				RT1C-34	316,5	3
						RT2A-02	321,3	3
						RT3B-41	241,7	3
						RT3C-02	197,9	3
						ST2-18	252,8	3
						ST3-116	310,1	3
						ST3-13	208,6	3

As iniciais dos isolados indicam se eles foram isolados da seiva (S), folhas (F) ou raízes (R) do milho. O segundo dígito indica se eles foram isolados do tratamento fosfatado (T) ou não fosfatado (P). Médias de três repetições.

4. Agrupamento dos isolados em relação aos valores de pH conferidos ao meio NBRIP pelos isolados solubilizadores de fosfato inorgânico. Médias de três repetições.

Isolado	pH	Cluster Ph	Isolado	pH	Cluster pH	Isolado	pH	Cluster pH
FT1B-24	3,78	1	FP2B-12	4,26	1	RT2C-11	5,40	2
FP2B-27	4,01	1	RT1C-34	4,27	1	RT2B-13	5,41	2
RP1A-32	4,02	1	RP2C-01	4,33	1	RP3B-211	5,42	2
FP3B-17	4,09	1	RT3C-02	4,35	1	RT3C-11	5,56	2
RT3B-41	4,10	1	RT2B-26	4,41	1	RT3C-21	5,71	2
RP1A-01B	4,12	1	FP2A-21	4,43	1	RT2A-16	5,97	2
FP1C-27	4,13	1	RP3A-012	4,44	1	RT2A-23	6,23	2
RT2A-02	4,15	1	RP1A-34	4,45	1	ST2-18	4,59	3
RT1A-02	4,15	1	RP1A-36	4,47	1	FP1A-13	4,62	3
RT2A-01	4,15	1	FP1C-13	4,47	1	FP2C-21	4,63	3
RP3C-16	4,17	1	FP3C-31	4,49	1	SP2-21	4,67	3
FT1A-11	4,19	1	ST3-13	4,50	1	FT2A-71	4,71	3
RP1A-211	4,19	1	RP2C-13	4,50	1	RP1A-37	4,71	3
FP1A-26	4,20	1	RP1A-210	4,50	1	FP1A-16	4,83	3
FT2C-22	4,22	1	RT1C-211	4,50	1	FP2B-11	4,86	3
RP2B-01	4,22	1	RP3C-15	4,53	1	ST3-116	4,86	3
FP1C-12	4,23	1	RT2B-17	4,56	1	RP1A-28	4,88	3
						ST3-25	5,00	3
						RP2B-14	5,12	3
						ST2-12	5,14	3
						RT3C-14	5,18	3

5. Agrupamento dos isolados em relação às taxas de produção de sideróforos, expressas em unidades mM equivalentes de EDTA (Eq. EDTA). Médias de três repetições.

Isolado	Eq. EDTA	Cluster	Isolado	Eq. EDTA	Cluster	Isolado	Eq. EDTA	Cluster
FP1C-13	1,84	1	FP1A-16	5,83	2	FP1A-11	2,58	3
FP1C-62	1,76	1	FP2A-32	6,95	2	FP1A-12	4,35	3
FP2C-21	0,45	1	FP2B-13	6,80	2	FP1A-13	3,09	3
FP3A-13	1,18	1	FP3A-12	4,76	2	FP1A-19	2,79	3
FT1A-22	0,58	1	FP3C-32	7,45	2	FP1A-21	2,51	3
FT1B-23	1,04	1	FT3B-15	5,00	2	FP1B-11	2,36	3
FT2A-25	1,06	1	SP2-19	6,61	2	FP1B-12	4,08	3
SP2-110	0,93	1	SP3-12	6,56	2	FP1B-14	2,61	3
SP2-12	1,27	1				FP2A-21	3,44	3
SP2-24	0,98	1				FP2B-11	2,55	3
SP3-11	0,50	1				FP2B-12	2,19	3
ST2-110	1,36	1				FP2B-25	3,94	3
ST2-111	1,26	1				FP2B-27	2,25	3
ST2-14	0,94	1				FP3A-11	2,32	3
ST2-18	1,19	1				ST2-12	2,99	3
ST2-21	0,40	1				ST2-15	2,55	3
ST3-22	1,76	1						

As iniciais dos isolados indicam se eles foram isolados da seiva (S), folhas (F) ou raízes (R) do milho. O segundo dígito indica se eles foram isolados do tratamento fosfatado (T) ou não fosfatado (P). Médias de três repetições.

6. Agrupamento dos isolados em relação às taxas de solubilização de fosfato inorgânico, com valores de pH indicados.

Isolado	Pi (µg/mL)	pH	Cluster	Isolado	Pi (µg/mL)	pH	Cluster
RT3C-21	10,0	5,3	1	RP1A-36	160,3	4,47	2
RT3C-14	12,2	5,24	1	FP1A-13	163,2	4,66	2
RT2B-13	13,0	5,28	1	FP2A-71	168,8	4,7	2
RT3C-11	13,7	5,49	1	RP1A-36	172,9	4,46	2
RT3C-21	15,3	5,38	1	FP1A-16	175,8	4,83	2
RT3C-14	18,7	5,21	1	FP2A-71	178,2	4,72	2
RT2B-13	20,0	5,44	1	ST2-12	186,9	5,15	2
RT2B-13	21,1	5,5	1	ST3-13	187,4	4,47	2
RT3C-11	21,4	5,54	1	RT3C-02	193,7	4,35	2
RT2C-11	23,8	5,39	1	RT3C-02	200,0	4,37	2
RT3C-14	24,3	5,09	1	RT3C-02	201,2	4,33	2
RT2C-11	25,8	5,35	1	ST3-13	213,6	4,5	2
RT2A-16	27,4	5,85	1	ST3-13	224,4	4,52	2
RT2A-23	29,3	5,8	1	RP3C-15	225,2	4,61	3
RT2A-23	31,1	6,45	1	FP3C-31	228,3	4,49	3
RT2A-16	31,9	6,2	1	FP2A-21	230,7	4,43	3
RT3C-11	33,4	5,66	1	ST2-18	231,2	4,58	3
RT2C-11	34,1	5,45	1	RP1A-28	233,1	4,87	3
RT2A-23	36,7	6,44	1	ST2-18	233,6	4,54	3
RP2B-14	41,4	5,06	1	FP2A-21	235,8	4,48	3
RP2B-14	49,2	5,21	1	RP3C-15	235,9	4,62	3
RP2B-14	49,3	5,1	1	RP1A-32	236,3	3,99	3
RP1A-210	85,7	4,52	2	FP3C-31	236,7	4,5	3
FP1A-16	101,9	4,86	2	FP2A-71	238,5	4,71	3
RP1A-210	112,6	4,51	2	FP2A-21	239,6	4,38	3
RP1A-210	113,3	4,47	2	RT3B-41	240,2	4,04	3
RT2B-26	118,6	4,41	2	RT3B-41	242,1	4,16	3
FP1A-16	118,7	4,79	2	RT3B-41	242,9	4,1	3
RT2B-17	121,3	4,59	2	FT2C-22	245,4	4,25	3
RT2B-26	122,0	4,4	2	RP1A-32	251,9	4,15	3
RT2B-26	124,6	4,43	2	RP1A-28	254,6	4,85	3
RT1C-211	130,7	4,44	2	RP1A-32	261,6	3,93	3
RT1C-211	131,4	4,54	2	RP3C-15	263,3	4,37	3
RT1C-211	131,4	4,52	2	FP3C-31	269,7	4,47	3
RT2B-17	132,2	4,57	2	FT2C-22	270,0	4,23	3
FP1A-13	134,4	4,65	2	RP1A-34	270,6	4,45	3
RT2B-17	145,8	4,51	2	RP2C-13	272,3	4,51	3
RP1A-36	147,6	4,48	2	RP1A-34	275,0	4,43	3
ST2-12	149,4	5,14	2	FP2B-11	278,1	4,6	3
ST2-12	154,9	5,14	2	RP2C-13	278,7	4,49	3
FP1A-13	156,5	4,54	2	RP2C-13	279,6	4,49	3

Isolado	Pi (µg/mL)	pH	Cluster	Isolado	Pi (µg/mL)	pH	Cluster
FP2B-11	284,7	5,32	3	FP1C-27	358,8	4,1	4
RP1A-28	285,4	4,91	3	FT1B-24	366,4	3,96	4
RP1A-34	285,9	4,48	3	FP2B-27	370,2	4,02	4
FP3B-17	287,3	4,12	3	RT2A-01	386,0	4,18	4
RP1A-37	288,3	4,77	3	FP2C-21	388,4	4,91	4
ST2-18	293,3	4,64	3	RT2A-01	393,1	4,14	4
FP2B-12	293,9	4,24	3	RP3B-211	395,9	5,39	4
FP2B-11	295,6	4,66	3	FP2C-21	399,5	4,92	4
RP1A-37	298,1	4,56	3	FP2C-21	399,7	4,07	4
ST3-116	305,3	4,76	3	RT2A-01	400,2	4,14	4
ST3-116	305,9	5,07	3	RT1A-02	411,9	4,14	4
FP3B-17	307,1	4,07	3	FP2B-27	413,2	4,02	4
RT2A-02	310,2	4,15	3	FP1C-27	413,2	4,15	4
RP3C-16	310,5	4,21	3	FP1C-13	415,7	4,83	4
RT1C-34	311,3	4,26	3	RT1A-02	417,0	4,16	4
RP1A-211	312,5	4,27	3	RT1A-02	424,2	4,15	4
RP1A-211	313,1	4,2	3	RP3B-211	426,8	5,46	4
RP1A-37	313,4	4,8	3	RP2C-01	427,8	4,32	4
RP1A-01B	315,3	4,13	3	RP2B-01	441,8	4,24	4
RT1C-34	316,9	4,25	3	FP1C-27	448,7	4,15	4
RT2A-02	317,6	4,16	3	RP3B-211	454,2	5,42	4
RP3C-16	317,7	4,17	3	FP2B-27	457,3	3,99	4
ST3-116	318,8	4,75	3	RP2B-01	458,0	4,2	4
RT1C-34	321,2	4,3	3	RP2B-01	462,4	4,21	4
RP1A-01B	324,8	4,11	3	FT1A-11	478,6	4,16	4
RP1A-211	325,2	4,1	3	RP2C-01	480,7	4,33	4
FP2B-12	326,2	4,28	3	FP1C-12	481,5	4,24	4
RP1A-01B	327,4	4,13	3	RP2C-01	486,2	4,34	4
FP1C-13	329,5	4,31	3	SP2-21	491,1	4,72	4
FP3B-17	330,9	4,07	3	ST3-25	495,5	4,82	4
RT2A-02	336,0	4,13	3	FT1A-11	498,3	4,15	4
FT1B-24	336,8	4	3	ST3-25	499,3	5,08	4
RP3C-16	337,8	4,13	3	FP1A-26	500,7	4,21	4
FP2B-12	346,3	4,25	3	FP1A-26	504,5	4,18	4
FT2C-22	348,5	4,17	3	FP1A-26	505,3	4,21	4
FP1C-13	349,4	4,28	3	FP1C-12	515,6	4,22	4
				ST3-25	527,0	5,11	4
				FT1A-11	527,3	4,25	4
				SP2-21	538,5	4,65	4
				FP1C-12	543,8	4,23	4
				SP2-21	550,7	4,63	4

APÊNDICE F: Listas de isolados que expressaram fatores promotores de crescimento vegetal.

1. Lista de isolados produtores de ácido 3-indol acético (AIA) em meio TSB suplementado com 5 mM de triptofano, a 28°C e 180 rpm.

Isolado	Identificação	AIA (ug/mL)
ST2-19	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	65,13±7,96 h
RT2A-16	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	12,53±0,87 b
FP1A-26	<i>Bacillus gibsonii</i>	102,60±16,44 j
SP2-13	<i>Bacillus gibsonii</i>	15,02±0,68 b
RP3B-01	<i>Bacillus samanii</i>	5,46±2,47 a
FP2C-32	<i>Bacillus sp.</i>	15,02±0,49 b
SP3-11	<i>Bacillus subtilis</i>	43,45±2,31 e
FT1C-61	<i>Bacillus subtilis</i>	15,13±4,05 b
RP3C-01	<i>Bacillus subtilis</i>	35,65±0,03 e
RP3B-11	<i>Bacillus toyonensis</i>	13,33±1,87 b
FP3B-17	<i>Curtobacterium albidum</i>	23,48±6,32 c
FP1A-11	<i>Curtobacterium sp.</i>	26,03±0,52 d
FP1A-19	<i>Curtobacterium sp.</i>	43,48±1,98 e
FP1B-12	<i>Curtobacterium sp.</i>	79,69±1,93 i
FP1C-32	<i>Curtobacterium sp.</i>	12,46±4,70 b
FT1A-11	<i>Enterobacter sp.</i>	12,99±0,60 b
RP1A-211	<i>Enterobacter sp.</i>	39,33±1,77 e
RP1A-34	<i>Enterobacter sp.</i>	36,36±2,88 e
RP2C-13	<i>Enterobacter sp.</i>	14,02±0,63 b
RP2C-34	<i>Enterobacter sp.</i>	12,12±0,64 b
RP3B-18	<i>Enterobacter sp.</i>	17,02±2,52 b
FP1C-13	Enterobacteriaceae	48,02±2,72 f
RP1A-37	Enterobacteriaceae	47,94±0,54 f
RT3B-41	<i>Flavobacterium acidificum</i>	41,16±0,03 e

RP2B-113	<i>Leuconostoc sp.</i>	17,30±1,15 b
ST2-111	<i>Microbacterium binotii</i>	42,27±5,17 e
SP3-12	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	76,94±1,36 i
FP3B-13	<i>Microbacterium sp.</i>	10,68±5,38 b
RP2B-18	<i>Microbacterium sp.</i>	25,93±0,02 d
SP2-110	<i>Microbacterium sp.</i>	28,59±1,88 d
SP2-14	<i>Microbacterium sp.</i>	57,95±3,03 g
SP2-19	<i>Microbacterium sp.</i>	41,89±0,30 e
SP2-22	<i>Microbacterium sp.</i>	63,36±2,06 h
SP2-23	<i>Microbacterium sp.</i>	30,37±1,63 d
SP2-24	<i>Microbacterium sp.</i>	30,29±10,02 d
ST2-110	<i>Microbacterium sp.</i>	46,50±3,67 f
ST2-15	<i>Microbacterium sp.</i>	28,05±1,78 d
ST2-23	<i>Microbacterium sp.</i>	28,93±4,15 d
ST3-23	<i>Microbacterium sp.</i>	46,97±10,79 f
FP1A-12	<i>Microbacterium testaceum</i>	30,48±3,80 d
SP2-21	<i>Microbacterium testaceum</i>	27,15±0,20 d
ST2-21	<i>Microbacterium testaceum</i>	13,95±5,82 b
FT3B-15	<i>Microbacterium testaceum</i>	12,90±1,11 b
FP1A-21	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	60,29±2,42 g
FP1A-16	<i>Obesumbacterium proteus</i>	38,48±0,52 e
FT1B-24	<i>Pantoea ananatis</i>	12,68±5,89 b
FP2B-27	<i>Pantoea sp.</i>	60,82±1,10 g
FT2C-22	<i>Pantoea sp.</i>	53,17±0,73 g
RP3C-16	<i>Pantoea sp.</i>	17,04±2,28 b
FP2B-11	<i>Pantoea vagans</i>	25,01±2,85 d
ST3-110	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	46,22±1,31 f
ST3-13	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	20,04±0,78 c
RT1C-219	<i>Pseudomonas mosselii</i>	87,04±0,03 i

SP2-18	<i>Pseudomonas mosselii</i>	18,34±4,01 c
ST2-18	<i>Pseudomonas mosselii</i>	62,75±0,77 h
RP2A-23	<i>Pseudomonas protegens</i>	7,34±3,06 b
FP3A-13	<i>Pseudomonas sp.</i>	51,13±10,10 f
RT3A-28	<i>Pseudomonas sp.</i>	40,25±0,04 e
RT3B-36	<i>Pseudomonas sp.</i>	36,67±0,03 e
RT3C-111	<i>Pseudomonas sp.</i>	24,09±0,55 d
RT3C-02	<i>Pseudomonas sp.</i>	55,61±2,66 g
ST3-24	<i>Pseudomonas sp.</i>	111,22±0,03 j
ST3-16	<i>Psychrobacter faecalis</i>	54,74±2,45 g
FP2B-23	<i>Psychrobacter faecalis</i>	4,65±2,56 b
RP3B-211	<i>Rhizobium pusense</i>	78,47±2,25 i
ST3-22	<i>Rhodococcus sp.</i>	24,29±1,59 d
RP2C-01	<i>Serratia marcescens</i>	16,18±2,47 b
RT1A-02	<i>Serratia marcescens</i>	14,37±2,85 b
RT2A-01	<i>Serratia marcescens</i>	12,05±3,25 b
RP1A-01B	<i>Serratia sp.</i>	13,73±0,73 b
RP3A-012	<i>Serratia sp.</i>	6,25±0,31 a
FP1A-13	-	92,87±6,53 j
FP1B-14	-	11,83±0,87 b
FP1C-12	-	49,59±0,57 f
FP1C-27	-	15,27±4,64 b
FP2A-32	-	59,83±2,49 g
FP2C-23	-	33,26±1,95 e
RP1A-28	-	47,01±6,52 f
RP1A-32	-	84,51±3,01 j
RP1A-36	-	20,94±1,96 c
RP1B-33	-	13,25±2,11 b
RP1C-116	-	13,60±1,09 b

RP1C-122	-	31,33±2,61 e
RP1C-31	-	13,02±1,55 b
RP2B-01	-	12,22±0,28 b
RP2B-14	-	16,87±4,53 b
RP2B-21	-	4,45±0,02 a
RP3B-110	-	15,26±1,86 b
RP3B-114	-	12,93±1,10 b
RP3B-212	-	13,21±0,99 b
RP3C-15	-	55,48±0,11 g
RT1C-211	-	20,23±6,29 c
RT1C-34	-	16,32±1,37 b
RT2A-011	-	28,79±6,41 d
RT2A-02	-	12,90±2,17 b
RT2B-17	-	13,62±0,37 b
SP2-12	-	41,52±2,17 e
ST2-113	-	88,12±0,68 i
ST2-12	-	100,15±9,84 j
ST3-116	-	79,90±10,25 i
ST3-25	-	54,74±0,88 g

As iniciais dos isolados indicam se eles foram isolados da seiva (S), folhas (F) ou raízes (R) do milho. O segundo dígito indica se eles foram isolados do tratamento fosfatado (T) ou não fosfatado (P). Média seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação de 14,8%. Médias de três repetições.

2. Lista de isolados solubilizadores de fosfato de cálcio em meio NBRIP, à 28°C e 180 rpm, indicando as taxas de solubilização e valores de pH conferidos ao meio de cultura.

Isolado	Identificação	Pi (ug/mL)	pH
RT2A-16	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	29,6±1,9 b	5,97±0,16 f
RT3C-14	<i>Bacillus aryabhatai</i>	18,8±5 a	5,18±0,06 c
FP1A-26	<i>Bacillus gibsonii</i>	503,5±2 m	4,20±0,01 a
RT2B-13	<i>Bacillus pumilus</i>	18,0±3,6 a	5,41±0,09 d
RT3C-11	<i>Bacillus sp.</i>	23,2±8,1 b	5,56±0,07 d
RT3C-21	<i>Bacillus sp.</i>	10,3±2,2 a	5,71±0,03 d
RT2C-11	<i>Bacillus subtilis</i>	27,9±4,4 b	5,40±0,04 d
FP3B-17	<i>Curtobacterium albidum</i>	308,4±17,8 h	4,09±0,02 a
FT1B-24	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	345,7±14,7 i	3,78±0,02 a
FT1A-11	<i>Enterobacter sp.</i>	501,4±20 m	4,19±0,04 a
RP1A-211	<i>Enterobacter sp.</i>	316,0±5,9 h	4,19±0,07 a
RP1A-34	<i>Enterobacter sp.</i>	276,4±6,4 g	4,45±0,02 b
RP2C-13	<i>Enterobacter sp.</i>	277,0±3,2 g	4,50±0,01 b
FP1C-13	Enterobacteriaceae	363,6±36,9 i	4,47±0,25 b
RP1A-37	Enterobacteriaceae	299,0±10,3 h	4,71±0,11 b
RT3B-41	<i>Flavobacterium acidificum</i>	241,7±1,1 f	4,10±0,05 a
FP2C-21	<i>Klebsiella variicola</i>	395,9±5,3 j	4,63±0,4b
FP2A-21	<i>Lactococcus lactis</i>	234,7±3,6 f	4,43±0,04 b
SP2-21	<i>Microbacterium testaceum</i>	526,9±25,7 m	4,67±0,04 b
FP1A-16	<i>Obesumbacterium proteus</i>	132,0±31,6 c	4,83±0,03 b
FP2B-27	<i>Pantoea sp.</i>	413,6±35,6 g	4,01±0,01 a
FT2C-22	<i>Pantoea sp.</i>	288,0±44 g	4,22±0,03 a
RP3C-16	<i>Pantoea sp.</i>	324,1±11,5 h	4,17±0,03 a
FP2B-11	<i>Pantoea vagans</i>	286,1±7,2 g	4,86±0,33 b
ST3-13	<i>Pseudomonas cremoricolorata</i>	208,6±15,6 e	4,50±0,02 b
ST2-18	<i>Pseudomonas mosselii</i>	252,8±28,7 f	4,59±0,04 b
RT3C-02	<i>Pseudomonas sp.</i>	197,9±3,3 e	4,35±0,02 a
RP3B-211	<i>Rhizobium pusense</i>	427,7±23,8 j	5,42±0,03 d
RP2C-01	<i>Serratia marcescens</i>	465,1±26,3 l	4,33±0,01 a
RT1A-02	<i>Serratia marcescens</i>	417,7±5 j	4,15±0,01 a
RT2A-01	<i>Serratia marcescens</i>	393,1±5,8 j	4,15±0,02 a
RP1A-01B	<i>Serratia sp.</i>	321,5±5,2 h	4,12±0,01 a
RP3A-012	<i>Serratia sp.</i>	59,0±2,9 b	4,44±0,03 b
FT2A-71	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	194,7±30,9 e	4,71±0,01 b
FP3C-31	<i>Staphylococcus sp.</i>	244,9±17,9 f	4,49±0,01 b
FP1A-13	-	151,1±12,3 c	4,62±0,05 b
FP1C-12	-	513,6±25,5 m	4,23±0,01 a
FP1C-27	-	406,9±37 j	4,13±0,02 a
FP2B-12	-	321,1±21,6 h	4,26±0,02 a
RP1A-210	-	103,8±12,9 c	4,50±0,02 b
RP1A-28	-	257,0±21,5 f	4,88±0,02 b
RP1A-32	-	249,2±10,4 f	4,02±0,09 a

Isolado	Identificação	Pi (ug/mL)	pH
RP1A-36	-	160,0±10,3 d	4,47±0,01 b
RP2B-01	-	454,2±8,9 k	4,22±0,02 a
RP2B-14	-	46,8±3,7 b	5,12±0,06 c
RP3C-15	-	243,6±16 f	4,53±0,12 b
RT1C-211	-	131,2±0,3 c	4,50±0,04 b
RT1C-34	-	316,5±4,1 h	4,27±0,02 a
RT2A-02	-	321,3±10,8 h	4,15±0,01 a
RT2A-23	-	32,3±3,2 b	6,23±0,3 e
RT2B-17	-	132,9±10 c	4,56±0,03 b
RT2B-26	-	121,7±2,5 c	4,41±0,01 b
ST2-12	-	163,8±16,5 d	5,14±0,005 c
ST3-116	-	310,1±6,2 h	4,86±0,15 b
ST3-25	-	507,4±14 m	5,00±0,13 c

As iniciais dos isolados indicam se eles foram isolados da seiva (S), folhas (F) ou raízes (R) do milho. O segundo dígito indica se eles foram isolados do tratamento fosfatado (T) ou não fosfatado (P). Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade (dados originais de fosfato solubilizado transformados em Box-Cox). Coeficientes de variação de 6,74% para as dosagens de fosfato solúvel e 5,87% para os valores de pH. Médias de três repetições.

3. Lista de isolados que apresentaram a capacidade de mineralizar fitato de sódio em meio sólido, à 28°C.

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO	ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO
RT1A-01	<i>Arthrobacter boritolersans</i>	RT3C-02	<i>Pseudomonas sp.</i>
RP1B-210	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>	RP3B-211	Rhizobium pusense
RT2A-16	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	ST3-22	<i>Rhodococcus sp.</i>
RT3C-14	<i>Bacillus aryabhatai</i>	RT1A-02	<i>Serratia marcescens</i>
FP1A-26	<i>Bacillus gibsonii</i>	RT2A-01	<i>Serratia marcescens</i>
RT2A-12	<i>Bacillus sp.</i>	RP2C-01	<i>Serratia marcescens</i>
RT3B-22	<i>Bacillus sp.</i>	RP1A-01B	<i>Serratia sp.</i>
RT3C-11	<i>Bacillus sp.</i>	RP3A-012	<i>Serratia sp.</i>
RT3C-21	<i>Bacillus sp.</i>	FT1B-61	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
RT2C-11	<i>Bacillus subtilis</i>	FP1C-13	Enterobacteriaceae
RP3C-01	<i>Bacillus subtilis</i>	RP1A-37	Enterobacteriaceae
RP1A-211	<i>Enterobacter sp.</i>	FP2A-32	-
RP1A-34	<i>Enterobacter sp.</i>	ST2-12	-
RP2C-13	<i>Enterobacter sp.</i>	ST2-113	-
RP2C-34	<i>Enterobacter sp.</i>	ST3-116	-
FT1A-11	<i>Enterobacter sp.</i>	ST3-25	-
RT1C-22	<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	SP2-12	-
RT3B-41	<i>Flavobacterium acidificum</i>	FP1A-13	-
FP2C-21	<i>Klebsiella variicola</i>	FP1C-12	-
RP2C-33	<i>Lactococcus lactis</i>	FP2B-12	-
RP1A-35	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	RT1A-210	-
RT1C-214	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	RT1C-211	-
RT2B-25	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	RT1C-34	-
FP1A-16	<i>Obesumbacterium proteus</i>	RT2A-02	-
RP1C-25	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	RT2A-08	-
RT3B-34	<i>Paenibacillus tundrae</i>	RT2A-23	-
FT1B-24	<i>Pantoea ananatis</i>	RT2B-17	-
FP2B-27	<i>Pantoea sp.</i>	RT2B-26	-
FT2C-22	<i>Pantoea sp.</i>	RT3C-17	-
RP3C-16	<i>Pantoea sp.</i>	RP1A-32	-
FP2B-11	<i>Pantoea vagans</i>	RP1C-116	-
ST2-18	<i>Pseudomonas mosselii</i>	RP2B-01	-
RP2A-23	<i>Pseudomonas protegens</i>	RP2B-14	-
RT3C-111	<i>Pseudomonas sp.</i>	RP2B-21	-
FP3A-13	<i>Pseudomonas sp.</i>	RP3C-15	-
RT3A-28	<i>Pseudomonas sp.</i>	RP1A-28	-
RT3B-36	<i>Pseudomonas sp.</i>	RP1A-210	-

As iniciais dos isolados indicam se eles foram isolados da seiva (S), folhas (F) ou raízes (R) do milho. O segundo dígito indica se eles foram isolados do tratamento fosfatado (T) ou não fosfatado (P).

4. Lista de isolados produtores de sideróforos em meio KB à 28°C e 200 rpm. Taxas de produção expressas em milimolares equivalentes de atividade quelante de EDTA.

Isolado	Identificação	Sideróforos
FT2A-25	<i>Bacillus ginsengi</i>	1,06±0,22 b
SP3-11	<i>Bacillus subtilis</i>	0,50±0,1 a
FP1A-11	<i>Curtobacterium sp.</i>	2,58±0,35 d
FP1A-19	<i>Curtobacterium sp.</i>	2,79±0,48 d
FP1B-12	<i>Curtobacterium sp.</i>	4,08±0,29 e
FP3C-32	<i>Curtobacterium sp.</i>	7,45±0,37 f
FP2C-21	<i>Klebsiella variicola</i>	0,45±0,01 a
FP2B-25	<i>Lactococcus lactis</i>	3,94±0,3 e
FP1B-11	<i>Lactococcus lactis</i>	2,36±0,33 d
FP2A-21	<i>Lactococcus lactis</i>	3,44±0,3 d
ST2-111	<i>Microbacterium binotii</i>	1,26±0,12 b
SP3-12	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	6,56±1,34 f
FP3A-12	<i>Microbacterium sp.</i>	4,76±0,03 e
SP2-110	<i>Microbacterium sp.</i>	0,93±0,2 b
SP2-19	<i>Microbacterium sp.</i>	6,61±1,75 f
SP2-24	<i>Microbacterium sp.</i>	0,98±0,13 b
ST2-110	<i>Microbacterium sp.</i>	1,36±0,53 b
ST2-15	<i>Microbacterium sp.</i>	2,55±0,85 d
FP1A-12	<i>Microbacterium testaceum</i>	4,35±0,62 e
FT1A-22	<i>Microbacterium testaceum</i>	0,58±0,1 a
ST2-21	<i>Microbacterium testaceum</i>	0,40±0,09 a
FT3B-15	<i>Microbacterium testaceum</i>	5,00±0,41 e
FP1A-21	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	2,51±0,4 d
FP1A-16	<i>Obesumbacterium proteus</i>	5,83±1,09 f
FP2B-11	<i>Pantoea vagans</i>	2,55±0,24 d
FP2B-27	<i>Pantoea sp.</i>	2,25±0,14 d
ST2-14	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	0,94±0,38 b
ST2-18	<i>Pseudomonas mosselii</i>	1,19±0,27 b
FP3A-13	<i>Pseudomonas sp.</i>	1,18±0,54 b
FT1B-23	<i>Psychrobacter pulmonis</i>	1,04±0,26 b
ST3-22	<i>Rhodococcus sp.</i>	1,76±0,02 c
FP1C-62	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,76±0,01 c
FP3A-11	<i>Staphylococcus warneri</i>	2,32±0,19 d
FP1C-13	Enterobacteriaceae	1,84±0,12 c
FP2A-32	-	6,95±0,59 f
FP1A-13	-	3,09±0,6 d
FP1B-14	-	2,61±0,18 d
FP2B-12	-	2,19±0,18 d
FP2B-13	-	6,80±0,07 f
SP2-12	-	1,27±0,29 b
ST2-12	-	2,99±0,57 d

As iniciais dos isolados indicam se eles foram isolados da seiva (S), folhas (F) ou raízes (R) do milho. O segundo dígito indica se eles foram isolados do tratamento fosfatado (T) ou não fosfatado (P). Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Dados originais transformados em Box-Cox. Coeficientes de variação de 30,79%. Médias de três repetições.

5. Lista de isolados que apresentaram a capacidade de reproduzir todos os fatores promotores de crescimento vegetal analisados.

Isolado	Identificação	AIA (ug/mL)	Pi (ug/mL)	Sideróforos**	Fitases
RT2A-16*	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	12,53±0,87 b	29,6±1,9 b		+
RP1A-211	<i>Enterobacter sp.</i>	39,33±1,77 e	316,0±5,9 h		+
RP1A-34	<i>Enterobacter sp.</i>	36,36±2,88 e	276,4±6,4 g		+
RP2C-13	<i>Enterobacter sp.</i>	14,02±0,63 b	277,0±3,2 g		+
RT3B-41	<i>Flavobacterium acidificum</i>	41,16±0,03 e	241,7±1,1 f		+
FP1A-16*	<i>Obesumbacterium proteus</i>	38,48±0,52 e	132,0±31,6 c	5,83±1,09 f	+
FP2B-27	<i>Pantoea sp.</i>	60,82±1,10 g	413,6±35,6 g	2,25±0,14 d	+
RP3C-16	<i>Pantoea sp.</i>	17,04±2,28 b	324,1±11,5 h		+
FP2B-11	<i>Pantoea vagans</i>	25,01±2,85 d	286,1±7,2 g	2,55±0,24 d	+
ST2-18*	<i>Pseudomonas mosselii</i>	62,75±0,77 h	252,8±28,7 f	1,19±0,27 b	+
RT3C-02	<i>Pseudomonas sp.</i>	55,61±2,66 g	197,9±3,3 e		+
RP3B-211	<i>Rhizobium pusense</i>	78,47±2,25 i	427,7±23,8 j		+
RP2C-01	<i>Serratia marcescens</i>	16,18±2,47 b	465,1±26,3 l		+
RT1A-02	<i>Serratia marcescens</i>	14,37±2,85 b	417,7±5 j		+
RT2A-01	<i>Serratia marcescens</i>	12,05±3,25 b	393,1±5,8 j		+
RP1A-01B	<i>Serratia sp.</i>	13,73±0,73 b	321,5±5,2 h		+
RP3A-012	<i>Serratia sp.</i>	6,25±0,31 a	59,0±2,9 b		+
FP1C-13*	Enterobacteriaceae	48,02±2,72 f	363,6±36,9 i	1,84±0,12 c	+
RP1A-37	Enterobacteriaceae	47,94±0,54 f	299,0±10,3 h		+
FP1A-13	-	92,87±6,53 j	151,1±12,3 c	3,09±0,6 d	+
RP1A-28	-	47,01±6,52 f	257,0±21,5 f		+
RP1A-32	-	84,51±3,01 j	249,2±10,4 f		+
RP2B-01	-	12,22±0,28 b	454,2±8,9 k		+
RP2B-14	-	16,87±4,53 b	46,8±3,7 b		+
RP3C-15	-	55,48±0,11 g	243,6±16 f		+
RT1C-211	-	20,23±6,29 c	131,2±0,3 c		+
RT1C-34	-	16,32±1,37 b	316,5±4,1 h		+
RT2A-02	-	12,90±2,17 b	321,3±10,8 h		+
ST2-12*	-	100,15±9,84 j	163,8±16,5 d	2,99±0,57 d	+

*Isolados que também apresentaram atividade antagonista contra bactérias (*E. coli* ou *B. subtilis*) ou fungos (*F. verticillioides* ou *C. graminicola*);

**Apenas isolados de folhas e seiva de milho foram analisados quanto a produção de sideróforos;

As iniciais dos isolados indicam se eles foram isolados da seiva (S), folhas (F) ou raízes (R) do milho. O segundo dígito indica se eles foram isolados do tratamento fosfatado (T) ou não fosfatado (P). Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. Dados originais transformados em Box-Cox. Médias de três repetições para os ensaios quantitativos.