



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA CULTURA DO PINHÃO
MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

VITÓRIA ANSELMA SCHMIDT

Araras

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA CULTURA DO PINHÃO
MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

VITÓRIA ANSELMA SCHMIDT

ORIENTADOR: PROF. Dr. LEE TSENG SHENG GERALD

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Agroecologia e
Desenvolvimento Rural como requisito
parcial à obtenção do título de
MESTRE EM AGROECOLOGIA E
DESENVOLVIMENTO RURAL

Araras

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S354ob

Schmidt, Vitória Anselma.

Ocorrência de bactérias endofíticas na cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) / Vitória Anselma Schmidt. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
66 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Agroecologia. 2. Bactérias endofíticas. 3. Marcadores biológicos. 4. Pinhão-manso. 5. Crescimento (Plantas). I. Título.

CDD: 630 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DE

VITÓRIA ANSELMA SCHMIDT

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SÃO CARLOS, *EM 02 DE AGOSTO DE 2012.*

BANCA EXAMINADORA:



PROF. DR. LEE TSENG SHENG GERALD

ORIENTADOR

PPGADR/UFSCar



PROF. DR. RUBISMAR STOLF

PPGADR/UFSCar



DR. EDUARDO DE ANDRADE BRESSAN

CENA/USP

*“Uma mente que se abre a uma nova idéia, jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

À minha família, **Mercedes, Sebatião (in
memorian), Sueli, Nelsinho, Patrícia, Luiz
Antônio, Rosélia e sobrinhos**. Pelo carinho e
apoio constante.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Todos sabem que um trabalho como este não se faz sozinho. Há pessoas que colaboraram na sua elaboração na maioria das vezes, indiretamente, apenas com o carinho de acreditar que ele seria possível.

- Primeiramente, agradeço a Deus por me guiar nos momentos difíceis e mostrar os caminhos nas horas incertas, estas que não foram poucas.
- À minha família, que esteve presente mantendo uma condição única de muita paciência e em especial, o incentivo.
- Ao meu Orientador Prof. Dr. Lee Tseng Sheng Gerald, quem contribuiu para o meu crescimento profissional, instruindo-me e por ser também um exemplo a ser seguido.
- Ao Dr. Eduardo de A. Bressan, por sua incansável dedicação e sua competência profissional que foram imprescindíveis durante toda elaboração da dissertação.
- As minhas amigas, Regina Cândido, Lucinha, Alinne, Claudia Junqueira e Bernadete que me ouviram tantas vezes para me acalmar e diminuir a natural ansiedade ao decorrer que os prazos de relatórios, qualificação e outros apareciam.
- Aos pesquisadores do LAMAM/UFSCar e do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA/USP.
- A 4° Turma do Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural da UFSCar, onde conseguimos juntos compartilhar grandes momentos que me fizeram crescer tanto profissionalmente quanto na vida. Obrigada ecólogos!

Finalmente agradeço a todos meus professores do mestrado.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3 REVISÃO DA LITERATURA	5
3.1 Bactérias endofíticas	5
3.2 Contribuição das bactérias endofíticas para o desenvolvimento da planta	6
3.3 Diversidade de bactérias endofíticas	9
3.4 Bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio	10
3.5 Taxonomia bacteriana	12
3.6 Aspectos botânicos do pinhão manso	13
3.7 O pinhão manso como uma cultura energética	15
3.8 Distribuição do pinhão manso	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 Isolamento dos microrganismos	17
4.2 Confirmação da natureza endofítica	18
4.3 Caracterização morfológica e fisiológica dos isolados	18
4.4 Caracterização bioquímica dos isolados	19
4.4.1 Teste de Citrato	19
4.4.2 Teste de produção de Indol e Motilidade	19
4.4.3 Teste de produção de Sulfeto de Hidrogênio	20
4.4.4 Teste da Urease	20
4.4.5 Teste da Catalase	21
4.5 Caracterização molecular	21
4.5.1 Extração de DNA genômico	21
4.5.2 Amplificação do gene 16S rDNA	22
4.5.3 Sequenciamento do gene 16S rDNA	24
4.5.4 Identificação dos isolados por comparação das sequências	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Isolamento das bactérias endofíticas	26
5.2 Caracterização molecular e bioquímica	30
5.3 Caracterização molecular	40
5.4 Análise filogenética	44
5.5 Comparação entre os métodos de identificação	48
5.6 Potencial dos isolados	48
6 CONCLUSÕES	50
7 LITERATURA CITADA	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Bactérias endofíticas utilizadas no controle biológico de doenças vegetais.....	8
Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA dos isolados endofíticos.....	23
Tabela 3. Caracterização dos isolados obtidos de raízes, caules e folhas de pinhão manso pelo meio de isolamento, formato e testes bioquímicos. Presença (+) ou ausência (-).....	38
Tabela 4. Ocorrência de bactérias endofíticas, obtidas de plantas de pinhão manso provenientes das raízes, caules e folhas, com base amplificação do gene 16S rDNA.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de anelamento dos iniciadores no gene 16S rDNA....	24
Figura 2. Característica do isolado LFV-21 crescendo em meio seletivo JNFb. A tonalidade azul indica que o microrganismo tem capacidade de tornar o meio básico.....	28
Figura 3. Característica do isolado LFV-39 crescendo em meio seletivo LGI-P. A tonalidade amarela indica que o microrganismo tem capacidade de tornar o meio ácido.....	28
Figura 4. Característica do isolado LFV-8 crescendo em meio seletivo Batata-P.....	29
Figura 5. Característica do isolado LFV-33 crescendo em meio seletivo Batata-P.....	30
Figura 6. Característica do isolado LFV-38, Gram positiva e formato tipo bastonete.....	31
Figura 7. Característica do isolado LFV-15, Gram positiva e formato tipo coco.....	32
Figura 8. Característica do isolado LFV-23, Gram negativa e formato tipo bastonete.....	32
Figura 9. Testes bioquímicos utilizados para caracterizar os isolados.....	33
Figura 10. Característica do meio de cultura com as bactérias citrato negativas (verde) e positivas (azul).....	34
Figura 11. Característica do meio de cultura com as bactérias indol negativas (amarelo) e positivas (vermelho).....	35
Figura 12. Característica do meio de cultura com as bactérias sulfeto negativas (marrom claro) e positivas (marrom escuro).....	36
Figura 13. Amplificação de um fragmento da região 16S de isolados de pinhão manso. M: marcador 100 pb; Numeração 1 a 24 representam os isolados LFV-1 a LFV-24; B: branco.....	40

Figura 14. Árvore filogenética baseada no gene 16S do rDNA de isolados bacterianos endofíticos de pinhão manso. Os agrupamentos foram calculados pelo método de *Máxima Parcimônia* (MP). Os dados nos ramos indicam valores de bootstrap, com um total de 1000 replicações. Identificação dos gêneros e espécies na figura.....47

OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NA CULTURA DO PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)

Autor: Vitória Anselma Schmidt

Orientador: Prof. Dr. Lee Tseng Sheng Gerald

RESUMO

Os microrganismos endofíticos habitam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos como folhas, caules e raízes sem causar doenças ou produzir estruturas externas visíveis. A comunidade endofítica é constituída principalmente por bactérias e fungos que ao contrário dos patogênicos, podem beneficiar as plantas, entretanto, dependendo das condições como interação entre comunidades bacterianas, competição por nutrientes, pode se tornar patogênica. A comunidade endofítica tem sido avaliada em muitas plantas, principalmente nos estudos com bactérias diazotróficas. No presente estudo, a diversidade bacteriana endofítica de folhas, colmos e raízes do pinhão manso (*Jatropha curcas*) foram estudadas utilizando marcadores morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e molecular do tipo 16S rDNA. As amostras foram desinfetadas para eliminar os microrganismos epifíticos, maceradas e diluídas em série para a obtenção das suspensões, que foram inoculadas em meios de cultura seletivos para microrganismos diazotróficos. As placas foram incubadas a 30°C por sete dias. Quarenta e seis colônias de bactérias endofíticas purificadas foram isoladas sendo 19 nas folhas, 11 no caule e 16 nas raízes. O DNA dessas estirpes foi isolado, purificado e a porção Y1-16S805 do gene 16S rRNA foi amplificada e sequenciada. Análises de identidade das sequências foram feitas pelos programas BLASTn, CLUSTALW e análises filogenéticas pelo MEGA5. As raízes apresentaram maior diversidade de microrganismos endofíticos, com sete dos oito gêneros identificados. Nas folhas e no caule foram identificados seis gêneros, respectivamente. Nas folhas, a exceção foi os gêneros

Salmonella e *Serratia*, no caule *Serratia*, já nas raízes foi o gênero *Acinetobacter*. Os gêneros *Bacillus* e *Burkholderia* foram encontrados com maior frequência em todas as regiões amostradas. O gênero *Bacillus* nas folhas, caule e raízes representou 20, 4 e 4%, respectivamente, do total de microrganismos endofíticos identificados. Do total de isolados do gênero *Bacillus*, 73% pertenciam as espécies *B. atrophaeus*, *B. brevis* e *B. sphaericus*, os outros 27% pertenciam ao grupo *B. cereus*. Esses resultados sugerem que a diversidade bacteriana endofítica do pinhão manso é grande. Os organismos identificados nesse trabalho têm potencial para promoção de crescimento, controle biológico e fixação de nitrogênio, por serem isolados em meios seletivos com baixa concentração de nitrogênio, além de existirem relatos na literatura sobre os benefícios dos mesmos para diferentes plantas.

Palavras-Chaves: Comunidade endofítica, marcadores morfológico, fisiológico, bioquímico e molecular, pinhão manso, promoção do crescimento.

OCCURRENCE OF ENDOPHYTIC BACTERIA IN CULTURE OF PHYSIC NUT (*Jatropha curcas* L.)

Author: Vitória Anselma Schmidt

Adviser: Prof. Dr. Lee Tseng Sheng Gerald

ABSTRACT

The endophytic microorganisms inhabit the interior of the plants, being found in organs and tissues such as leaves, stems and roots without causing disease or producing visible external structures. The endophytic community consists mainly of bacteria and fungi that unlike pathogens, can benefit the plants, however, depending on conditions such as interaction between bacterial communities, competition for nutrients, it can become pathogenic. The endophytic community has been evaluated in many plants, especially in studies with diazotrophic bacteria. In this study, endophytic bacterial diversity of leaves, stems and roots of physic nut (*Jatropha curcas*) were studied using morphologic, physiological, biochemical and molecular markers, such as 16S rDNA. The samples were disinfected (removing epiphytic microorganisms), macerated and serially diluted to obtain the suspensions that were inoculated into culture media selective for diazotrophic microorganisms. The plates were incubated at 30°C for seven days. Forty-six colonies were isolated, with 19 in the leaves, 11 in the stems and 16 in the roots. DNA of these endophytic bacteria purified was isolated, purified and the Y1-16S805 portion of the 16S rRNA gene was amplified and sequenced. Analysis of sequence identity were made by the programs BLASTn, CLUSTALW and phylogenetic analyzes by MEGA5. The roots showed greater diversity of endophytic microorganisms, with seven of the eight genera identified. In the leaves and in the stem, six genera were identified, respectively. In leaves, the exception was the genus *Salmonella* and *Serratia*. In the stem, *Serratia*, and in the roots more than one species of the genera *Acinetobacter* were found. The genera *Bacillus* and *Burkholderia* were found more frequently in all regions sampled. The genus *Bacillus* in the

leaves, stems and roots accounted 20, 4 and 4%, respectively, of the total endophytic microorganisms identified. From the total isolates of the genus *Bacillus*, 73% belonged to the species *B. atrophaeus*, *B. brevis* and *B. sphaericus*, the other 27% belonged to group *B. cereus*. These results suggest that the endophytic bacteria diversity of physic nut is large. Microorganisms identified in this work have potential for growth promotion, biological control and nitrogen fixation, as they were isolated in selective media with low concentration of nitrogen, in addition there are reports in the literature about the benefits of them for different plants.

Key Words: Community endophytic, morphological, physiological, biochemical and molecular markers, physic nut, promoting growth.

1 INTRODUÇÃO

As bactérias constituem um dos grupos mais diversos na Terra, apesar dessa grande diversidade estima-se que tenhamos conhecimento de apenas uma pequena fração das bactérias existentes. Elas estão presentes em todos os ambientes terrestres e, através de sua atividade metabólica, afetam as propriedades químicas e físicas de todo o ambiente.

As plantas constituem um verdadeiro ecossistema microbiano, onde os microrganismos ocupam diferentes nichos como as superfícies das raízes e folhas (as epífitas), ou o interior de diversos tecidos das plantas. As bactérias que vivem no interior das plantas podem ser divididas em endofíticas ou patogênicas.

Os microrganismos associados às plantas são considerados endofíticos, quando habitam o interior da planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro. Sua diversidade tem sido amplamente relatada nos últimos anos nas mais diferentes espécies de plantas. Os gêneros mais comumente isolados incluem: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Pantoea* e *Microbacterium* (HALLMANN et al., 1997; ARAÚJO et al., 2002; ADACHI et al., 2002; ZINNIEL et al., 2002).

As informações acumuladas durante as últimas décadas sobre as bactérias endofíticas demonstram a atuação desses microrganismos em diferentes funções no interior das plantas como controle biológico, promoção do crescimento vegetal, biorremediação de áreas poluídas, dentre outras funções. Apesar de sua importância, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos representa apenas pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza. Este fato se deve em parte aos métodos de isolamento e identificação usados, pois para identificar uma espécie bacteriana era necessário obter uma cultura pura e, nesta identificação utilizavam-se características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

Atualmente, um maior número de microrganismos tem sido identificado e outros tantos reclassificados pelo uso de técnicas de identificação e classificação molecular, muitas delas permitindo a identificação de organismos

não cultiváveis. As técnicas moleculares permitem o estudo das comunidades endofíticas em seu habitat. O marco principal do uso dos marcadores moleculares foi quando Woese et al. (1987), descreveram o uso do gene 16S rDNA na filogenia de bactérias. As sequências do rDNA contêm domínios altamente conservados, intercalados com regiões variáveis. A comparação das sequências do rDNA é uma ferramenta importante para deduzir relações filogenéticas e evolutivas entre os organismos. O gene 16S rDNA é um gene universal e tem função conservada, que permite construir um esboço da árvore evolutiva de bactérias.

O pinhão manso é uma planta que ganhou destaque no cenário mundial, pelo alto conteúdo de óleo em suas sementes, poder medicinal, por resistir à seca e ser utilizado em alguns países na recuperação de áreas degradadas, porém pouco se conhece sobre a cultura, em especial sobre suas relações com os microrganismos endofíticos. Pode-se especular que seu desenvolvimento em solos e ambientes marginais esteja ligado aos benefícios promovidos pela associação com a comunidade endofítica.

A agricultura moderna visa alcançar uma ótima eficiência no uso de recursos, buscando reduzir, o uso de nutrientes e água por unidade de produção, reduzindo assim, o impacto ambiental e custos financeiro e ambiental com a aplicação excessiva de fertilizantes acima da capacidade de absorção das plantas.

A baixa eficiência na utilização de nutrientes pelas plantas pode resultar na contaminação de fontes de água e ecossistemas marinhos devido à lixiviação de nutrientes, como o nitrato, contaminação da atmosfera, devido à emissão de óxido nítrico e a amônia. O uso de fertilizantes a base de nitrogênio (N) na agricultura vem aumentando devido à maior demanda mundial por alimentos e combustíveis renováveis.

O nitrogênio é um dos principais componentes das biomoléculas, fazendo parte da estrutura de ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas. Embora constitua quase 80% da atmosfera terrestre, o nitrogênio gasoso, N_2 , é quimicamente inerte e diferentemente de outros elementos que ocorrem na natureza na forma de reservas. Apesar de termodinamicamente favorável, a

reação de redução de nitrogênio atmosférico em amônia, porém requer uma energia de ativação extremamente alta, não ocorrendo espontaneamente sem a presença de catalisadores adequados. A principal finalidade da amônia produzida é a fabricação de fertilizantes, pois mais de 100 milhões de toneladas são anualmente usados na agricultura, implicando grandes custos financeiros, energéticos e ambientais. Desta forma, os custos econômicos e ambientais relacionados à fertilização nitrogenada têm estimulado a busca por alternativas que possam diminuir a utilização deste nutriente, sem que haja diminuição da produção. Uma das possibilidades é o desenvolvimento de tecnologia baseado na associação entre bactérias diazotróficas e as plantas para fixar nitrogênio atmosférico e/ou produzir substâncias promotoras do crescimento vegetal.

2. OBJETIVOS

Isolar e caracterizar a diversidade bacteriana endofítica presente nas folhas, caule e raízes do pinhão manso, além fazer a identificação morfológica, fisiológica, bioquímica e molecular dos microrganismos isolados.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Bactérias

As bactérias constituem um dos grupos mais diversos na Terra e podem compreender mais um milhão de espécies (KENNEDY, 1999). Apesar dessa grande diversidade estima-se que tenhamos conhecimento de apenas uma pequena fração das bactérias existentes (TORSVIK et al., 2002). Elas estão presentes em todos os ambientes terrestres e, através de sua atividade metabólica, afetam as propriedades químicas e físicas de todo o ambiente a sua volta ocupando e colonizando todos os nichos possíveis, desde o sistema digestório de animais superiores e materiais mortos até fontes termais submarinas, incluindo as superfícies e interior de plantas, água doce e salgada, interior de rochas e geleiras (NEWMAN; BANFIELD, 2002).

Em particular, as plantas constituem um verdadeiro ecossistema microbiano. Nessas plantas hospedeiras, diferentes nichos são ocupados pelos microrganismos, tais como as superfícies das raízes e folhas (as epífitas), ou então, estas colonizando o interior de diversos tecidos das plantas. As bactérias que vivem no interior das plantas podem ser divididas em dois grupos, com base na sua relação com o hospedeiro (HALLMANN et al. 1997).

O primeiro grupo é o das bactérias endofíticas que são geralmente definidas como aquelas que vivem no interior das plantas sem causar danos visíveis (HALLMANN et al., 1997). Esse conceito as diferencia do outro grupo de bactérias que, apesar de também viver no interior da planta podem causar doença, trazendo prejuízo ao seu hospedeiro. Este segundo grupo é composto pelas bactérias patogênicas. Essa diferenciação não é definitiva, uma vez que a relação benéfica ou patogênica depende de fatores como as condições ambientais ou do equilíbrio com as outras populações bacterianas. Sendo assim, uma bactéria endofítica pode, dependendo das condições, se tornar um patógeno. Ou ainda, uma epífita pode entrar na planta, tornando-se endofítica ou patogênica (ANDREWS; HARRIS, 2000; SABARATNAM; BEATTIE, 2003; KLOEPPER et al., 1992).

KLOEPPER et al. (1992) consideram endofíticas todas as bactérias que colonizam tecidos do interior das plantas, tanto as que trazem benefícios às plantas quanto aquelas que, eventualmente, causem doenças.

Os microrganismos endofíticos entram na planta, primeiramente através da raiz, entretanto, partes aéreas das plantas, como as flores, caules e cotilédones podem também ser usados. Dentro da planta essas bactérias podem se localizar no ponto de entrada ou se dispersar de forma sistêmica (HALLMANN et al. 1997; ZINNIEL et al., 2002). Bactérias endofíticas parecem penetrar ativamente nos tecidos de plantas usando enzimas hidrolíticas como celulasas e pectinases, além de usarem aberturas naturais ou provocadas por injúrias (QUADT-HALLMANN et al., 1997).

O modo de dispersão das bactérias endofíticas pode ser via sementes, propagação vegetativa, partes mortas da planta ou insetos (BALDANI, 1997).

3.2 Contribuição das bactérias endofíticas para o desenvolvimento da planta

Inicialmente os microrganismos endofíticos eram considerados inócuos às plantas, porém a partir da década de 70 começou-se a verificar a sua importância (AZEVEDO, 2002). Vários efeitos positivos atribuídos às bactérias endofíticas, como a promoção do crescimento vegetal, controle biológico de pragas e doenças, fixação biológica de nitrogênio (DOWNING et al., 2000; VERMA et al., 2001; DÖBEREINER; BODDEY, 1981), indução de resistência sistêmica (HALLMANN et al., 1997), produção de sideróforos (BURD et al., 1998; WENBO et al., 2001) e produção de antibióticos (STROBEL; DAISY, 2003).

A promoção do crescimento vegetal se dá principalmente pela produção de fitormônios como as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno pelas bactérias endofíticas. A produção desses fitormônios já foi relatada em bactérias como *Gluconoacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (LEE et al. 2004; ZAKRAHOVA, 2003; KUKLINSKY-SOBRAL, 2004). O ácido indolacético é uma

auxina importante de ocorrência natural que provoca possui efeitos fisiológicos na planta, como o alongamento celular diferencial (LAMBRECHT et al., 2000).

O controle biológico de pragas e doenças consiste em utilizar microrganismos que ajam como antagonistas aos agentes causadores das doenças (AZEVEDO et al., 2000). Isso pode ser feito através da competição de nutrientes, produção de substâncias nocivas aos patógenos, ou indução de resistência sistêmica. Esse controle em espécies cultivadas vem ao encontro a uma necessidade de reduzir o consumo de agroquímicos nas culturas (ARAÚJO et al., 2002).

Os fungos foram os primeiros microrganismos explorados para o controle biológico (SAHAY; VARMA, 1999; AZEVEDO et al., 2000). Porém, muitas bactérias vêm sendo estudadas. A espécie bacteriana mais usada como antagonista a patógenos é *Bacillus subtilis* (BACON et al., 2001). Além dessa, bactérias da família *Pseudomonaceae* e o gênero *Nostoc* também vêm sendo utilizadas no controle biológico (RAJKUMAR et al., 2005; BERGSMAN-VLAMI et al., 2005; BIONDI, 2004).

Serafini e colaboradores reuniram as principais bactérias endofíticas utilizadas no controle de doenças provocadas por bactérias patogênicas e fungos (SERAFINI et al., 2002) (Tabela 1).

Tabela 1. Bactérias endofíticas utilizadas no controle biológico de doenças vegetais

Cultura	Patógenos	Endófito
Algodão	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Bacillus cereus, Bacillus pumilus</i>
Algodão e feijão	<i>R. solani, Pseudomonas ultimum, Sclerotium rolfsii</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Algodão e milho	<i>Fusarium moliniforme</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
Arroz	<i>R. solani</i>	<i>P. fluorescens, Pseudomonas putida</i>
Banana	<i>Fusarium oxysporum f. sp. cubense</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
Batata	<i>Erwinia carotovora var. atroseptica</i>	<i>Bacillus alcalophilus fsp. Halodurans, Bacillus amyloliquefaciens, Curtobacterium flaccumfaciens, C. luteum, Pantoea agglomerans, Pseudomonas tolaasii, Serratia liquefaciens, Serratia plymuthica</i>
Feijão	<i>Serratia rolfsii</i>	<i>Bacillus cereus, Bacillus pumilus, Bacillus subtilis</i>
Pêra	<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Erwinia herbicola</i>
Pocan	<i>Phoma tracheiphila</i>	<i>B. subtilis, P. fluorescens</i>
Repolho	<i>Xantomonas campestris pv. Campestris</i>	<i>Alcaligenes piechaudii, Kluyvera ascorbata</i>
Tomate	<i>F. oxysporum, V. dahliae</i>	<i>B. pumilus, P. fluorescens</i>
Uva e framboesa	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Pseudomonas aureofaciens, P. fluorescens.</i>

FONTE: Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Luciana Atti Serafini, Neiva Monteiro de Barros, João Lúcio Azevedo. EDUCS, p. 247, 2002.

3.3 Diversidade de bactérias endofíticas

Os microrganismos apresentam uma grande diversidade genética e desempenham funções cruciais na manutenção dos ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares (MYERS, 1996). Apesar de sua importância, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos representa apenas pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (PACE, 1997). Este fato se deve em parte aos métodos de isolamento e identificação usados. Até recentemente, para identificação de uma espécie bacteriana era necessário obter uma cultura pura e, nesta identificação utilizavam-se características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. A maior limitação deste procedimento é o fato de que a grande maioria de bactérias não pode ser obtida como cultura pura. Mesmo a diversidade de organismos cultivável não é bem avaliada, já que um grande número de meios de cultura e técnicas de cultura devem ser utilizados para avaliar a diversidade de um determinado nicho.

Atualmente um maior número de organismos tem sido identificado e tantos outros reclassificados pelo uso de técnicas de identificação e classificação molecular, muitas delas permitindo a identificação de organismos não cultiváveis (KIRCHOFF et al., 1997; UEDA et al., 1995). A data do primeiro estudo em diversidade de bactérias endofíticas é controversa, entretanto, é notável que a partir dos anos 80 e 90 esses estudos ganharam grande importância. BECKING em 1984 isolou endofíticos de nódulos de raízes de plantas da família Rosaceae e identificou as características morfológicas de *Frankia* spp. através de microscopia eletrônica de transmissão (BECKING, 1984).

Em colmo, folhas e nódulos de trevo vermelho, STURZ e colaboradores (1997) mostraram colonização pelos endofíticos *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter agglomerans*, *Rhizobium* spp, *Agrobacterium* spp, *Curtobacterium* spp., *Bacillus* spp., *Bordetella* spp., *Escherichia coli*, *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas* (STURZ et al., 1997).

Em raízes de canola e trigo foi encontrada uma alta proporção dos endofíticos *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Rathayibacter* (GERMIDA et al., 1998; MISKO; GERMIDA, 2002).

Nos últimos anos os estudos de diversidade endofítica bacteriana de uma extensa variedade de plantas têm sido realizados utilizando principalmente técnicas moleculares. Recentemente MOCALI et al. (2003) pesquisaram a diversidade endofítica em *Ulmus* spp. utilizando as técnicas de sequenciamento do gene rRNA 16S e ANDRA, encontrando representantes dos gêneros *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Enterobacter* e *Stahlylococcus*.

Em três variedades diferentes de batata foram encontrados representantes das subdivisões alfa, beta e gama-proteobactéria (BERG et al., 2004; SESSITCH et al., 2002). Técnicas de tipagem molecular permitiram a descrição de endofíticos em soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004), de plantas cítricas (ARAÚJO et al., 2002), arroz (VERMA et al., 2001; CHAINTREUL et al., 2000) e trigo (CONN; FRANCO, 2004) Em cana-de-açúcar e outras gramíneas, estudos de diversidade de endofíticos estão bastante direcionados aos organismos fixadores de nitrogênio (CABARELLO-MELLADO; MARTINEZ-ROMERO, 1994; OLIVARES, 1997, ELBELGATYU, 2001).

3.4 Bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio

Um grupo de bactérias endofíticas presentes em diferentes espécies vegetais é composto pelas bactérias diazotróficas, capazes de fixar nitrogênio (DÖBEREINER, 1992).

O nitrogênio é um elemento químico fundamental na formação de biomoléculas como proteínas, aminoácidos e ácidos nucléicos. Porém, a maior parte do nitrogênio está na forma gasosa (N_2), inerte para animais e vegetais. Na natureza, a incorporação do nitrogênio ao ecossistema é feita, principalmente, pelas bactérias diazotróficas (YOUNG, 1992).

A reação de incorporação do nitrogênio pelas bactérias diazotróficas é catalisada pelo complexo da enzima nitrogenase e consiste na conversão do

nitrogênio gasoso (N_2) na sua forma mais reduzida, como íons amônio (NH_4^+), que serão utilizados pelos seres vivos para a formação de seus compostos nitrogenados (POSTGATE, 1982).

As bactérias diazotróficas ocupam nichos distintos, podendo ser de vida livre, associativos e simbióticos. A Fixação Biológica de Nitrogênio foi inicialmente descrita em bactérias diazotróficas da rizosfera e no rizoplane de uma grande variedade de plantas leguminosas (DÖBEREINER, 1992), porém, evidências recentes mostram que algumas bactérias diazotróficas colonizam o interior da planta e são conhecidas como bactérias endofíticas (OLIVARES et al., 1996; URETA et al., 1995). Gramíneas de importância econômica, tais como cana-de-açúcar, arroz, trigo, sorgo, milho e algumas forrageiras foram identificadas com hospedeiros de diversas espécies de bactérias endofíticas diazotróficas, sendo as principais *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Azospirillum* spp., *Burkholderia amazonense* (JAMES; OLIVARES, 1997; TRIPLETT, 1996; BALDANI et al., 1997; JAMES, 2000; BODDEY et al. 2003).

Diversos estudos mostram que estes endofíticos colonizam seus hospedeiros em grande número e causam um aumento de produção de nitrogênio. Na cultura do arroz inundado, por exemplo, há uma contribuição da fixação de nitrogênio de 30 a 60 Kg N/ha /ano (BALDANI et al., 1986). Na cana-de-açúcar a contribuição pode chegar a 150 kg N/ha/ano (URQUIAGA et al., 1992). A possibilidade de se substituir o nitrogênio fertilizado para fixação biológica de nitrogênio deve ser considerada, pois da cana-de-açúcar foram isoladas várias bactérias diazotróficas endofíticas como *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Glucanoacetobacter diazotrophicus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. e mais recentemente um isolado relacionado à *Pantoea* sp (NUNEZ; COLMER, 1968; BALDANI et al., 1986; CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988; DONG et al., 1994; LOIRET, 2004). Outra bactéria diazotrófica endofítica, o *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi descrita na cana-de-açúcar como agente causador de uma doença denominada estria mosqueada (OLIVARES et al., 1996).

3.5 Taxonomia bacteriana

Taxonomia é a ciência da classificação dos organismos, ou seja, a ciência de ordená-los em grupos com base em suas características comuns (BUSSE et al., 1996). A taxonomia de vegetais e animais superiores se dá basicamente pela observação de características morfológicas e fisiológicas, facilmente observáveis a olho nu ou com a ajuda de ferramentas simples como lupa ou microscópio ótico. Esse tipo de abordagem nem sempre se aplica a microrganismos como bactérias, pois o seu tamanho e simplicidade impedem uma classificação baseada em tais parâmetros. A alternativa usada é a observação de reações fisiológicas características de determinados grupos de bactérias que possam vir a ajudar nessa classificação.

Testes bioquímicos, nutricionais e fisiológicos são usados na taxonomia de bactérias desde a década de 20 (BUSSE et al., 1996). Esses métodos testam, entre outras coisas, a capacidade de utilização de diferentes fontes de carboidrato e a presença de determinadas enzimas, porém gerava alguns problemas relacionados à identificação filogenética.

Em 1996, KIRCHOFF e colaboradores admitiram que a identificação de novos isolados baseada em critérios puramente morfológicos e fisiológicos apresentavam problemas (KIRCHOFF et al., 1997). Por esse motivo, tem se recomendado uma abordagem ampla para a identificação bacteriana, incluindo informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas (VANDAMME, 1996).

Um dos desafios da sistemática tem sido estabelecer uma classificação que reflita a filogenia dos organismos. Nesse contexto, surge a possibilidade de se usar marcadores moleculares que reflitam a sua origem evolutiva e auxiliem na sua classificação.

Para ser usado como marcador molecular, a molécula deve ter as seguintes características: ser universalmente distribuída no grupo a ser estudado; funcionalmente homóloga em cada organismo; o alinhamento das sequências das moléculas deve ser perfeitamente possível para poder identificar regiões conservadas e não-conservadas; a sequência da molécula deve sofrer mutação em um índice mensurável (BROCK, 1997). O marco principal do uso de marcadores moleculares foi quando WOESE e

colaboradores em 1987 descreveram o uso do gene rRNA 16S na filogenia de bactérias (WOESE et al., 1987). As sequências de rRNA contendo domínios altamente conservados, intercalados com regiões variáveis (HEAD et al., 1998). A comparação de sequência de rRNA é uma ferramenta importante para deduzir relações filogenéticas e evolutivas entre os organismos (WEISBURG et al., 1989). O ribossomo bacteriano é composto do RNA ribossomal e várias proteínas, ou seja, constituído de duas subunidades principais, a 40S (subunidade maior) e 30S, (subunidade menor). Na subunidade maior estão as moléculas de rRNA 23S, 5S e mais 31 proteínas; já na menor estão o gene 16S e mais 21 proteínas (WOODSON ; LEONTIS, 1998).

O gene 16S rDNA é universal e tem sua função conservada, permitindo a construção de uma árvore filogenética, reorganizando os organismos em novos grupos (YOUNG, 1992). A similaridade entre sequências indica uma origem comum do gene (LUDWIG; SCHLEIFER, 1994), o que possibilita o uso de sequências de DNA ou RNA na identificação bacteriana. As árvores filogenéticas baseadas nas sequências do gene 16S permitem representar grupos naturais relacionados em uma mesma divisão filogenética (WOESE et al., 1987).

3.6 Aspectos botânicos do pinhão manso

O pinhão manso pertence à família Euphorbiaceae, que compreende 320 gêneros e cerca de 8.000 espécies, distribuídas pelo mundo (WEBSTER, 1994). O gênero *Jatropha* contém 175 espécies (HELLER, 1996). Dentre as quais destacam *Jatropha curcas* L. (pinhão manso), *J. elliptica*, *J. gossypifolia*, *J. mollissima*, *J. multifida*, *J. podagrica* e *J. weddeliana*. O pinhão manso produz sementes com interesse comercial para produção de óleo ou para uso medicinal (SUNITA et al., 2005; SUDHEER et al., 2009). Muitas espécies apresentam apenas valor ornamental, devido à variabilidade de tipos e formas de flores, folhas e caules (HELLER, 1996).

O centro de origem do gênero *Jatropha* ainda é incerto, mas acredita-se que seja originário das Américas e o Brasil aparece como centro de diversidade geográfica, pois muitas espécies encontram-se distribuídas pelo

país (HENNING; MITZLAFF, 1995; HELLER, 1996). Na atualidade, o pinhão manso também se encontra disperso pela Ásia, África e Oceania (YAOWALAK et al., 2011).

Linnaeus (1753) foi o primeiro autor a nomear o pinhão manso como *Jatropha curcas* L. em *Species Plantarum*. O pinhão manso sempre despertou o interesse humano devido às características do óleo que produz, destacando-se a não emissão de fumaça, cheiro, impróprio para o consumo animal e de grande poder de combustão (SUJATHA; DHINGRA, 1993).

Segundo Câmara e Heiffig (2006), o pinhão manso apresenta a seguinte descrição botânica: arbusto grande de crescimento rápido, podendo atingir três metros de altura, caule liso, com diâmetro aproximado de 20 cm, lenho mole e medula desenvolvida, mas pouco resistente; as folhas são verdes esparsas e brilhantes, largas e alternadas, em forma de palma com três a cinco lóbulos e pecioladas. A espécie é monóica, cujas flores femininas apresentam três células elípticas, ovário com três carpelos, cada um com um lóculo que produz um óvulo com três estigmas bifurcados e separados, enquanto que, as masculinas possuem dez estames, sendo mais numerosas e situadas nas pontas das ramificações (SATURNINO et al., 2005). Na inflorescência do pinhão manso pode-se observar que as flores femininas variam de cinco a vinte e que essas abrem em dias diferentes. A flor feminina da primeira bifurcação do cacho abre antes, depois vão se abrindo as situadas acima da primeira, o que força a polinização cruzada ou xenogâmica (SATURNINO et al., 2005; JUHÁSZ et al., 2009). Raju e Ezradanam (2002) estudaram a frutificação do pinhão manso e relataram que em uma inflorescência a proporção de flores femininas é de 1-5 flores para 25-93 masculinas e que a abertura ocorre pela manhã e a deiscência da antera ocorre uma hora após a abertura da flor. Os estigmas tornam-se receptíveis depois que a flor se abre e permanecem assim por três dias. Já as flores não polinizadas caem no quarto dia, enquanto as polinizadas permanecem, onde as sépalas e pétalas aumentam gradualmente para protegerem o fruto até que alcance seu máximo desenvolvimento (SATURNINO et al., 2005). Quanto aos polinizadores, Raju e Ezradanam (2002) observaram que na base das flores femininas e masculinas existem

glândulas elípticas produtoras de néctar favorecendo assim a polinização entomófila. Os principais polinizadores são abelhas (*Apis mellífera*), moscas, tripes e formigas (SATURNINO et al., 2005; RAJU; EZRADANAM, 2002).

Segundo Aker (2007), o desenvolvimento do fruto é do tipo das Euphorbiaceas como a mandioca, mamona e seringueira, onde os frutos fecundados continuam a crescer depois da maturação dos primeiros frutos de um cacho. Os frutos são do tipo cápsula trilobular, carnudos e amarelados quando maduros, contendo três sementes (SATURNINO et al., 2005). O fruto compõe-se de 27,8% de casca, 26,2% de epicarpo e 46% de albúmen e é nesta região onde se encontra o maior teor de óleo, podendo chegar a 60,8% (BRASIL, 1985). O pinhão manso é uma planta de ciclo perene que pode produzir de 1 a 6 toneladas de óleo por hectare dependendo da idade da planta, começando a produzir aos 10 meses e atingindo a sua plenitude de produção por volta do quarto ano, podendo chegar aos 50 anos produzindo (PEIXOTO, 1973).

O pinhão manso apresenta raízes bem desenvolvidas, sendo a raiz principal pivotante e em solos com baixa densidade a raiz pode chegar ao dobro do comprimento da parte aérea (YE et al., 2009). A planta aborta suas folhas sob déficit hídrico ou frio, e geralmente ocorre a frutificação anual. Araújo e Ribeiro (2008) observaram, em condições brasileiras, que a queda foliar ocorreu durante o período de estiagem e a produção de frutos maduros concentra-se de fevereiro a maio. Contudo, as informações agronômicas sobre a cultura ainda são escassas principalmente com relação ao desenvolvimento de cultivares comerciais, ataques de pragas e patógenos, entre outros fatores que podem influenciar na produtividade agrícola (KANT; WU, 2011).

3.7 O pinhão manso como uma cultura energética

A busca por óleos para produção de biocombustíveis despertou interesse por várias oleaginosas, dentre as quais o pinhão manso, que passou a ser considerado como cultura candidata. Durães e Laviolla (2009) destacam que o pinhão manso se tornou uma matéria prima atrativa para a produção de biodiesel por apresentar elevado potencial de rendimento de grãos e óleo.

O pinhão manso se destaca também por ser uma cultura não alimentar por possuir compostos tóxicos como os ésteres de forbol, ou seja, seu óleo é destinado à produção de biocombustível. A espécie também possui características compatíveis com a agricultura familiar, pois é perene, altamente dependente de mão de obra, além de permitir o consórcio com outras culturas. Ye et al. (2009) apontam que o pinhão manso é uma planta versátil com certos atributos econômicos e ecológicos, pois o balanço de água é favorável ao solo, uma vez que o índice de área foliar da planta é alto, promovendo alta taxa de transpiração, porém diminuindo a evaporação, retendo maior quantidade de água no solo. No entanto, existem alguns desafios técnicos e científicos para a inserção do pinhão manso na matriz energética brasileira como a tecnologia de produção e produtividade da cultura, necessidade de conhecimentos científicos, qualidade do óleo vegetal e aproveitamento da torta para a alimentação animal (DURÃES; LAVIOLLA, 2009).

3.8 Distribuição do pinhão manso

O pinhão manso é uma planta originária das Américas, porém foi introduzido por navegadores portugueses em 1783 nas ilhas do Arquipélago de Cabo Verde, alcançando a África, e posteriormente a Ásia (DURÃES; LAVIOLLA, 2009). O pinhão manso é encontrado nas regiões tropicais, temperadas e frias, sendo cultivado no Brasil, Nicarágua, México, Cuba, Índia, China, Cabo Verde, Irlanda, Alemanha, Madagascar, Malásia, Tailândia, Filipinas, dentre outros países (HELLER, 1996).

Gexsi (2008) indica que as maiores áreas de cultivo do pinhão manso encontram-se na Ásia (85%), seguido da África (13%) e América (2%). No Brasil, os principais estados onde se cultivam o pinhão manso são: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Ceará, Piauí, Bahia, Minas Gerais e São Paulo (DURÃES; LAVIOLLA, 2009). Estima-se que já foram implantados 50 mil hectares de lavouras comerciais no Brasil (ROSADO et al., 2010). Contudo, os desafios técnicos e científicos são as maiores limitações da cultura (SANDERSON, 2009; KANT; WU, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos de isolamento e caracterização foram desenvolvidos nos Laboratórios de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos (LFVCT), Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos, Araras, SP e no Laboratório Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

4.1 Isolamento dos microrganismos

Amostras vegetais, compostas por caules, folhas e raízes de plantas pinhão manso cultivadas do campo experimental do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Cultura de Tecidos da Universidade Federal de São Carlos, foram coletadas e levadas ao laboratório para esterilização e processamento. As folhas e caules foram desinfestadas superficialmente com álcool 70%, por 1 min, 2% hipoclorito de sódio, por 10 min e lavagem em água destilada esterilizada por três vezes. Os tecidos foram macerados em água estéril e o macerado foi deixado em repouso por 15 min, para a difusão das bactérias para a solução. Após esse período, as suspensões bacterianas obtidas foram diluídas seriadamente de 10^{-1} a 10^{-7} . Destas diluições, alíquotas de 100 μ L foram transferidas para placas com 25 mL dos seguintes meios semi-sólidos e isentos de nitrogênio (N): LGI-P, JNFb, Batata e Batata-P (DÖBEREINER et al., 1995), em três repetições e incubadas a 30°C. Todas as colônias obtidas foram repicadas para tubos de ensaio, contendo o JNFb. Um novo cultivo em meio líquido específico foi feito e usado para estocar os isolados em solução de glicerol a 50% a -20°C. A partir desses estoques as colônias foram re-isoladas para o desenvolvimento do trabalho.

O crescimento de bacteriano foi evidenciado pela a presença da película típica logo abaixo da superfície do meio depois de 7 dias de incubação a 30°C. A população bacteriana foi estimada 4 a 6 dias após a incubação à 30°C pela técnica do número mais provável (MPN) consultando a tabela de McCrady para 3 repetições por diluição. As bactérias formadoras de cápsula

(película característica) e todas as bactérias isoladas que mudaram a coloração do meio de amarelo para azul foram submetidas a etapas posteriores de isolamento e purificação pelo método de estrias ou riscas em placas contendo meio LGI-P e JNFb. As colônias foram purificadas e mantidas no mesmo meio em baixa temperatura (5°C). Os isolados foram cultivados em meios de cultura sólidos LGI-P, JNFb, Batata e Batata-P, acondicionados em placas de Petri para a caracterização morfológica das colônias.

4.2 Confirmação da natureza endofítica

Para se confirmar a natureza endofítica dos isolados, utilizou-se o método descrito por Assis et al. (1998) com modificações. Os fragmentos de raízes, caules e folhas, após a terceira lavagem do processo de desinfestação, foi seccionado em duas partes. A primeira foi macerada, conforme descrito anteriormente e a segunda foi mergulhada rapidamente em tubos de ensaio contendo o meio LGI-P e JNFb. O meio foi incubado a 28°C e observado, a fim de se comprovar a ausência de crescimento de organismos epifíticos. Outra técnica utilizada para a confirmação a natureza endofítica dos isolados foi o plaqueamento de 100 µL, da terceira água de lavagem do processo de desinfestação, em placas de Petri contendo 25 mL dos meios semi-sólidos LGI-P e JNFb. Não havendo crescimento bacteriano nos tubos e nas placas, os isolados obtidos pela maceração dos tecidos foram considerados endofíticos.

4.3 Caracterização morfológica e fisiológica dos isolados

As colônias que cresceram nos meios de cultura seletivos foram recolhidas, com ajuda da alça de repicagem esterilizada, para lâmina de vidro devidamente limpa e realizou-se o esfregaço por toda a extensão da lâmina, visando verificar a morfologia celular. O esfregaço também foi fixado pela secagem ocorrida após a passagem da lâmina pela chama do bico de Bunsen, de modo leve e garantindo a fixação da mesma. A lâmina com o esfregaço foi submetida à coloração de Gram. A lâmina com o esfregaço, foi coberta com corante cristal violeta durante 1 min, e retirado com o uso de um filete de água.

Logo em seguida, adicionou-se solução de iodo pelo mesmo período anterior. A lâmina então foi lavada com álcool e depois água, até que todos os reagentes presentes fossem removidos. Após este procedimento, safranina foi adicionada sobre a lâmina por 30 seg e lavada novamente com água. A lâmina foi seca e levada ao microscópio, na lente de imersão, para observação da coloração e forma das células bacterianas. As bactérias Gram negativas (-) apresentaram coloração avermelha e as positivas (+), coloração azulada.

4.4 Caracterização bioquímica dos isolados

4.4.1 Teste de Citrato

Os isolados foram submetidos a testes bioquímicos com base nas características microscópicas e do desenvolvimento em meios de cultura específicos. O primeiro teste realizado baseou-se na capacidade do microrganismo utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono e energia. Para este experimento foi utilizado o meio citrato-Simmons que possui a seguinte composição por litro: 2g de citrato de sódio; 0,2g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1g de $NH_4H_2PO_4$; 1g de K_2HPO_4 ; 5g de NaCl, 20g de ágar e 15ml de azul de bromotimol. O meio citrato-Simmons sólido foi distribuído em tubos de ensaio e esses foram colocados na posição inclinada para o endurecimento. Os microrganismos foram inoculados do meio citrato e após 2 a 3 dias, observou-se a mudança ou não de cor do meio de cultura, ou seja, de verde para azul escuro. A mudança de cor da superfície do meio para azul foi utilizada como um indicador positivo para o microrganismo que utiliza o citrato de sódio como única fonte de carbono para seu metabolismo e crescimento.

4.4.2 Teste de produção de Indol e Motibilidade

O segundo teste utilizado para caracterizar bioquimicamente os microrganismos isolados foi baseado na produção de indol e na prova de motilidade das bactérias endofíticas. Este experimento foi conduzido com o

meio SIM que tem coloração amarela. O meio SIM possui a seguinte composição por litro: 30g peptona; 3g de extrato de carne; 0,10g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 3g de ágar. Os isolados foram inoculados com uma agulha no meio SIM, através da técnica da punctura. Após 2 a 3 dias, observou-se: a presença ou ausência de motilidade dos microrganismos como prova fisiológica, da presença de flagelos. Caso as bactérias cresceram por todo o meio, o resultado seria positivo para a presença de flagelo. No caso negativo quando os microrganismos ficam restritos ao local da inoculação. Para verificar se os microrganismos decompõe o triptofano em indol pelo surgimento da coloração avermelhada no meio SIM ao adicionar 3 gotas do reagente de Kovacs. A presença do indol se deve pela formação do complexo aldeído, em meio ácido, formando o composto colorido. O reagente de Kovacs é composto por uma solução de 5g de p-dimetilamino-benzaldeído, 25 mL de HCl e 75 mL de álcool isoamílico. O indol é resultante da degradação do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase.

4.4.3 Teste de produção de Sulfeto de Hidrogênio

O terceiro teste bioquímico baseou-se na produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) pela presença de uma película preta na superfície do meio. O meio SIM possui em sua composição tiosulfato como fonte de enxofre e o sulfato ferroso como indicador da produção de sulfeto de hidrogênio. O sulfeto de hidrogênio produzido reage com o metal formando um precipitado preto insolúvel.

4.4.4 Teste da Urease

Este teste bioquímico baseou-se na produção de urease pelos microrganismos, utilizando o seguinte meio específico: 0,5g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5g de K_2HPO_4 , 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5g de NaCl, 1g de extrato de levedura, 16mg de vermelho de cresol e 17g de ágar. O meio urease, de cor laranja em função do indicador de pH, foi devidamente preparado e autoclavado. A uréia

foi diluída em água destilada (20g para 200mL) e posteriormente filtrada. As bactérias foram inoculadas e a mudança de cor do meio de laranja para rosa choque ou rosa cereja indica a ação da urease na degradação da uréia em duas moléculas de amônia e uma de anidrido carbônico.

4.4.5 Teste da Catalase

O teste da catalase consiste em adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a uma colônia isolada sobre uma lâmina de vidro. O teste positivo evidencia-se pela formação de bolhas sobre a colônia.

4.5 Caracterização molecular

4.5.1 Extração de DNA genômico

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio seletivo líquido no qual elas foram isoladas. Alíquotas (1,5 mL) da cultura foram centrifugados a 13.000 g por 60 seg e as células ressuspendidas em 700 µL de tampão GET (50mmol/L de glucose, 25mmol/L de Tris HCl pH 8,0 e 10 mmol/L de EDTA pH 8,0). A seguir, adicionou-se lisozima numa concentração final de 300 µg/mL e incubou-se a 37°C por 60 min. Em seguida 150 µL de solução de 10% SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) foram adicionados e as amostras foram incubadas a 37°C por 30 min. Pronase E e RNase foram adicionadas, para uma concentração final de 200 µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente, incubou-se a 37°C *overnight*. No dia seguinte, adicionou-se 500 µL de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (1:1) aos tubos com as amostras, seguido de agitação branda por aproximadamente 10 min. A emulsão foi então centrifugada a 13000g por 10 min. A solução sobrenadante foi retirada e transferida para um novo tubo plástico de 1,5 mL. Esse processo foi repetido mais duas vezes.

Os ácidos nucléicos foram precipitados pela adição de 2 volumes de etanol e incubação em geladeira *overnight*. Na manhã seguinte a mistura foi

centrifugada por 20 min a 13.000g e o sobrenadante descartado. O DNA que estava no tubo foi então lavado duas vezes com 800 µL de etanol 70% e recuperado por centrifugação por 5 min a 13.000g. Depois da segunda lavagem, o sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco para retirada do etanol residual. Finalmente, o DNA foi dissolvido em 100-200 µL de água milli-Q estéril mantido à 37°C por 1 h e estocado a 4°C.

A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel 0,8% agarose revelado com *SYBRgold* (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). A concentração do DNA total extraído foi determinada por fluorimetria (DyNA Quant 2000 Fluorometer, Amersham Biociences, Buckinghamshire, Reino Unido). A amostra de DNA também foi quantificada em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA).

4.5.2 Amplificação do gene 16S rDNA

Para a amplificação do gene 16S rDNA foram utilizados os iniciadores Y1-Y2, Y1-Y3 e Y1-16S805 (Tabela 1). O iniciador Y1 anela na ponta 5' do gene 16S rDNA, já o Y3 na 3', gerando um produto de amplificação que compreende quase todo o gene, de aproximadamente 1,5 Kb. O conjunto Y1-Y2 permite a amplificação de aproximadamente 350 pb a partir da ponta 5' da molécula do 16S rDNA. O par Y1-16S805R produto amplificado foi aproximadamente 750pb. O par de iniciadores Y1-16S805R foi usado quando reação com os outros iniciadores falharam. As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 20 µL, contendo 25 ng de DNA; 10X Tampão da *Taq* com KCl [100 mM Tris-HCl (pH 8,8); 500 mM KCl; 0,8% Nonidet P40]; 100 µM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada iniciador (Y1-Y2, Y1-Y3 e Y1-16S805) e 1 U de *Taq polymerase* (Fermentas Life Science). As amplificações foram conduzidas com desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 20 seg a 57°C, 1 min a 72°C e uma etapa de extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos da amplificação da região 16S rDNA foi separado por meio de eletroforese em gel 1,5% agarose em tampão

Tris-Borato-EDTA (10X TBE: 0,89 M de Trisma-base; 0,86 M de Ácido Bórico, 0,02 M de EDTA [pH 8,0]) a 3 V.cm^{-1} .

A purificação dos fragmentos de DNA obtidos adicionou-se 15 μL Acetato de Amônio 7,5 mol/L e 40 μL de 96% etanol. Os tubos foram incubados no gelo por 20 minutos e centrifugados por 15 min a 13.000g. O DNA foi lavado com 70% etanol por duas vezes, seco a 37°C por 1 h e dissolvido em 20 μL de água milli-Q estéril.

Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA dos isolados endofíticos

Nome	Sentido	Tamanho (pb)	Posição em <i>E. coli</i>	Sequência (5' - > 3')	Referência
Y1	Forward	22	20-43	TGGCTCAGAACGAACTGGCGGC	Young et al. 1991
Y2	Reverse	24	338-261	CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT	Young et al. 1991
Y3	Reverse	26	1482-1507	TACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC	Young et al. 1991
16S805	Reverse	23	783-805	GACTACCAGGGTATCTAATCCTG	Cruz, 2001

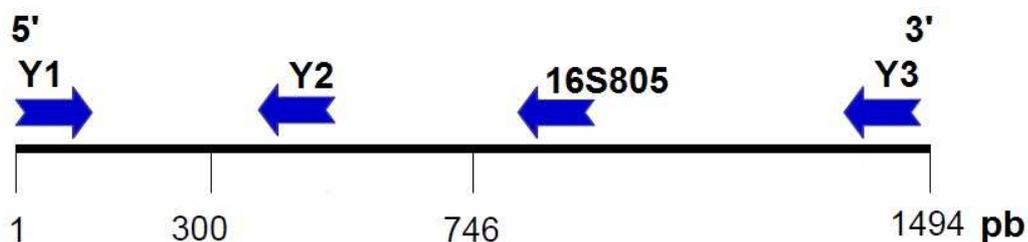


Figura 1. Esquema de anelamento dos iniciadores no gene 16S rDNA

4.5.3 Sequenciamento do gene 16S rDNA

O sequenciamento foi realizado usando o protocolo padrão do kit *DyEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare) e realizado no sequenciador ABI-3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

Os cromatogramas do sequenciamento foram analisados quanto a qualidade e presença do vetor com o programa *Phred*, *Phrap* e *Consed* e o alinhamento das sequências para cada clone foi realizado no programa CLUSTAL W - BioEdit (THOMPSON et al., 1994). As sequências foram comparadas por BLASTn com o banco de dados do NCBI. Para o alinhamento das sequências com um padrão disponíveis no banco de dados NCBI utilizou-se o programa MultiAlin (COPERT, 1988). As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL W e os resultados destes alinhamentos foram utilizados para análise filogenética no programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011), para obtenção de árvore consensual que melhor representasse essas relações.

4.5.4 Identificação dos isolados por comparação das sequências

As sequências consensos, sem os iniciadores, foram analisadas pelo programa *Seqmatch* - disponível no *site* RDP (Ribosomal Database Project - <http://rdp.cme.msu.edu>), visando classificar taxonomicamente as sequências de acordo com a taxonomia bacteriana proposta no Bergey's Trust. Em seguida foi feita uma busca de similaridade no banco de dados do *GenBank*, através do programa BLASTn (ALTSCHUL, 1997). Nesta etapa foi determinada a identidade das sequências dos isolados com base nos dados existentes no banco. A partir do alinhamento das sequências foi construída uma árvore filogenética foi reconstruída através do método de *Máxima Parcimônia*, com o auxílio do programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento das bactérias endofíticas

As plantas constituem um complexo ecossistema onde comunidades bacterianas interagem continuamente, competindo por nutrientes e água nos diferentes tecidos do hospedeiro. O número de diferentes espécies e populações dentro da comunidade são parâmetros essenciais para definir a sua estrutura e diversidade (OLIVARES, 1997). Portanto, o conhecimento da diversidade endofítica é importante para a compreensão da ecologia da comunidade bacteriana favorecendo sua aplicação na melhoria da produtividade e manejo de culturas de interesse agrônômico (CAVALCANTI; DÖBEREINER, 1988).

As bactérias endofíticas podem apresentar diversos efeitos no desenvolvimento da planta hospedeira (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Por exemplo, podem ser utilizadas como biofertilizantes, aumentando a produtividade da cultura através de uma combinação de mecanismos que podem incluir fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, aumento da disponibilidade de nutrientes do solo e controle de doenças (HALLMANN et al., 1997; COCKING, 2003). É possível que os organismos caracterizados neste estudo tenham potencial para serem usados nesses casos. Por exemplo, o desenvolvimento de doença por *Erwinia carotovora*, uma bactéria patogênica, pode ser inibido por inoculação de *Pseudomonas* sp, *Curtobacterium luteum* ou *Pantoea agglomerans* (REITER et al., 2002). Outros estudos mostram que *Enterobacter* promove de crescimento vegetal, influencia na infecção por nematódeos, sendo capaz também de fixar nitrogênio. Os endofíticos fixadores de nitrogênio mais frequentemente isolados são *Herbaspirillum seropedicae*, *Glucanoacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum brasilense* e *Burkholderia amazonense* (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988; OLIVARES et al., 1997).

Para a cultura do pinhão manso não existe relato na literatura sobre a comunidade bacteriana endofítica. Neste trabalho, as bactérias endofíticas do caule, folhas e raízes do pinhão manso, isoladas nos meios LGI-P e JNFb foram caracterizadas, levando-se em consideração uma abordagem

inicialmente morfológica, fisiológica, bioquímica e molecular. O processo de caracterização das bactérias isoladas foi efetuado através da determinação de um número mínimo de atividades metabólicas específicas, contudo, o menor número de observações efetuadas aumenta o risco de erros de identificação, porém os marcadores moleculares são ferramentas que minimizam os erros de outros marcadores. Fernandes et al. (2001) trabalharam com 20 isolados obtidos de folhas e raízes de coqueiro e utilizaram muitos testes bioquímicos para identificar os microrganismos estudados, contudo algumas dúvidas não foram esclarecidas.

Foram encontradas populações de $4,2 \times 10^3$, $9,1 \times 10^4$ e $8,55 \times 10^3$ bactérias endofíticas por grama de matéria fresca no caule, raiz e folha, respectivamente para o pinhão manso. A maior contagem do MPN de bactérias nas raízes do pinhão manso do que nas outras partes da planta, fato que também foi demonstrado para outras espécies (TEIXEIRA et al., 2008). Júnior et al. (2000) trabalharam isolando bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar, encontraram maior ocorrência de bactérias nas raízes.

Neste trabalho foram obtidos 46 isolados diferentes que foram estocados em *ependorfs* e mantidos em geladeira. Vinte nove isolados cresceram em meio JNFb, com a capacidade de tornar o meio cultura básico (Figura 2) e 17 desenvolveram no meio LGI-P tornaram o meio cultura ácido (Figura 3).



Figura 2. Característica do isolado LFV-21 crescendo em meio seletivo JNFb. A tonalidade azul indica que o microrganismo tem capacidade de tornar o meio básico



Figura 3. Característica do isolado LFV-39 crescendo em meio seletivo LGI-P. A tonalidade amarela indica que o microrganismo tem capacidade de tornar o meio ácido

Os meios de cultura JNFb e LGI-P são específicos para o isolamento de bactérias endofíticas que fixam o N_2 atmosférico, desta forma, em sua composição apresentam baixos teores de nitrogênio, estimulando o desenvolvimento de microrganismos diazotróficos (CAVALCANTI; DÖBEREINER, 1988). Sendo assim, no meio JNFb os 29 isolados encontrados apresentam características parecidas com o gênero *Herbaspirillum* spp.. No meio de cultura LGI-P desenvolveram 17 isolados que possuem características parecidas com a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que é a única espécie desse gênero capaz de fixar N_2 (DÖBEREINER et al., 1995). O meio Batata-P é utilizado para purificar *G. diazotrophicus* que apresenta colônias inicialmente claras e úmidas, tornando-se de coloração chocolate após sete a dez dias de incubação à 30°C (DÖBEREINER et al., 1995). Os resultados obtidos a partir deste meio foram colônias claras e com aspecto úmido, não sendo observada a coloração chocolate característica da *G. diazotrophicus* (Figura 4 e Figura 5).



Figura 4. Característica do isolado LFV-8 crescendo em meio seletivo Batata-P



Figura 5. Característica do isolado LFV-33 crescendo em meio seletivo Batata-P

Das 46 estirpes, 19 foram isoladas das folhas, 11 do caule e 16 das raízes. Estes números foram obtidos considerando as características macroscópicas e microscópicas das colônias. Todos os isolados foram analisados bioquimicamente e molecularmente.

5.2 Caracterização fisiológica e bioquímica

Os isolados selecionados durante o estudo foram submetidos à coloração Gram, sendo caracterizados, em sua maioria, como bactérias Gram negativas (71,7%) e em forma de bastão (82,6%; Tabela 3). Os gêneros *Herbaspirillum* spp. e *G. diazotrophicus* são Gram negativas, aeróbias obrigatórias e as células possuem o formato de bastonete (DÖBEREINER et al., 1995). As células bacterianas podem ser visualizadas individualmente, em pares ou estruturas como cadeias sem endósporos. A grande maioria dos isolados de pinhão manso caracteriza-se por apresentar formato de bastonete, Gram negativo, anaeróbicos facultativos havendo a possibilidade de tratar-se

de espécie da ordem Enterobacteriales (Figura 6; Figura 7 e Figura 8). Tortora et al. (2005) descrevem esses microrganismos por apresentar o formato de bastonete, Gram negativo, anaeróbicos facultativos, se locomovem, por meio de flagelos peritríquios e fermentam a lactose para produzir ácido e gás.

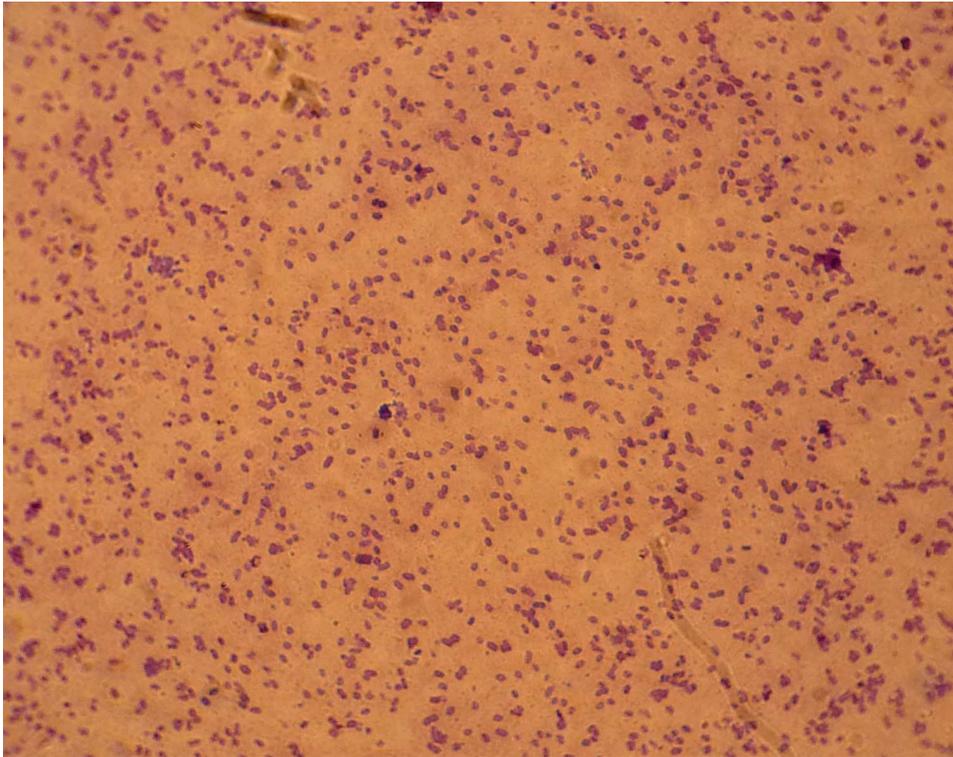


Figura 6. Característica do isolado LFV-38, Gram positiva e formato tipo bastonete

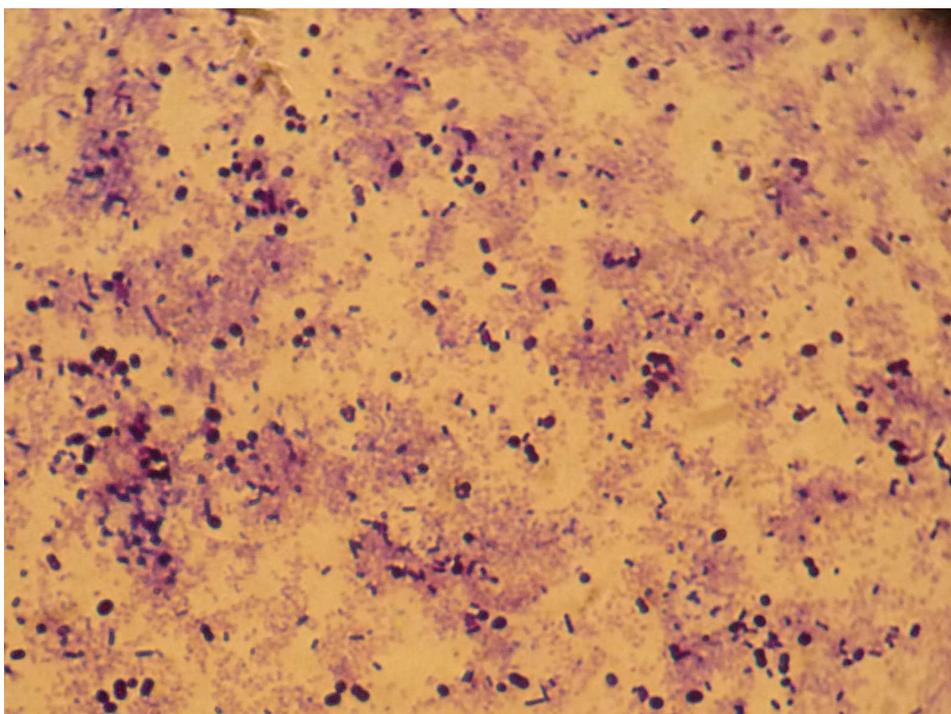


Figura 7. Característica do isolado LFV-15, Gram positiva e formato tipo coco

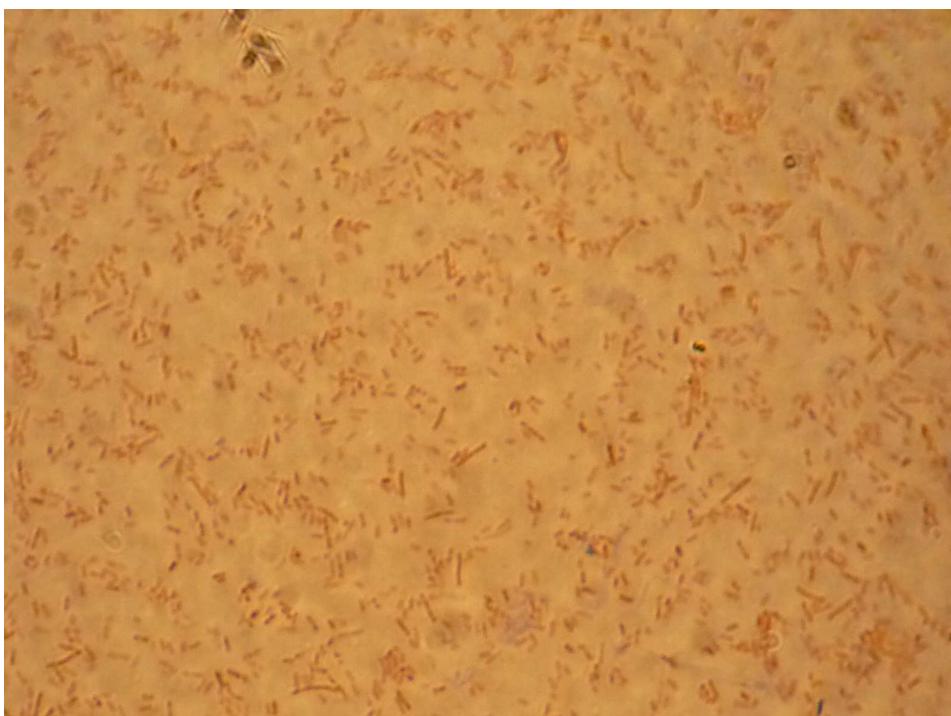


Figura 8. Característica do isolado LFV-23, Gram negativa e formato tipo bastonete

Os isolados foram repicados em diferentes meios de cultura, visando selecionar as diferentes características bioquímicas (Figura 9).

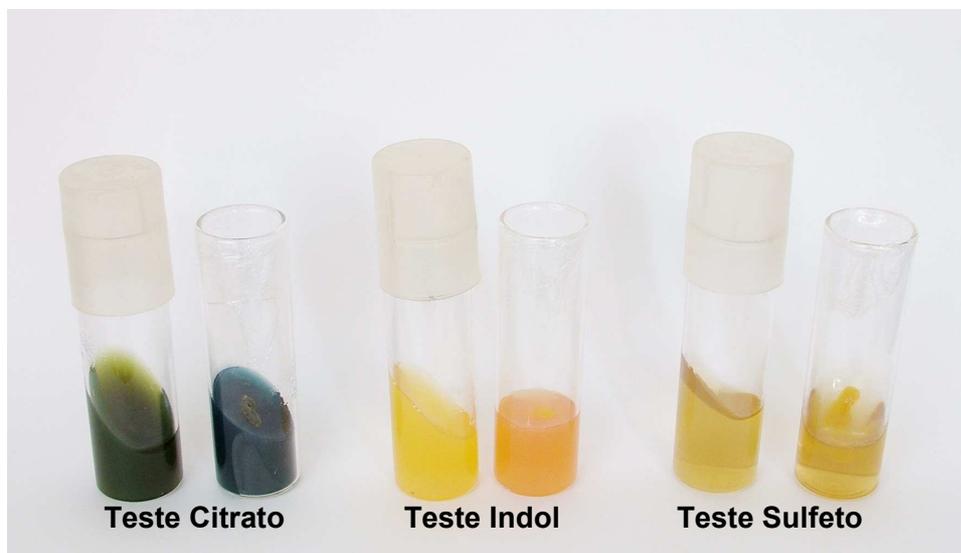


Figura 9. Testes bioquímicos utilizados para caracterizar os isolados

O primeiro teste baseou-se na utilização do citrato como fonte de carbono em seu metabolismo e conseqüentemente crescimento, pois na ausência de glicose ou lactose fermentável, alguns microrganismos são capazes de usar o citrato como única fonte de carbono para produzir energia. Esta capacidade depende da presença de citrato permease que facilita o transporte do citrato para o microrganismo. Uma vez dentro da célula o citrato é degradado pela enzima citrase, produzindo ácido oxalacético e acetato. Estes produtos são depois convertidos enzimaticamente em ácido pirúvico e CO_2 . O meio de citrato-Simmons contém citrato de sódio como única fonte de carbono, NH_4^+ como fonte de azoto e o indicador de pH, azul de bromotimol. Esta prova é feita em tubos em rampa, uma vez que o O_2 é necessário para a utilização do citrato. Quando o microrganismo remove o citrato do meio e o oxida, ocorre libertação de CO_2 . Durante esta reação o meio torna-se alcalino, pois o CO_2 gerado combina-se com sódio (fornecido pelo citrato de sódio) e água para formar carbonato de sódio, que é um produto alcalino. A presença de carbonato de sódio faz aumentar o pH e virar o indicador de pH do meio de verde para azul forte. Para este teste somente seis isolados não utilizaram o

citrato como fonte de carbono (Figura 10), sendo assim, a maioria dos isolados de pinhão manso são citrato positivas (86,9%, Tabela 3).

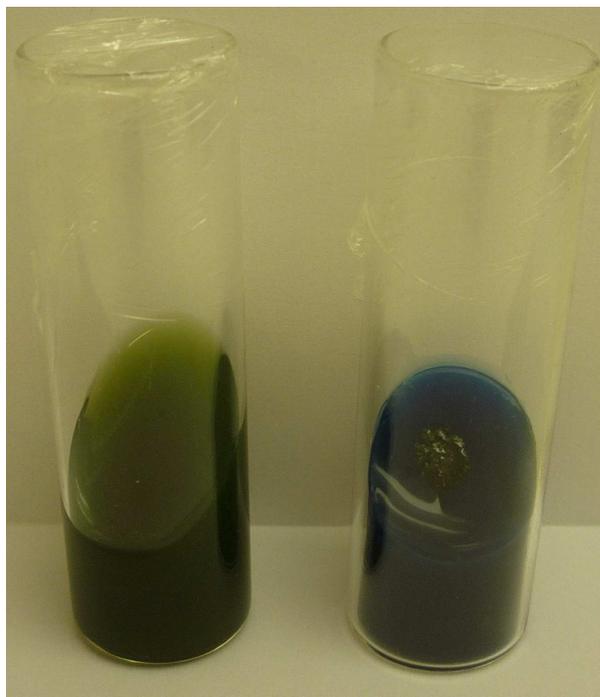


Figura 10. Característica do meio de cultura com as bactérias citrato negativas (verde) e positivas (azul)

Com o segundo teste buscou-se conhecer a motilidade dos isolados e a capacidade de produção de indol. O objetivo deste teste foi determinar a capacidade do microrganismo se mover, pois as bactérias diazotróficas endofíticas *Herbaspirillum* spp. e *G. diazotrophicus* possuem grande mobilidade, além disso, buscou-se verificar a capacidade do microrganismo degradar o aminoácido triptofano (presente em quase todas as proteínas) até indol. O triptofano é um aminoácido essencial que pode sofrer oxidação pelas atividades enzimáticas de algumas bactérias. A conversão do triptofano em produtos metabólicos é mediada pela enzima triptofanase. Como a capacidade de hidrolisar o triptofano com produção de indol (não é utilizado e acumula-se no meio) não é uma característica de todos os microrganismos serve como marcador bioquímico. Há microrganismos que não metabolizam o triptofano ou

então fazem metabolização completa desse aminoácido sem produzir indol. O teste revelou que 86,9% dos isolados possuem mobilidade e que apenas 26% são indol positivas (Tabela 3), indicando assim, a existência de diversidade bioquímica entre os isolados (Figura 11).

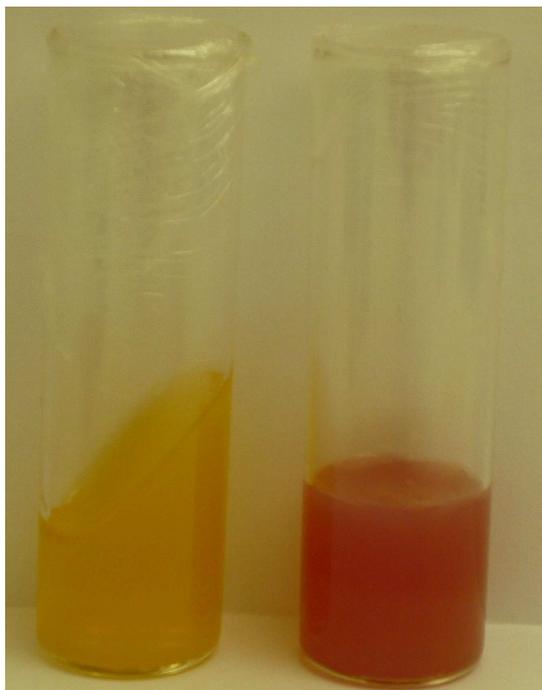


Figura 11. Característica do meio de cultura com as bactérias indol negativas (amarelo) e positivas (vermelho)

No teste para verificar produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S) buscou determinar a capacidade dos isolados em produzirem o gás H_2S , a partir de substratos como aminoácidos sulfurados ou compostos sulfurados inorgânicos. Muitas proteínas são ricas em aminoácidos sulfurados, como a cisteína. Quando estas proteínas estão presentes no meio de cultura podem ser degradadas pelas enzimas microbianas a aminoácidos que são utilizados como nutrientes. O aminoácido cisteína, na presença da enzima cisteína desulfurase, perde o seu átomo de enxofre que por sua vez é reduzido pela adição de hidrogênio da água para formar H_2S . O H_2S é então produzido pela hidrogenação (redução) do enxofre orgânico presente no aminoácido cisteína. Por outro lado, o H_2S pode ser produzido pela redução de compostos

sulfurados inorgânicos, como os tiosulfatos ($S_2O_3^{2-}$), os sulfatos (SO_4^{2-}) e os sulfitos (SO_3^{2-}). Quando o meio contém tiosulfato de sódio alguns microrganismos têm capacidade para reduzir a sulfitos usando a enzima tiosulfato redutase, com liberação de H_2S . Os átomos de enxofre atuam como aceitadores de hidrogênio durante a oxidação dos compostos inorgânicos. Neste teste ficou claro que poucos isolados (4,3%, Tabela 3, Figura 12) possuem a capacidade de produzir sulfeto utilizando como substrato o meio SIM.

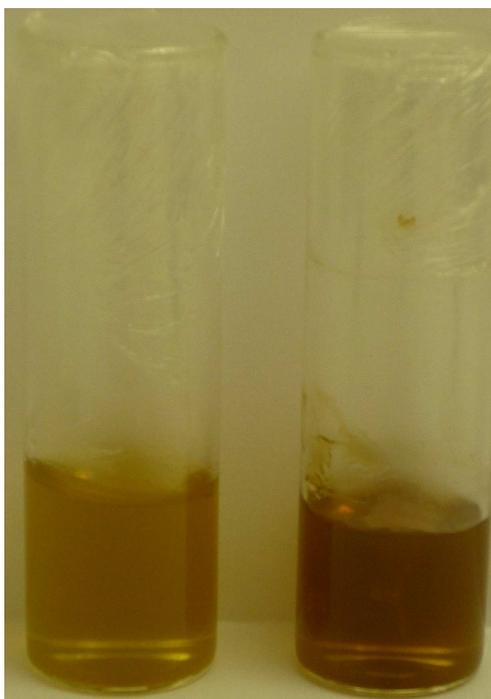


Figura 12. Característica do meio de cultura com as bactérias sulfeto negativas (marrom claro) e positivas (marrom escuro)

No teste da urease buscou-se verificar a capacidade do microrganismo desdobrar a ureia utilizando a enzima urease. A urease é uma enzima hidrolítica que ataca a ligação entre o azoto e o carbono em compostos como a ureia, formando o produto final alcalino, amônia, além de CO_2 e H_2O . Neste teste verificou-se que apenas cinco isolados foram positivos (10,8%, Tabela 3) quanto à produção de urease após 24 h de incubação à $30^\circ C$.

O teste da catalase foi utilizado para diferenciar *Staphylococcus*, que são catalase positivos de *Streptococcus*, que são negativos, para tanto, utiliza-

se peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na detecção da enzima. A catalase atua sobre o peróxido de hidrogênio (3 a 5%), desdobrando-o em oxigênio e água, protegendo as bactérias dos ataques com superoxidantes produzidos pelo sistema de defesa. O teste demonstra que 93,5% dos isolados possuem a capacidade de se defender de ataques de substâncias superoxidantes.

Teixeira et al. (2008) utilizando testes bioquímicos para identificar bactérias diazotróficas do solo, raízes de *Gossypium hirsutum*, *Saccharum officinarum* e *Zea mays* cultivados em solos de cerrado, encontram resultados semelhantes aos encontrados neste estudo. A maior contagem do MPN de bactérias foi nas raízes, além de isolar um grande número de bactérias endofíticas, caracterizadas em sua grande maioria como Gram negativas, formato de bastão, as bactérias utilizam o citrato como fonte de carbono, móveis em sua grande maioria, indol positivas, negativas para a produção de urease e com poucos isolados produzindo sulfeto (H_2S).

Fica evidente que existe a necessidade da realização de mais testes bioquímicos como fermentação/oxidação de sorbitol e produção de acetoina, para confirmação correta dos isolados. Hinton e Bacon (1995) descreveram a ocorrência de *Enterobacter cloacae* como simbiote endofítico em raízes de milho com base em diversos testes bioquímicos. Bactérias do gênero *Enterobacter* fixam nitrogênio, porém requerem compostos nitrogenados para crescer sob condições estritamente anaeróbicas (MARIN et al., 2012).

Tabela 3. Caracterização dos isolados obtidos de raízes, caules e folhas de pinhão manso pelo meio de isolamento, formato e testes bioquímicos. Presença (+) ou ausência (-)

Identificação	Meio de isolamento		Gram	Formato	Utilização de Citrato	Mobilidade	Produção de		Catalase	Urease
	JNFb	LGI-P					Indol	Sulfeto		
LFV – 1	+	-	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 2	+	-	Positiva	Bastonete	-	-	+	-	+	-
LFV – 3	+	-	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	+
LFV – 4	+	-	Positiva	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 5	+	-	Positiva	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 6	+	-	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 7	+	-	Negativa	Bastonete	-	-	+	-	+	-
LFV – 8	+	-	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 9	+	-	Positiva	Bastonete	+	-	+	-	+	-
LFV – 10	+	-	Negativa	Bastonete	+	+	-	+	+	-
LFV – 11	+	-	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 12	+	-	Negativa	Bastonete	-	+	-	-	+	+
LFV – 13	+	-	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 14	+	-	Positiva	Bastonete	+	+	-	-	+	+
LFV – 15	+	-	Positiva	Coco	+	-	-	-	-	-
LFV – 16	+	-	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 17	+	-	Negativa	Bastonete	+	+	+	-	+	-
LFV – 18	+	-	Negativa	Bastonete	+	+	+	-	+	-
LFV – 19	+	-	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 20	+	-	Negativa	Indefinido	+	+	-	-	+	-
LFV – 21	+	-	Positiva	Bastonete	+	+	-	+	+	-
LFV – 22	+	-	Negativa	Coco	-	-	-	-	-	-
LFV – 23	+	-	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 24	+	-	Positiva	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 25	+	-	Negativo	Bastonete	+	+	+	-	+	-

Continua

Identificação	Meio de isolamento		Gram	Formato	Utilização de Citrato	Mobilidade	Produção de		Catalase	Urease
	JNFb	LGI-P					Indol	Sulfeto		
LFV – 26	+	-	Negativo	Bastonete	-	+	-	-	+	-
LFV – 27	+	-	Positiva	Cilindrica	+	+	-	-	+	-
LFV – 28	-	+	Negativo	Bastonete	+	-	-	-	+	-
LFV – 29	-	+	Negativo	Coco	+	-	+	-	+	-
LFV – 30	-	+	Negativo	Bastonete	+	+	-	-	+	+
LFV – 31	-	+	Negativo	Bastonete	+	-	-	-	+	-
LFV – 32	-	+	Positiva	Indefinido	+	+	+	-	+	-
LFV – 33	-	+	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 34	-	+	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	+
LFV – 35	-	+	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 36	-	+	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 37	-	+	Positiva	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 38	-	+	Positiva	Bastonete	+	-	-	-	+	-
LFV – 39	-	+	Negativa	Bastonete	+	+	+	-	+	-
LFV – 40	-	+	Negativa	Coco	-	-	-	-	+	-
LFV – 41	-	+	Negativa	Bastonete	+	+	+	-	+	-
LFV – 42	-	+	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 43	-	+	Negativa	Bastonete	+	+	-	-	+	-
LFV – 44	-	+	Negativa	Bastonete	+	+	+	-	+	-
LFV – 45	-	+	Negativa	Bastonete	+	+	+	-	+	-
LFV - 46	-	+	Positiva	Coco	+	+	-	-	-	-

5.3 Caracterização molecular

O DNA genômico dos 46 isolados bacterianos foi purificado e utilizado como molde na reação de PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) para amplificação dos genes 16S rDNA. A combinação Y1-Y2 gerou um fragmento de 350 pb do gene 16S rDNA também não amplificou para todos os isolados. Já a combinação Y1-16S805 amplificou um fragmento de aproximadamente 750 pb para todos os isolados, sendo esta uma combinação de iniciadores ideal para análise filogenética dos isolados (Figura 13). O produto da reação de amplificação com os iniciadores Y1-Y3, que corresponde ao gene 16S rDNA quase completo, gerou um fragmento único de 1.500 pb, porém não foi possível amplificar o referido gene para todos isolados.

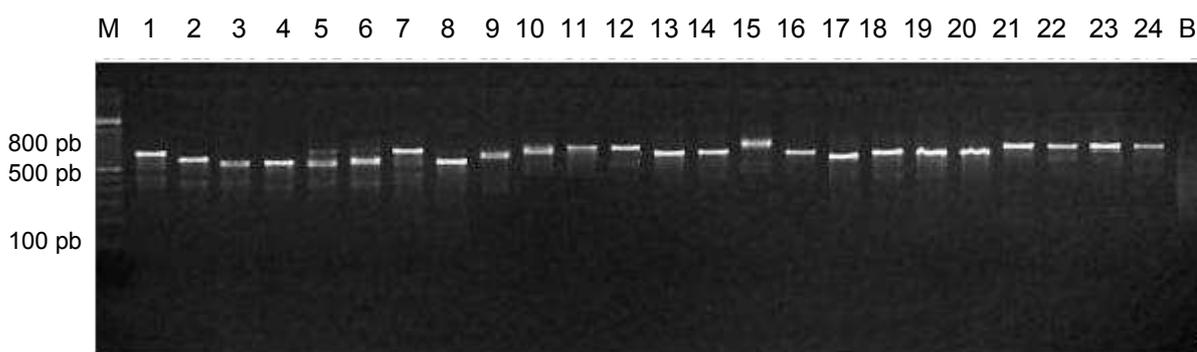


Figura 13. Amplificação de um fragmento da região 16S de isolados de pinhão manso. M: marcador 100 pb; Isolados (LFV-1 a LFV-24); B: branco

As sequências da região Y1-16S805 dos 46 isolados de pinhão manso foram obtidas a partir dos produtos da PCR. Os iniciadores usados na reação de sequenciamento foram os mesmo utilizados na amplificação do fragmento (Y1-16S805). Os eletroferogramas foram analisados para verificação da qualidade das sequências no programa Phred/Phrap/Consed e as regiões contendo baixa qualidade foram descartadas das análises.

As sequências consensos de cada isolado foram analisadas utilizando o programa Seqmatch que usa o banco de dados RDP (Ribosomal Data Project – www.rdp.cme.edu). Essa análise resultou na distribuição das sequências em oito gêneros (Tabela 4), identificadas nas três partes das plantas (folhas, caule e raízes), os isolados mais frequentes foram *Bacillus*,

Burkholderia, *Staphylococcus* e *Salmonella* representando 69,5% dos isolados identificados.

Tabela 4. Ocorrência de bactérias endofíticas, obtidas de plantas de pinhão manso provenientes das raízes, caules e folhas, com base amplificação do gene 16S rDNA

Isolado	Local	Organismo relacionado	Identidade	NCBI
LFV – 1	Folha	<i>Burkholderia gladiori</i>	97%	JQ795144.1
LFV – 2	Folha	<i>Bacillus cereus</i>	91%	JX010784.1
LFV – 3	Caule	<i>Burkholderia cepacia</i>	92%	HQ694175.1
LFV – 4	Folha	<i>Microbacterium</i> sp.	98%	JQ736754.1
LFV – 5	Raiz	<i>Staphylococcus aureus</i>	71%	GU213356.1
LFV – 6	Raiz	<i>Salmonella</i> sp.	93%	JQ048378.1
LFV – 7	Folha	<i>Acinetobacter</i> sp.	92%	AY028622.1
LFV – 8	Caule	<i>Staphylococcus rostri</i>	98%	AM989462.1
LFV – 9	Folha	<i>Bacillus atrophaeus</i>	100%	JX000003.1
LFV – 10	Raiz	<i>Serratia</i> sp.	86%	GU186412.1
LFV – 11	Folha	<i>Bacillus brevis</i>	68%	HM055973.1
LFV - 12	Folha	<i>Burkholderia tropica</i>	83%	JQ795158.1
LFV – 13	Raiz	<i>Serratia rubidaea</i>	93%	JN089365.1
LFV – 14	Folha	<i>Bacillus atrophaeus</i> (2)	95%	JX000003.1
LFV – 15	Folha	<i>Bacillus brevis</i> (2)	73%	HM055973.1
LFV – 16	Caule	<i>Pseudomonas</i> sp.	91%	JQ736769.1
LFV – 17	Raiz	<i>Pseudomonas</i> sp (2)	91%	JQ736769.1
LFV – 18	Raiz	<i>Salmonella</i> sp. (2)	92%	JQ423116.1
LFV – 19	Caule	<i>Bacillus sphaericus</i>	87%	HQ694063.1
LFV – 20	Caule	<i>Burkholderia gladiori</i> (2)	85%	AB680484.1
LFV – 21	Caule	<i>Bacillus cereus</i> (2)	88%	JQ736752.1
LFV – 22	Folha	<i>Burkholderia cepacia</i> (2)	83%	AB680546.1
LFV – 23	Raiz	<i>Microbacterium</i> sp.(2)	100%	JX027502.1
LFV – 24	Folha	<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	92%	GU213356.1
LFV – 25	Raiz	<i>Salmonella</i> sp. (3)	85%	JQ404492.1

Continua

Isolado	Local	Organismo relacionado	Identidade	NCBI
LFV – 26	Folha	<i>Acinetobacter</i> sp. (2)	92%	JX221556.1
LFV – 27	Raiz	<i>Staphylococcus rostri</i> (2)	100%	AM989462.1
LFV – 28	Folha	<i>Bacillus atrophaeus</i> (3)	71%	JQ917920.1
LFV – 29	Raiz	<i>Serratia</i> sp. (2)	76%	JX032802.1
LFV – 30	Folha	<i>Bacillus brevis</i> (3)	84%	HM055973.1
LFV – 31	Raiz	<i>Burkholderia tropica</i> (2)	87%	EU723240.1
LFV – 32	Raiz	<i>Serratia rubidaea</i> (2)	69%	JN934386.1
LFV – 33	Folha	<i>Bacillus atrophaeus</i> (4)	81%	JQ917920.1
LFV – 34	Raiz	<i>Bacillus brevis</i> (4)	94%	JQ832448.1
LFV – 35	Raiz	<i>Pseudomonas</i> sp. (3)	89%	JX035941.1
LFV – 36	Folha	<i>Pseudomonas</i> sp (4)	100%	JQ736769.1
LFV – 37	Caule	<i>Salmonella</i> sp. (4)	72%	JQ048378.1
LFV – 38	Folha	<i>Bacillus sphaericus</i> (2)	95%	HQ684003.1
LFV – 39	Caule	<i>Burkholderia gladioli</i> (3)	91%	JN872507.1
LFV – 40	Raiz	<i>Bacillus cereus</i> (3)	93%	JX024753.1
LFV – 41	Caule	<i>Burkholderia cepacia</i> (3)	97%	HQ694175.1
LFV – 42	Caule	<i>Microbacterium</i> sp.(3)	87%	JX027502.1
LFV – 43	Folha	<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	94%	GU213356.1
LFV – 44	Caule	<i>Salmonella</i> sp. (5)	81%	JQ048378.1
LFV – 45	Folha	<i>Acinetobacter</i> sp. (3)	77%	JX029141.1
LFV – 46	Raiz	<i>Staphylococcus rostri</i> (3)	62%	AM989462.1

As raízes apresentaram maior diversidade de microrganismos endofíticos, com sete dos oito gêneros identificados. Nas folhas e no caule foram identificados seis gêneros, respectivamente. Nas folhas, a exceção dos gêneros *Salmonella* e *Serratia*, no caule *Acinetobacter* e *Serratia*, já nas raízes foi o gênero *Acinetobacter*. Os gêneros *Bacillus* e *Burkholderia* foram encontrados com maior frequência em todas as regiões amostradas. O gênero *Bacillus* nas folhas, caule e raízes representou mais de 20, 4 e 4%, respectivamente, do total de microrganismos endofíticos identificados. Do total de isolados do gênero *Bacillus*, 73% pertenciam às espécies *B. atrophaeus*, *B.*

brevis e *B. sphaericus*, os outros 27% pertenciam ao grupo *B. cereus* (Tabela 4). O gênero *Bacillus* tem sido relatado como a principal bactéria endofítica de determinadas plantas como a mandioca que também é uma Euphorbiaceae (HALLMANN et al., 1997; TEIXEIRA et al., 2007). Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são considerados agentes de biocontrole de doenças de plantas, o que demonstra seu grande potencial para a utilização na agricultura (TEIXEIRA et al., 2007).

Depois do *Bacillus*, o gênero *Burkholderia* (reconhecido com diazotrófico) foi o que apresentou maior número de espécies isoladas (Tabela 4), sendo descrita como endófitos para várias espécies de *citrus* (ARAÚJO et al., 2001). O gênero *Burkholderia* também foi encontrado como endofítico em Poáceas como a cana-de-açúcar e trigo (FAGES; ARSAC, 1991). Esta espécie é descrita como antagonista de *Pythium* sp. (TEIXEIRA et al., 2007), sendo citada também como endófitos de outras culturas (LACAVA et al., 2004).

O gênero *Serratia* foi relatado como endófitos em plantas de pepino (LIU et al. 1995). O gênero *Microbacterium* foi identificado como antagonista de nematoides de solo (HALLMANN et al., 1999).

Segundo Hallmann et al. (1997) muitos autores têm comparado a comunidade bacteriana exofítica e endofítica e a grande maioria das bactérias foram encontradas na rizosfera. Uma explicação para esses resultados é a combinação de fatores físicos e químicos do solo. Neste estudo, a maior diversidade de bactérias foi isolada nas folhas, seguidos das raízes e caule (Tabela 4). Esse fato relaciona-se ao meio de cultivo seletivo com baixa concentração de nitrogênio, utilizado para isolar a comunidade bacteriana. Os mecanismos pelos quais os microrganismos endofíticos podem aumentar os crescimentos das plantas, muitas vezes são obscuros, porém muitas bactérias produzem fitormônios ou mesmo fixar nitrogênio atmosférico, desta forma, os meios utilizados durante o isolamento podem ter selecionado a comunidade bacteriana, pois somente as bactérias diazotróficas tiveram condições adequadas para se desenvolverem.

Silveira et al (2004) verificaram que espécies de *Bacillus*, podem aumentar o crescimento de mudas de pepino, porém esses microrganismos

não são capazes de produzir Ácido Indolacético (AIA), ou mesmo solubilizar fosfato em meio de cultura. Gyaneshwar et al. (2001) relataram que a bactéria diazotrófica *Serratia marcescens*, não reduziu acetileno e nem aumentou o teor de nitrogênio nas plantas de arroz, porém as plantas inoculadas apresentaram crescimento superior quando comparadas com a testemunha, desta forma, pode-se inferir que outros mecanismos podem estar promovendo o acréscimo de massa das plantas.

As interações planta - microrganismos são muito complexas e seus efeitos individuais são difíceis de serem estudados (THAKURIA et al., 2004). As comunidades bacterianas observada neste trabalho, nas diferentes partes das plantas podem representar um componente importante para o desenvolvimento das plantas de pinhão manso em solos marginais. Em razão do pouco conhecimento dos processos interativos entre os microrganismos endofíticos e as partes das plantas que os referidos colonizam preferencialmente, estudos futuros devem ser concentrados em determinadas regiões, visando verificar qual a verdadeira contribuição da comunidade bacteriana para o desenvolvimento da planta.

5.4 Análise filogenética

A similaridade de uma sequência indica a origem comum de um gene, ou seja, as sequências similares podem ser relacionadas filogeneticamente. As análises filogenéticas foram realizadas a fim de ajudar na correta identificação das estirpes e determinar seu relacionamento com espécies afins. Essas análises foram feitas a partir das sequências da região Y1-16S805 do 16S rDNA dos isolados. Os programas BLASTn e *Seqmatch* mostraram a existência de grupos distintos de bactérias. Os alinhamentos (Figura 14) foram feitos com as sequências das estirpes isoladas do pinhão manso e sequências do gene 16S do rDNA do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Esses alinhamentos foram realizados para visualizar melhor o nível de parentesco entre as estirpes isoladas.

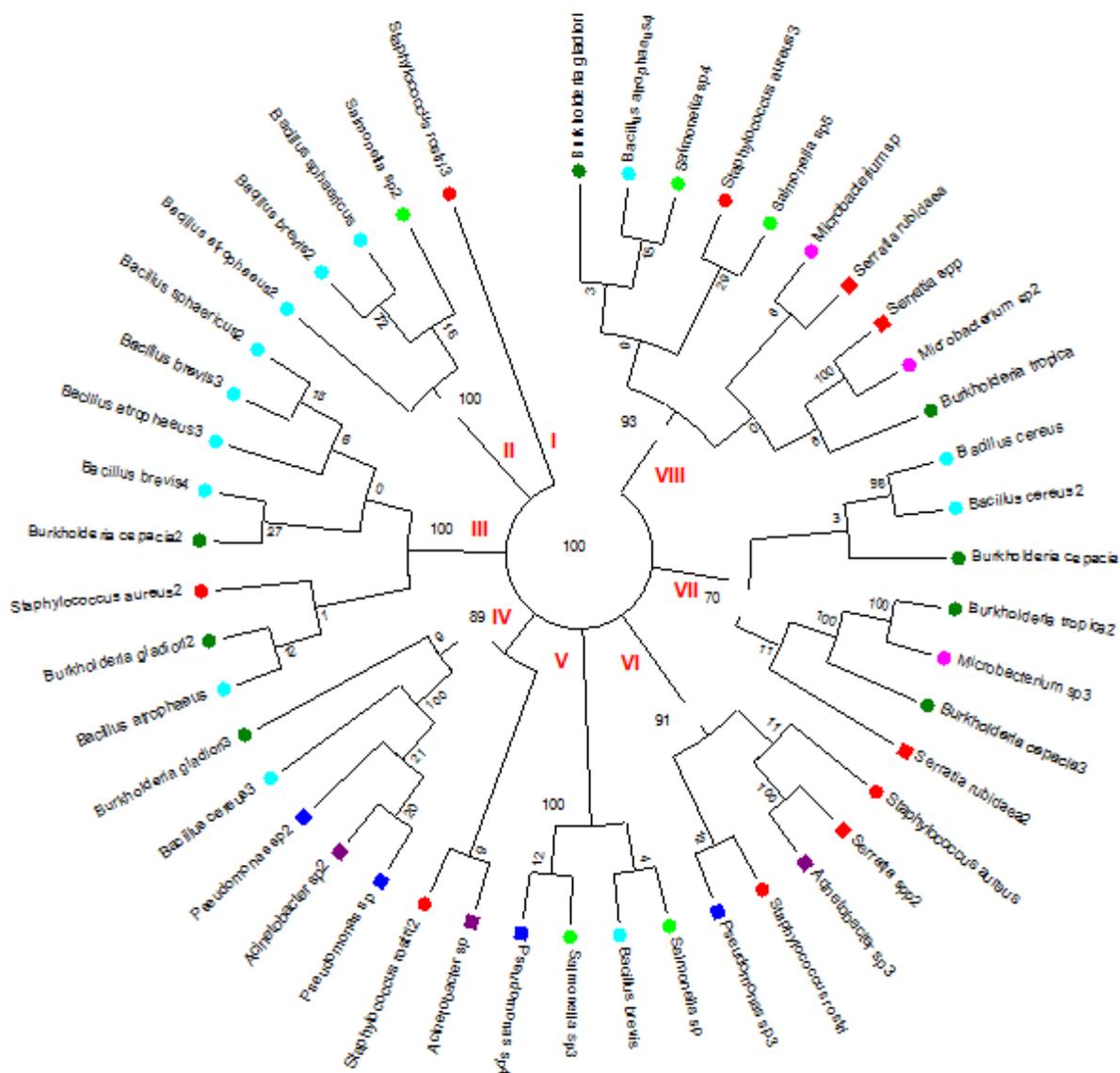
Estudos de comparação entre as sequências do gene 16S do rDNA foram utilizados para avaliar as relações filogenéticas de bactérias endofíticas

isoladas de raízes de trigo (CONN et al., 2004). Desta forma, buscou-se relacionar filogeneticamente pelo método de *Máxima Parcimônia*, com bootstrap para 1000 replicatas no programa MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011).

A árvore consenso foi obtida a partir de 57 árvores mais parcimoniosas, com um índice de consistência (IC) igual a 0,82, o que indica boa topologia da árvore, índice de retenção de 0,45 e o índice composto para todos os sítios informativos. A árvore apresentou oito grupos com valor de *bootstrap* de 70%, sendo o primeiro (grupo I) composto pelo isolado *Staphylococcus rostri* (3) isolado nas raízes (Figura 14). No grupo II ficaram as bactérias *Salmonella* sp. (2) isolada na raiz, *Bacillus sphaericus* do caule, *B. brevis* da folha e *B. atrophaeus* (2) da folha (Figura 14). No grupo III ficaram as bactérias *Bacillus sphaericus* (2) da folha, *Bacillus brevis* (3) da folha, *B. atrophaeus* (3) da folha, *B. brevis* (4) da raiz, *Burkholderia cepacia* (2) da folha, *Staphylococcus aureus* (2) da folha, *Burkholderia gladioli* (2) do caule e *Bacillus atrophaeus* da folha (Figura 14). No grupo III foram agrupadas diferentes espécies, isolados em sua grande maioria nos tecidos foliares. No grupo IV ficaram as bactérias *Burkholderia gladioli* (3) do caule, *Bacillus cereus* (3) da raiz, *Pseudomonas* sp. (3) da raiz, *Acinetobacter* sp. (2) da folha, *Pseudomonas* sp. do caule, *Staphylococcus rostri* (2) da raiz e *Acinetobacter* sp da folha (Figura 14). No grupo V ficaram as bactérias *Pseudomonas* sp. (4) da folha, *Salmonella* sp. (3) da raiz, *Bacillus brevis* da folha e *Salmonella* sp. da raiz (Figura 13). No grupo VI ficaram as bactérias *Pseudomonas* sp. (3) da raiz, *Staphylococcus rostri* do caule, *Acinetobacter* sp. (3) da folha, *Serratia* sp. (2) da raiz e *Staphylococcus aureus* da raiz (Figura 14). No grupo VI foram agrupadas diferentes espécies, porém a grande maioria foi isolada nas raízes. No grupo VII ficaram os isolados *Serratia rubidaea* (2) da raiz, *Burkholderia cepacia* (3) do caule, *Microbacterium* sp. (3) do caule, *Burkholderia tropica* (2) da raiz, *Burkholderia cepacia* do caule, *Bacillus cereus* (2) do caule e *Bacillus cereus* da folha (Figura 14). No grupo VIII ficaram os isolados *Burkholderia tropica* da folha, *Microbacterium* sp. (3) do caule, *Serratia* sp. da raiz, *Serratia rubidaea* da raiz, *Microbacterium* sp. da folha, *Samonella* sp. (5) do caule, *Staphylococcus aureus* (3) da folha,

Salmonella sp. (4) do caule, *Bacillus atrophaeus* (4) da folha e *Burkholderia gladioli* da folha.

A falta de consistência na análise filogenética é um fenômeno é relativamente comum devido à qualidade das sequências analisadas (TEIXEIRA et al., 2008). Este fato pode ser observado na porcentagem da identidade dos organismos relacionados durante a classificação taxonômica das sequências do gene 16S rDNA (Tabela 4).



■ *Acinetobacter* sp. ● *Bacillus* sp. ● *Burkholderia* sp. ● *Microbacterium* sp.

■ *Pseudomonas* sp. ● *Salmonella* sp. ■ *Serratia* sp. ● *Staphylococcus* sp.

Figura 14. Árvore filogenética baseada no gene 16S do rDNA de isolados bacterianos endofíticos de pinhão manso. Os agrupamentos foram calculados pelo método de *Máxima Parcimônia* (MP). Os dados nos ramos indicam valores de *bootstrap*, com um total de 1000 replicações. Identificação dos gêneros e espécies na figura

5.5 Comparação entre os métodos de identificação

A identificação bacteriana foi, durante muito tempo, baseada em caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos. Porém, a identificação ao nível molecular ganhou cada vez mais espaço, principalmente depois do trabalho de Woese em 1987. Atualmente, métodos moleculares constituem a principal abordagem para identificação de microrganismos.

O objetivo desse estudo foi caracterizar a diversidade de bactérias 46 endofíticas isoladas de diferentes partes da planta de pinhão manso, utilizando os perfis morfológicos, fisiológico, bioquímico e molecular. Com as abordagens utilizadas foi possível caracterizar a maior parte dos isolados, porém, em alguns casos ocorreram inconsistências nos resultados devido a alguns problemas como as sequências depositadas nos bancos de dados podem não refletir toda a diversidade existente (Tabela 4), a região de sequência analisada pode não ser longa ou variável o suficiente para identificação desse grupo de bactéria e o sistema de identificação bioquímico utilizado é indicado para isolados clínicos, podendo não abranger um número suficiente de características para identificação. Além disso, a colonização endofítica pode ter selecionado estirpes com características fisiológicas incomuns o meio de cultura com baixa concentração de nitrogênio também pode ter influenciado.

5.6 Potencial dos isolados

As bactérias podem apresentar diversos efeitos no desenvolvimento da planta hospedeira (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Por exemplo, podem ser utilizadas como biofertilizantes, aumentando a produtividade da cultura através de uma combinação de mecanismos que podem incluir fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, aumento da disponibilidade de nutrientes do solo e controle de doenças (COCKING, 2003; HALLMANN et al., 1997; KENNEDY, 1999). É possível que os organismos caracterizados neste estudo tenham potencial para serem usados nesses casos. Por exemplo, o desenvolvimento de doença por *Erwinia carotovora*, uma bactéria patogênica, pode ser inibido por inoculação de *Pseudomonas* sp. (REITER et al., 2002).

Populações endofíticas de *Pseudomonas* podem estar relacionadas com o desenvolvimento dos fungos *Verticillium longisporum* e *Verticillium dahliae* (GRANER et al., 2003; BERG et al., 2005) e a espécie *Pseudomonas aeruginosa* pode inibir infecção de nematodeo em tomate (SIDDIQUI; SHAUKAT, 2003). Outros estudos mostram que *Enterobacter* promove de crescimento vegetal, influencia na infecção por nematodeos e é capaz de fixar nitrogênio (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; HALLMANN, et al., 1998). *Pantoea* também está relacionada com a promoção do crescimento em soja e controle de *Erwinia* (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; STURZ et al., 1999) e *Kluyvera ascorbata* diminui toxicidade de níquel em plantas (BURD et al., 1998).

A produção fitormônios foi relatada em bactérias como *Gluconoacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (LEE et al. 2004; ZAKRAHOVA, 2003; KUKLINSKY-SOBRAL, 2004).

Os endofíticos fixadores de nitrogênio mais frequentemente isolados com os meios seletivos JNFb e LGI-P em cana-de-açúcar são *Herbaspirillum seropedicae*, *Glucanoacetobacter diazotrophicus* e *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia amazonense* (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988; OLIVARES, 1997; TEJERA et al., 2004). Estes organismos não foram encontrados no presente estudo, porém o gênero *Burkholderia* descrito como bactéria diazotrófica foi encontrado em todas as partes da planta de pinhão manso. A ocorrência do gênero *Bacillus* em todas as partes estudadas do pinhão manso também chama a atenção, pois algumas espécies foram descritas como antagonista a patógenos (BACON et al., 2001). Outro ponto que chama a atenção é o desenvolvimento do gênero *Serratia* somente nas raízes e *Acinetobacter* nas folhas, indicando que algumas espécies possuem locais preferenciais para se desenvolverem.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir:

- Muitos gêneros são capazes de se desenvolverem em meio de cultura pobre em relação ao nitrogênio, mesmo não sendo descritas na literatura como bactérias diazotróficas;
- Os testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos não foram eficientes na caracterização dos microrganismos endofíticos isolados;
- O marcador molecular baseado no gene 16S do rDNA permitiu a identificação das estirpes isoladas;
- A maior comunidade bacteriana está localizada nas raízes;
- Fica evidente nos resultados que alguns gêneros se desenvolvem em locais preferenciais enquanto outros em todos os tecidos;
- Os gêneros *Bacillus* e *Burkholderia* foram encontrados com maior frequência em todos os tecidos amostrados;
- O estudo confirma a existência de grande diversidade de bactérias endofíticas colonizando os tecidos do pinhão manso.

7 LITERATURA CITADA

ADACHI, K.; NAKATANI, M.; MOCHIDA, H. Isolation of an endophytic diazotroph, *Klebsiella oxytoca*, from sweet potato stems in Japan. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.48, p.889-895, 2002.

AKER, C. L. **Growth and reproduction of *Jatropha curcas***, 1997. Disponível em: <http://www.jatropha.de/conferences/abstracts-Jatropha97.htm>. Acesso em: 13 de abril de 2007.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.17, p. 1- 25, 1997.

ANDREWS JH, HARRIS RF. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 145-180, 2000.

ARAÚJO, E. C. E.; RIBEIRO, A. M. B. R. Avaliação fenológica do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) no município de Teresina- PI. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 5., 2008, Lavras, MG. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008. p. 1468-1476.

ARAÚJO, W.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

ASSIS, S. M. P.; SILVEIRA, E. B.; MARIANO, R. L. R.; MENEZES, D. Bactérias endofíticas: método de isolamento e potencial antagônico no controle da podridão negra em repolho. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 216-220, 1998.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. de. Endophytic microorganisms a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, 2000. Disponível em: <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full3>. Acesso em: 12 de julho de 2011.

BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON, D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 324-332, 2001.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J.. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5, p. 911-922, 1997.

BECKING, J.H. Identification of the endophyte of *Dryas* in *Rubus* (Rosaceae). **Plant and Soil**, v.78, p. 105-28, 1984.

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, p. 215-229, 2004.

BERGSMA-VLAMI M.; PRINS, M. M. E.; STAATS, M.; RAAIHMAKERS J. M. Assessment of genotypic diversity of antibiotic-producing *Pseudomonas* species in the rhizosphere by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 993-1003, 2005.

BIONDI, N.; PICCARDI, R.; MARGHERI, M. C.; RODOLPHI, L.; SMITH, G.D.; TREDICI, M.R. I. Evaluation of *Nostoc* strain ATCC 53789 as a potential source of natural pesticides. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3313-3320, 2004.

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

BRASIL. Ministério da Indústria e Comércio. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**. Brasília, DF, 1985. 364 p.

BROCK, D. **Cloning Human Beings**: An Assessment of the Ethical Issues Pro and Con. in *Cloning Human Beings* Volume II: Commissioned Papers. Rockville, MD: National Bioethics Advisory Commission. 1997.

BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in Seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3663-3668, 1998.

BUSSE, H. J.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 3-38, 1996.

CABARELLO-MELLADO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1532-1537, 1994.

CÂMARA, G. M. S.; HEIFFIG, L. S. **Agronegócio de plantas oleaginosas: matérias-primas para biodiesel**. Piracicaba: LPV/ESALQ/USP, 2006. 256 p.

CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. **Plant Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.; BÂ, A.; GILLIS, M.; DE LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic *Bradyrhizobia* are natural endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5437-5447, 2000.

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

CONN, V. M.; FRANCO, M. M. F. Analysis of the Endophytic Actinobacterial Population in the Roots of Wheat (*Triticum aestivum* L.) by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Sequencing of 16S rRNA Clones. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1787-1794, 2004.

COPERT, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p.10881-10890, 1988.

CRUZ, L.M. **Caracterização e análise filogenética molecular de novos isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio**. Curitiba, 2001. 168p. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions, endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência & Cultura**, v. 44, n. 5, 1992.

DÖBEREINER, J.; BODDEY, R. M. Nitrogen fixation in association with gramineae. **Current Perspectives in Nitrogen Fixation**, Gibson, A. H; Newton, W.E. (eds), Australian Academic Science, p. 305-312, 1981.

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

DONG, Z.; CANNY, M. J.; McCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. G.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1139-1147, 1994.

DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 2804-2810, 2000.

DURÃES F.; LAVIOLA, B. Pinhão manso: oleaginosa potencial para biodiesel. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA EM PINHÃO MANSO, 1., 2009, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: EMBRAPA Agroenergia, 2009. CD-ROM.

FAGES, J.; ARSAC, J.F. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacteria. **Plant Soil**, v. 137, p. 87-90, 1991.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M.; RODRIGUES, L. da S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n.12, p. 1509-1517, 2001.

GRANER, G.; PERSSON, P.; MEIJER, J.; ALSTROM, S. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. **FEMS Microbiology Lett**, v. 224, p. 269–276, 2003.

GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; FREITAS, R.; SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 43-50, 1998.

GEXSI, L. L. P. **Global market study on jatropha**: project inventory: Latin America. Londres, maio, 2008. Disponível em: http://www.jatropha-alliance.org/fileadmin/documents/GEXSI_Jatropha-Project-Inventory_LATIN-AMERICA.pdf. Acesso em: 20 de setembro de 2010.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; NATARAJAN, M.; 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, p. 2634-2645, 2001.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HALMMAN. J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODRIGUEZ-RABANA, L.; KLOEPPER, J. Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry.**, v. 30, n. 7, p. 925-937, 1998.

HALLMANN, J.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KLOEPPER, J.W. Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 551-560, 1999.

HEAD, I. M., SAUNDERS, J. R.; PICKUP, J. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal rRNA analysis of uncultivated organisms. **Microbial Ecology**, v. 35, p. 1-21, 1998.

HELLER, J. **Physic nut, *Jatropha curcas* L.:** promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 66 p.

HENNING, R.; MITZLAFF, K. Production und Nutzung von Purgieröl als Kraftstoff und Rohstoff für die lokale Seifenherstellung im Sahel. In: KRAUSE, R.; SCHELLERT, C. **Nachwachsende Rohstoffe aus den Tropen und Subtropen für die Tropen und Subtropen.** Witzenhäuser Hochschulwoche. Kassel: Witzenhäuser, 1995. p. 137-151.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, v. 129, p. 117-125, 1995.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research** , v. 65, p. 197-209, 2000.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 77-119, 1997.

JUHÁSZ, A. C. P.; PIMENTA, S.; SOARES, B. O.; MORAIS, D. L. B.; RABELLO, H. O. Biologia floral e polinização artificial de pinhão manso no norte de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 9, p. 1073-1077, 2009.

JÚNIOR, F. B. R.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 985-994, 2000.

KANT, P.; WU, S. The extraordinary collapse of *Jatropha* as a Global Biofuel. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 17, p. 7114-7115, 2011.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, ecosystems and Environment**, v. 74, p.65-76, 1999.

KIRCHOFF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Biology & Biochemistry**, n. 5, p. 853-862, 1997.

KLOEPPER, J. W. et al. Proposed elimination of the term Endorhizosphere. **Phytopathology**, v. 82, p. 726-727, 1992.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

LAMBRECHT, M.; OKON, A. Y.; BROEK V.; VANDERLEYDEN J., Indole-3-acetic-acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interaction. **Trends Microbiology**, v. 8, p 298–300, 2000.

LACAVA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J. L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, p. 55-59, 2004.

LEE S. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 16, p. 5384-91, 2004.

LIU, L.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, v.85, p.843-847, 1995.

LOIRET, F. G. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 504-11, 2004.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155-173, 1994.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. **Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical.** Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/download/doc091.pdf>. Acesso em: 15/01/12.

MISKO, A. L.; GERMIDA, J. J. Taxonomic and functional diversity of *Pseudomonas* isolated from the roots of field-grown canola. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 399-407, 2002.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, n. 154, p. 105-114, 2003.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 2764-2769, 1996

NEWMAN, D. K.; BANFIELD, J. F. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. **Science**, n.10, v. 296, p.1071-7, 2002.

NUNEZ, W. J.; COLMER, A. R. Differentiation of *Aerobacter-Klebsiella* isolated from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, v. 16, n. 12, p.1875-8, 1968.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

OLIVARES, F. L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana de açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. 1997. 344p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v. 135 n. 4, p. 723-737, 1997.

PACE, N. R., A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-40, 1997.

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel. 1973. 282 p.

POSTGATE, J. R. **The fundamentals of nitrogen fixation**. Cambridge: University Press, 1982. 255 p.

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 577-582, 1997.

RAJKUMAR, M.; LEE W. H.; LEE K.J. Screening of bacterial antagonists for biological control of *Phytophthora* blight of pepper. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, p. 55-63, 2005.

RAJU, A. J. S.; EZRADANAM, V. Pollination ecology and fruiting behaviour in a monoecious species, *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 1395-1398, 2002.

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2261-2268, 2002.

ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FARIA, D. A.; PAPPAS, M. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, v. 50, p. 2372-2382, 2010.

SABARATNAM, S.; BEATTIE, G. A. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in Epiphytic and Endophytic Colonization of Leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 69, n. 2, p. 1220-1228, 2003.

SAHAY, N. S.; VARMA, A. *Piriformospora indica*: a new biological hardening tool for micropropagated plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 181, n. 2, p. 297-302, 1999.

SAITOU, N.; NEI, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p. 406-25, 1987.

SANDERSON, K. Wonder weed plans fail to flourish. **Nature**, v. 461, n. 17, p. 328-329, 2009.

SATURNINO, H.M.; PACHECO, D.D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N.P. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, v. 26, p. 44-78, 2005.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. de. **Biotecnologia**: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EducS, 2002. 433p.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on the diversity of culturable microfungi and nematodes associated with tomato: impact on root-knot disease and plant growth. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 1359-1368, 2003.

SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.R.; SILVA NETO, E.B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, v. 22, p. 217-221, 2004.

STROBEL, G; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, p. 13-19, 1997.

STURZ A. V.; CHRISTIE B. R.; MATHESON B. G.; ARSENAULT W. J.; BUCHANAN, N. A. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Pathology**, v. 48, n. 3, p. 360-369, 1999.

SUDHEER PAMIDIMARRI, D. V. N.; CHATTOPADHYAY, B.; REDDY, M. P. Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence. **Molecular Biology Reports**, v. 36, p. 1929-1935, 2009.

SUJATHA, M.; DHINGRA, M. Rapid plant regeneration from various explants of *Jatropha integerrima*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 35, n. 3, p. 293-296, 1993.

SUNITA, K.; KOCHHAR, V. K.; SINGH, S. P.; KATIYAR, R. S.; PUSHPANGADAN, P. Differential rooting and sprouting behavior of two *Jatropha* species and associated physiological and biochemical changes. **Current Science**, v. 89, n. 6, p. 936-938, 2005.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega5: Molecular evolutionary, genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, 2731-2739, 2011.

TEJERA, N.A.; ORTEGA, E.; RODÉS, R.; LLUCH, C. Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50 n. 9 p. 745-750. 2004.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S. de; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnoviedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.43-49, 2007.

TEIXEIRA, J. R.; FERREIRA, A. S.; SANTOS, M. A. Isolamento de bactérias diazotróficas do solo e raízes de *Gossypium hirsutum*, *Saccharum officinarum* e *Zea mays* cultivados em solos de cerrado. **Horizonte Científico**, p. 1-20, 2008.

THAKURIA, D.; TALUKDAR, N.C.; GOSWAMI, C.; HAZARIKA, S.; BORO, R.C.; KHAN, M.R. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, v.86, p.978-985, 2004.

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

TRIPPLET, E. W. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. **Plant Soil**, v. 186, p. 29–38. 1996.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894 p.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity - magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 10, n. 296, p. 1064-1066, 2002.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. et al. Remarkable N₂ – fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 5, p. 1414-1417, 1995.

URETA, A; ALVAREZ, B.; RÁMON, A.; VERA, M. A.; MARTÍNEZ-DRETS, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant and Soil**, v. 127, p. 271-277, 1995.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 105–114, 1992.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

WEBSTER, G. L. Euphorbiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 81, p. 1-144, 1994.

WEISBURG W. G; GIOVANNONI, S. J.; WOESE, C. R. The Deinococcus-thermus phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. **Systematic and Applied Microbiology**, v.11, p.128-34, 1989.

WENBO, M.; ZALEC, K.; GLICK, B. R. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 35, p. 137-144, 2001.

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

WOODSON, S. A.; LEONTIS, N. B. Structure and dynamics of ribosomal RNA. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, p. 294–300, 1998.

YAOWALAK, N.; ARUNEE, W.; THITAPORN, P.; BONGLUCK, K.; RUNGSARID, K.; TANEE, R.; CHALERMPOL, P. Genetic diversity of physic nut (*Jatropha curcas* L.) revealed by SSR markers. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 14, p. 105-110, 2011.

YE, M.; CAIYAN, L.; FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S. Current situation and prospects of *Jatropha curcas* as a multipurpose tree in China. **Agroforestry Systems**, v. 76, p. 487- 497, 2009.

YOUNG, J. P. W.; DOWNERH, L.; EARDLYB, D. Phylogeny of the phototrophic Rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16s rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 2271-2277, 1991.

YOUNG, J. P. W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, R.M.; EVANS, H. J. **Biological Nitrogen Fixation**. New York, London: Chapman e Hall, 1992.

ZAKHAROVA, E. A. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, n. 3, p. 572-6, 1999.

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.