



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - POSAGRO

MARIA DE LOURDES GOMES

BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM CULTIVARES DE
MILHO EM ÁREAS DE CERRADO E MATA NO ESTADO DE RORAIMA

BOA VISTA
RORAIMA - BRASIL
2009

MARIA DE LOURDES GOMES

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM CULTIVARES DE
MILHO EM ÁREAS DE CERRADO E MATA NO ESTADO DE
RORAIMA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal.

Orientador(a): Prof. Dr. Jerri Édson Zilli

Coorientador(a): Prof. Dra. Liamara Perin

Boa Vista
Roraima - Brasil
2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

G633b Gomes, Maria de Lourdes.
Bactérias Diazotróficas endofíticas em cultivares de milho em áreas de cerrado e mata no Estado de Roraima / Maria de Lourdes Gomes. – Boa Vista, 2009.
79 f.
Orientador: Prof. Dr. Jerri Édson Zilli.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

1 – Microbiologia dos solos. 2 – Agricultura. 3 – Milho. 4 – Fixação biológica de nitrogênio. 5 – Amazônia. I - Título. II – Zilli, Jerri Édson (orientador).

CDU – 631.461

MARIA DE LOURDES GOMES

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM CULTIVARES DE
MILHO EM ÁREAS DE CERRADO E MATA NO ESTADO DE
RORAIMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, em parceria com a Embrapa Roraima, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal.

Aprovada: 10 de julho de 2009.

Pesquisador Dr. Jerri Édson Zilli
Orientador – Embrapa Roraima

Prof. Dr. Wellington Farias Araújo
UFRR

Pesquisadora Dra. Kátia de Lima Nechet
Embrapa Roraima

Profa. Dra. Gilmara Maria Duarte Pereira
Bolsista Prodoc/CAPES

Profa. Dra. Flávia Antunes
Bolsista Prodoc/CAPES

À minha mãe, Maria, exemplo de virtude. Aos meus amados sobrinhos (Renata, Fernando e Manoel) pelo amor, atenção e estímulo que sempre me dedicaram. Ao meu companheiro, Aécio, pelo apoio, cumplicidade, amor, incentivo e paciência despendida em toda essa jornada.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sua infinita bondade.

Ao Prof. Dr. Jerri Édson Zilli e à Prof. Dra. Liamara Perin, pelo apoio de sempre, compreensão, críticas e sugestões muito oportunas e extrema sabedoria nos momentos em que eu achava que estava tudo perdido. Sou grata pela oportunidade de ter sido sua orientada.

À Universidade Federal de Roraima e ao Centro de Ciências Agrárias - CCA, pela promoção deste mestrado, um sonho hoje realizado.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, pela parceria na realização do mestrado, por toda logística para realização dos trabalhos e orientação, incluindo todos os funcionários, que são peças-chave para o nosso desempenho.

À CAPES, pelo apoio ao programa de Pós – Graduação em Agronomia.

À Banca Examinadora, pela participação e valorosas sugestões apresentadas a este trabalho.

Aos professores do curso, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários e estagiários do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa, pelo auxílio e colaboração na realização dos trabalhos, em especial para a técnica em laboratório, Aliny Maria Ribeiro de Melo, e ao estagiário Manoel Luiz da Silva Neto.

Aos amigos, Dilzete e Sérgio, pelas horas agradáveis que sempre me proporcionaram nos meus momentos mais angustiantes.

À minha mãe Maria, pelas eternas orações, o seu exemplo e dedicação contribuindo para a conclusão de mais uma importante etapa de minha vida.

À minha querida sobrinha, Renata, pela ajuda, esclarecimento e paciência dispensada durante todo esse caminhar.

A Aécio, meu companheiro e amigo, pela paciência durante as longas horas de ausência dedicada ao curso, pelo apoio e pelo carinho recebidos.

Aos colegas de turma: Diego, Hélio, Roberson, Wolney, Cylles, Rosianne e Shirlany que dividiram todos os momentos, alegres, angustiantes, cansativos, por tudo que junto vivemos, passamos e que ficarão gravados para sempre.

"A mente que se abre a uma nova ideia, jamais
voltará ao seu tamanho original."

(Albert Einstein)

BIOGRAFIA

MARIA DE LOURDES GOMES, filha de Severino Rufino da Silva e Maria Gomes da Silva, nasceu em 01 de 05 de 1960, em Boqueirão-PB.

Em 27 de março de 2003, concluiu o curso de graduação em Bacharel em Agronomia, pela Universidade Federal de Roraima.

Em 23 de outubro de 2003, foi admitida no curso de Pós-Graduação “lato sensu” em Direito Sanitário, na Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca da Fundação Oswaldo Cruz, submetendo-se à defesa de monografia em 10 de novembro de 2004.

Em 27 de junho de 2008, concluiu o curso de graduação em Bacharel em Direito, pela Faculdades Cathedral de Ensino Superior.

Em 14 de maio de 2006, prestou concurso público no Governo do Estado de Roraima, sendo empossada no cargo de Analista Ambiental – Engenheira Agrônoma em 26 de julho de 2006.

Em março de 2007, foi admitida no curso de Mestrado em Agronomia da Universidade Federal de Roraima, submetendo-se à defesa de dissertação em 10 de julho de 2009.

GOMES, Maria de Lourdes. **Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Cultivares de Milho em Áreas de Cerrado e Mata no Estado de Roraima.** 2009. 79p. Dissertação de Mestrado / Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

RESUMO

Plantas de milho se associam com bactérias diazotróficas e podem se beneficiar da Fixação Biológica de Nitrogênio - FBN, porém esses microrganismos apresentam variações quanto aos genótipos e ambientes onde são isoladas. O objetivo deste trabalho foi estruturar uma coleção de bactérias diazotróficas endofíticas, bem como avaliar a densidade e a diversidade em 4 genótipos de milho, (variedades BRS 4157 e BR 106; híbridos BRS 1010 e BRS 3030), cultivados em área de cerrado e mata alterada no Estado de Roraima, em solos submetidos ou não a aplicação de nitrogênio na forma de uréia. As bactérias endofíticas foram isoladas e caracterizadas fenotipicamente no meio de cultura DYG'S sólido e identificadas quanto à capacidade de FBN em meio de cultura semi-sólido BMGM. Posteriormente, as bactérias diazotróficas foram caracterizadas nos meios de cultura semi-seletivos JMV, LGI e NFb (3x) juntamente com bactérias usadas como referências: HRC54 (*Herbaspirillum seropedicae*), CBAmC (*Azospirillum amazonense*), Ppe8 (*Burkholderia tropica*), M130 (*Burkholderia kururiensis*) e Sp7 (*Azospirillum brasilense*). Estas bactérias foram agrupadas através do índice de similaridade SM (Simple Matching) e avaliou-se a diversidade através do índice de Shannon-Weaver. Foram obtidos 537 isolados de bactérias endofíticas, destas, 55 apresentaram capacidade de FBN. A população das bactérias diazotróficas variou de 0,83 a $10,8 \times 10^3$ células g^{-1} de tecido radicular e o valor máximo encontrado no colmo foi de 0,83 células g^{-1} de tecido vegetal. Além disso, tanto a percentagem de bactérias diazotróficas endofíticas em relação ao número total de bactérias, quanto o número de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas refletiram uma interação entre as cultivares de milho e os ambientes. Com 85% de similaridade entre as bactérias, constatou-se a formação de doze grupos fenotípicos e poucos isolados se assemelharam às bactérias usadas como referências. Observou-se ainda que as bactérias se agruparam em relação à cultivar e ao ambiente de onde foram isoladas e que a presença de nitrogênio não interferiu no agrupamento. A presença de nitrogênio aumentou a densidade das bactérias em área de cerrado, ambiente caracterizado por menor teor de matéria orgânica no solo. Foi observada maior diversidade de bactérias em área de mata em relação ao cerrado e nas variedades de milho em relação aos híbridos.

Palavras-chave: *Zea mays*, fixação biológica de nitrogênio, Amazônia, caracterização.

GOMES, Maria de Lourdes. **Endophytic Diazotrophic Bacterias in Maize Cultivars in Cerrado and Forest Areas in Roraima State**. 2009. Dissertação de Mestrado em Agronomia – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.

ABSTRACT

Maize plants associate with diazotrophic bacteria and can be benefitted by Biological Nitrogen Fixation - BNF, however these microorganisms present some variations in relation to the vegetal genotypes and environment where are isolated. The aim of this study was structure a collection of endophytic diazotrophic bacterias as well as characterize the density and diversity of the bacterias in four maize genotypes (varieties BRS 4157, BR 106 and hybrids BRS 1010 and BRS 3030), cultivated in cerrado and altered forest area in Roraima, with and without application of nitrogen fertilizer. The endophytic bacterias were isolated and phenotypically characterized in DYG'S solid culture medium and inoculated in BMGM semi-solid culture medium to evaluate nitrogen fixation capacity. The endophytic diazotrophic bacterias were later characterized in semi-selective culture medium JMV, LGI and NFb (3x) together with bacterias used as references: HRC54 (*Herbaspirillum seropedicae*), CBAmC (*Azospirillum amazonense*), Ppe8 (*Burkholderia tropica*), M130 (*Burkholderia kururiensis*) e Sp7 (*Azospirillum brasilense*). These bacterias were clustered using Simple Matching similarity index and the diversity was evaluated by the Shannon-Weaver index. A total of 537 endophytic bacterias isolated were obtained, and 55 presented BNF capacity. The population of diazotrophic bacterias ranged from 0.83 to 10.8×10^3 cells g^{-1} of the root and it presented in a maximum of 0.83 cells g^{-1} of the vegetable stem. Besides, so much the diazotrophic bacterias percentage in relation to the total number of endophytic bacterias, as well as the number of diazotrophic bacterias isolated, reflected an interaction among the maize cultivars and environments. Twelve phenotypic groups were verified with 85% of similarity among the bacterias, and few isolated were similar to the references strains. The bacterias clustered in relation to maize cultivars and environment where were isolated and, the presence of nitrogen did not interfered in the bacterias clustering. The presence of nitrogen increased the bacterias density in cerrado area that was the environment which presented smaller soil organic matter content. It was also observed larger diversity of bacterias in forest area in relation to the cerrado and in the maize varieties in comparison to the hybrids.

Key words: *Zea mays*, biological nitrogen fixation, Amazônia, characterization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 A CULTURA DO MILHO	4
3.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	6
3.3 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS.....	8
3.3.1 O GÊNERO AZOSPIRILLUM.....	9
3.3.2 GÊNERO HERBASPIRILLUM.....	10
3.3.3 GÊNERO BURKHOLDERIA	12
3.4 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CULTURA DO MILHO	14
4 ARTIGO A: BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM CULTIVARES DE MILHO EM ÁREAS DE CERRADO E MATA NO ESTADO DE RORAIMA	17
4.1 RESUMO.....	17
4.2 ABSTRACT	18
4.3 INTRODUÇÃO	19
4.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.4.1 ENSAIO DE CAMPO E COLETA DE AMOSTRAS.....	20
4.4.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E DENSIDADE	23
4.4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS COLÔNIAS	24
4.4.4 ARMAZENAMENTO DOS ISOLADOS.....	24
4.4.5 IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS.....	25
4.4.6 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM MEIOS DE CULTURA SEMI SELETIVOS.....	25
4.4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.5.1 NÚMERO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NAS PLANTAS DE MILHO	27
4.5.2 DENSIDADE E FREQUÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS	28
4.5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE	

PLANTA DE MILHO.....	33
4.5.4 DIVERSIDADE DE GRUPOS FENOTÍPICOS DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DIAZOTRÓFICAS NAS PLANTAS DE MILHO	38
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	41
REFERÊNCIAS.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.2.1	Aspectos relacionados com o processo de fixação do nitrogênio atmosférico por via industrial e biológica.....	07
Tabela 4.4.1.1	Características químicas Analíticas das Análises de Solo.....	22
Tabela 4.4.1.2	Resultados Analíticos das Análises Foliaves de Plantas de Milho cultivadas em áreas de cerrado (CEAB) e mata (CEC) com (C) e sem (S) aplicação suplementar de nitrogênio.....	23
Tabela 4.5.1.1	Número de Bactérias Endofíticas Totais e Número de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Isoladas de Plantas de Milho e % de Bactérias Endofíticas Diazotróficas Coletadas em Área de Cerrado (CEAB) e Mata (CEC) no Estado de Roraima.....	28
Tabela 4.5.3.1	Grupos fenotípicos de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de cultivares de milho no cerrado e mata e respectivas características utilizadas para a elaboração do dendrograma de similaridade.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.5.2.1	Densidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Obtidas de Raízes de Cultivares de Milho.....	31
Figura 4.5.2.2	Frequência (Número de bactérias endofítica diazotróficas /número de bactérias endofítica totais por grama de plantas) em área de cerrado e mata no estado de Roraima em solos suplementados ou não com nitrogênio.....	33
Figura 4.5.3.1	Dendrograma de similaridade baseado no Coeficiente SM (Simple Matching) e UPGMA (Unweighted Pair Group Method) dos isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e bactérias de referência nos meios DYG'S, NFb (3x), LGI, JMV provenientes dos cultivares de milho.....	36
Figura 4.5.4.1	Diversidade de Grupos Fenotípicos de Bactérias Endofíticas Diazotróficas Isoladas de Cultivares de Milho em Área de Cerrado (CEAB) e Mata (CEC) no Estado de Roraima.....	42

1 INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zea mays* L.), além de ser utilizada diretamente na alimentação humana e animal, constitui matéria prima básica para uma série de produtos industrializados, criando e movimentando grandes complexos industriais onde empregos são gerados e favorecendo a fixação do homem no campo (CAMPOS et al., 1981).

Esta cultura, apesar de estar entre as mais exigentes em termos de fertilidade do solo, notadamente nitrogênio (N), (AMADO; MILNICZUK; AITA, 2002; SOUSA; LOBATO, 2004), tem sido identificada, semelhantemente a outras *Poaceas*, como capaz de se beneficiar do processo de Fixação Biológica de Nitrogênio – FBN.

Neste sentido, o processo de FBN vem de encontro à necessidade de compatibilizar a produção agrícola com a conservação ambiental. Isso denota, que o interesse pelos processos desempenhados por microrganismos do solo tendem a aumentar, pois são, em grande parte, os responsáveis pela conservação, fertilidade do solo e nutrição da planta.

O N é um dos principais componentes das biomoléculas, fazendo parte da estrutura de ácidos nucléicos, aminoácidos e proteínas, o que o torna, portanto, essencial à sobrevivência e crescimento dos organismos. Embora constitua quase 78% da atmosfera terrestre, o N gasoso, N_2 , é quimicamente inerte a temperaturas comuns, e, diferentemente de outros elementos que ocorrem na natureza, suas reservas minerais são relativamente raras (GALLOWAY et al., 2003).

Entre as atividades desempenhadas por microrganismos do solo, a FBN é um dos processos microbianos relacionados à agricultura mais bem estudados e explorados tecnologicamente. Além dos benefícios econômicos, a redução nas aplicações de fertilizantes nitrogenados tende a melhorar a qualidade ambiental, com menor aporte de nitratos para águas superficiais e subterrâneas e menor emissão de gases que contribuem com o efeito estufa (GALLOWAY et al., 2003). A maximização das contribuições da FBN nos agroecossistemas representa, parte dos esforços da pesquisa visando à sustentabilidade das produções agrícolas.

Em um processo de seleção de bactérias eficientes na FBN, o isolamento, visando a constituição de uma coleção de microrganismos, com posterior estudo dos

isolados obtidos, representa uma etapa crucial para o sucesso da pesquisa. Neste sentido, a investigação da ocorrência, o isolamento e a caracterização de bactérias fixadoras de N em plantas da família *Poaceae*, como o milho, cultivadas na região Amazônica recebe destaque tanto pela carência de estudos dessa natureza quanto pelo potencial que a região representa em termos de recursos genéticos.

Estudos conduzidos recentemente no estado de Roraima têm mostrado que cultivares de milho como BRS 1010 se beneficiam da inoculação com bactéria do gênero *Herbaspirillum* (ZILLI et al., 2007). Entretanto, alguns assuntos sobre a densidade e diversidade de bactérias associativas, bem como a resposta de genótipos vegetais a colonização com tais bactérias carecem de mais estudos.

O presente trabalho objetivou estruturar uma coleção de bactérias fixadoras de nitrogênio, nos ambientes de cerrado e de mata alterada no estado de Roraima, em solos suplementados ou não com nitrogênio. Avaliou-se a densidade e a diversidade de bactérias endofíticas em quatro cultivares de milho, sendo duas variedades (BRS 4157 e BR 106) e dois híbridos (BRS 1010 e BRS 3030), em solos suplementados ou não com nitrogênio, nos ambientes de cerrado e de mata alterada no Estado de Roraima.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estruturar uma coleção de bactérias diazotróficas endofíticas de plantas de milho e comparar a densidade e diversidade de bactérias diazotróficas e bactérias endofíticas diazotróficas nas variedades de milho BRS 4157 e BR 106 e nos híbridos BRS 1010 e BRS 3003, cultivados em áreas de cerrado e mata alterada no estado de Roraima com e sem aplicação de nitrogênio.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Constatar a presença de bactérias diazotróficas;
- 2.2.2 Quantificar e caracterizar as bactérias totais endofíticas das plantas de milho cultivado nos diferentes ambientes;
- 2.2.3 Investigar a ocorrência de especificidade entre bactéria diazotrófica endofíticas e cultivares de milho;
- 2.2.4 Investigar o efeito da adubação nitrogenada sobre a densidade e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A Cultura do Milho

O milho é caracterizado como planta monocotiledânea, diplóide e alógama da família das Poaceae (*Gramineae*), cujo ciclo fenológico varia de 90 a 205 dias, dependendo do genótipo e do clima (FAGERIA, 1989; NORMA et al., 1995; TOLLENAAR; DWYER, 1999). É uma planta que utiliza o ciclo fotossintético C-4, sendo eficiente na conversão de CO₂, apresentando altas taxas de fotossíntese líquida, mesmo em elevados níveis de luz.

O Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo, sendo responsável por 5,0% da produção mundial (FAO, 2006), com produção inferior apenas à dos Estados Unidos e da China.

O milho é o segundo grão mais importante para a agricultura brasileira, sendo que no ano agrícola 2007/08, sua produção correspondeu a 40,7 % da produção total de grãos do país, só perdendo para a soja, que obteve 41,6% da produção nacional (CONAB, 2009). Embora o milho seja uma importante cultura para o agronegócio brasileiro, praticamente toda a produção é consumida internamente, ao contrário da soja que concentra sua comercialização nos mercados externos.

A área geográfica do Estado de Roraima é de 22.429.898 hectares, estando disponíveis para o setor produtivo 2.086.951 ha (9,3%), dos quais 1.141.951 ha (54,7%) estão em área de cerrado e 945.000 ha (45,3%) em área de mata (EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 1994). Nestas áreas, o milho é uma das opções de cultura para plantio (VILARINHO, 2006), possuindo 12.200 hectares de área plantada (safra 2007), com uma produção total de 24.400 t, obtendo um rendimento médio de 2000 kg ha⁻¹ (CONAB, 2009).

Dos cultivares de milho recomendados para o estado de Roraima, podemos citar: BR 106, BR 451, BR 473, BRS 4154 Saracura e BRS 4157 “Sol da Manhã” (variedades); BRS 1010 (híbrido simples), BR 201 (híbrido duplo) e BRS 3003 (híbrido triplo) (VILARINHO et. al., 2005).

Os mesmos autores apontam que no período de avaliação (safra 2005/2006) o BRS 1010 produziu em média 6.359 kg ha⁻¹ (média de 11 avaliações), chegando a

produzir 9.307 kg ha⁻¹ na melhor avaliação e o BRS 3003 produziu 5.730 kg ha⁻¹ (média de oito avaliações), chegando a produzir 8.792 kg ha⁻¹ na melhor avaliação. Ambos são materiais de ciclo precoce, que apresentam 110 a 115 dias da emergência até a maturação nas condições de Roraima, são de porte baixo, grãos semiduros de coloração alaranjada e com boa resistência ao acamamento e quebraimento de plantas (VILARINHO, 2006).

A variedade de milho BR 106 possui porte e ciclo intermediários, 2,40 m de altura e 130 dias da emergência, até a maturação nas condições de Roraima, com potencial produtivo de 5.500 kg ha⁻¹ (VILARINHO, 2006). Sendo uma variedade, o BR 106 é mais rústico, possui menor custo de semente, apresenta boa estabilidade de produção e adaptabilidade a todas as regiões brasileiras, resistência ao acamamento e ao ataque das principais pragas (VILARINHO, 2006). Por tudo isso, é um milho ao alcance de todos os produtores brasileiros, independente do seu nível tecnológico, econômico ou social. Em trabalhos realizados na Embrapa Roraima, de 2003 a 2005, o BR 106 produziu em média 2.206 kg ha⁻¹ (VILARINHO, 2006).

A variedade BRS 4157 “Sol da Manhã”, possui grãos duros e alaranjados. É uma variedade precoce que completa seu ciclo em menos de 100 dias nas condições de Roraima; é adaptada a solos de baixa fertilidade natural; é eficiente no uso de nitrogênio e apresenta alto potencial produtivo de 7.500 kg ha⁻¹. Os ensaios realizados na Embrapa Roraima, de 2003 a 2005, mostraram que a BRS 4157 produziu em média 3.532 kg ha⁻¹ (VILARINHO, 2006).

A absorção de N em milho, em relação à percentagem total, oscila em torno de 8% no 1º mês (primeiro estágio), 50% no 2º mês (segundo estágio), 28% no 3º mês e 14% no 4º mês (MALAVOLTA, 1981). O N é o nutriente mais requerido, o que mais limita a produtividade de milho e também o que mais onera a cultura. Desta forma, são necessárias alternativas viáveis que diminuam a quantidade adicionada, sem prejuízo à produtividade da cultura.

Experimento conduzido no estado de Roraima, com a cultivar BR 201, (ARAÚJO; SAMPAIO; MEDEIROS, 1999); para avaliar o efeito das lâminas de irrigação e da adubação nitrogenada sobre alguns componentes de crescimento, produção e rendimento de milho, observou-se que o teor de N nos grãos variou linearmente com a adubação nitrogenada.

O N é constituintes de vários compostos em plantas, tais como: aminoácidos e proteínas; bases nitrogenadas e ácidos nucleicos; enzimas e coenzimas;

vitaminas, glico e lipoproteínas; pigmentos etc., que são responsáveis pela absorção iônica, fotossíntese, respiração, síntese, multiplicação e diferenciação celular, etc. (MALAVOLTA, 2006). Assim, as principais reações bioquímicas em plantas e microorganismos envolvem a presença do N, o que o torna um dos elementos absorvidos em maior quantidade por plantas cultivadas.

O estresse de nitrogênio, mesmo que não se manifeste por sintomas visuais, reduzirá a atividade da enzima Rubisco, responsável pela assimilação do carbono no Ciclo de Calvin e Benson, localizados nas células do feixe da bainha, muito mais que a atividade da enzima PEPC, situada nas células do mesófilo foliar e responsável pela fixação do CO₂ no ciclo C-4 (TRIVELIN, 2000).

3.2 Fixação Biológica de Nitrogênio

Cerca de 78% da constituição gasosa da atmosfera é formada por N molecular (N₂) (ROSWALL, 1979). No entanto, os organismos eucariontes e a maioria dos procariontes são incapazes de utilizar esta forma de N. Isto porque os dois átomos que compõem a molécula encontram-se unidos de maneira muito estável por uma tripla ligação (SPRENT, SPRENT, 1990; EADY, 1991).

Um grupo de bactérias, coletivamente conhecidas como diazotróficas apresenta habilidade para romper a tripla ligação do N₂ (SPRENT, SPRENT, 1990; EADY, 1991) em um processo conhecido como FBN (NEVES, RUMJANEK, 1998.). Este processo é indispensável ao planeta, sendo estimada a extinção da vida em algumas décadas caso fosse interrompido (FRANCO, BALIEIRO 1999). Estima-se que a entrada de nitrogênio nos ecossistemas possa chegar a 300 teragramas (Tg) por meio da FBN anualmente, enquanto a produção industrial, especialmente de uréia através do processo Haber-Bosch na ordem de 100 Tg (GALLOWAY et al., 2003). Na agricultura, estima-se que a exploração da FBN contribua com cerca de 30% do nitrogênio necessário ao desenvolvimento das culturas, que é estimado em mais de 100 Tg anualmente (GALLOWAY et al., 2003).

A FBN é mais bem conhecida em plantas da família Leguminosae as quais realizam uma simbiose mutualística com determinadas bactérias, sendo os primeiros estudos datados ainda do final do século XIX (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Para

plantas da família Poaceae, as primeiras pesquisas mostrando a associação com bactérias diazotróficas surgiram na década de 50 do século passado, especialmente com contribuições de pesquisadores brasileiros (DÖBEREINER, 1959a; DÖBEREINER; ALVAHYDO, 1959b).

O aumento do custo dos adubos nitrogenados e a preocupação cada vez maior, no exterior e no Brasil, com possíveis efeitos negativos do excesso de nitrato nos mananciais são fatores que devem ser levados em consideração para o incentivo do estudo do processo natural de fixação biológica (CANTARELLA; DUARTE, 2004). Assim, todas as possibilidades de incremento da FBN na agricultura devem ser exploradas, não somente como alternativa econômica, mas, também ecológica (CANUTO, 2003).

A Tabela 3.2. mostra alguns aspectos relacionados com a fixação industrial e biológica de N.

Tabela 3.2.1 - Aspectos relacionados com o processo de fixação do nitrogênio atmosférico por via industrial e biológica

Fixação industrial (fertilizantes)	Fixação biológica de nitrogênio (FBN)
Nutriente mais caro, utiliza energia fóssil para produção e distribuição, aumentando o CO ₂ atmosférico e o aquecimento global.	Segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese. Não é poluente, utiliza energia solar, recicla CO ₂
Tem baixo aproveitamento agrônômico e são poluentes de solo, água e atmosfera	Mecanismo responsável por 65% do N ₂ incorporado nos seres vivos do planeta
Representam de 5 a 20% do custo de produção das culturas	Consumem em torno de 2,5% da energia da fotossíntese do planeta
Representam apenas 2% da absorção total de nitrogênio pelas plantas	A vida no planeta terminaria em 30 anos se a fixação biológica do nitrogênio parasse

Fonte: Franco e Baieiro (1999).

3.3 Bactérias Diazotróficas Associativas

A reação de incorporação do N em moléculas orgânicas pelas bactérias diazotróficas é catalisada pelo complexo da enzima nitrogenase e consiste na conversão do nitrogênio gasoso (N_2) à amônia (NH_3) que, posteriormente é convertida a amônio (NH_4^+) e assimilado pelos seres vivos para a formação de suas estruturas orgânicas (POSTGATE, 1982).

As Poaceae são capazes de se associar com diversas bactérias diazotróficas que colonizam desde as raízes até as folhas, na região da rizosfera até o interior do tecido vegetal. Neste segundo caso, as bactérias são chamadas endofíticas e acredita-se que sejam as principais responsáveis pelo ganho de N através da FBN observado em diversas culturas. A divisão do termo endofítico em facultativo e obrigatório foi proposto para distinguir, respectivamente, estirpes capazes de colonizar tanto a superfície quanto o interior da raiz e com sobrevivência no solo, das que não sobrevivem no solo, mas que colonizam o interior e parte aérea dos tecidos vegetais (BALDANI et al., 1997). Tais endofíticos apresentam grande potencial na FBN devido à sua habilidade em colonizar a planta como um todo e estabelecer-se dentro de nichos protegidos de oxigênio ou de outros fatores, podendo expressar seu potencial para fixação de nitrogênio em grau máximo (KENNEDY et al., 1997).

Bactérias diazotróficas endofíticas em gramíneas possuem penetração passiva na planta, acessando o seu interior através de ferimentos, de sítios de emergência de raízes, coifa e estômatos nas folhas, espalhando-se pelos tecidos radiculares via apoplasto, colonizando os espaços intercelulares das células da hipoderme, córtex radicular e parede do aerênquima (JAMES et al. 1994; OLIVARES et al. 1996; OLIVARES et al., 1997; JAMES; OLIVARES, 1998).

A colonização dos tecidos internos de plantas por algumas bactérias pode conferir a estas vantagens ecológicas sobre as bactérias rizosféricas e epífitas (REIS et al., 2000; BASHAN et al., 2004; SALA et al., 2005). Os tecidos internos das plantas propiciam um ambiente mais uniforme e protegido para os microrganismos que a superfície onde estão expostas a condições ambientais extremas como

temperatura, potencial osmótico, radiação ultravioleta e competição microbiana, que são os fatores limitantes à sobrevivência das bactérias ao longo do tempo (JAMES; OLIVARES, 1997).

Dentre as bactérias diazotróficas isoladas, em associação com plantas de milho são encontrados em grandes números tanto no exterior como no interior das plantas, os gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, que serão apresentados a seguir.

3.3.1 O gênero *Azospirillum*

Somente após a redescoberta do gênero *Azospirillum*, que representa um grupo predominante nos endófitos facultativos, por DÖBEREINER; DAY (1975), os cientistas no mundo todo mostraram interesse na associação dos diazotróficos com as gramíneas (DÖBEREINER; BALDANI, 1982). O isolamento das espécies de *Azospirillum* como fixadores de nitrogênio se deveu a introdução de meios semi-sólidos sem N. O desenvolvimento deste meio foi um fato muito importante para o isolamento de diazotróficos com caráter microaerofílico (pouco oxigênio). No caso de *Azospirillum*, entre outros, o crescimento dependente da fixação de N₂ em regiões do meio de cultura onde a tensão de O₂ está em equilíbrio com a taxa de respiração das bactérias e, posteriormente, a película formada vai se deslocando até a superfície do gradiente de oxigênio, graças ao fenômeno de aerotaxia (DÖBEREINER; BALDANI; BALDAN, 1995).

Os representantes deste gênero colonizam tanto o interior quanto a superfície das raízes de várias gramíneas forrageiras e cereais, sendo então chamado de diazotrófico endofítico facultativo (DÖBEREINER; BALDANI, 1992).

A distribuição ecológica de bactérias do gênero *Azospirillum* é extremamente ampla, podendo ser considerada uma bactéria universal que coloniza plantas crescidas em diferentes habitats, predominantemente a rizosférica (DÖBEREINER et al., 1976; MAGALHÃES et al., 1979; FREITAS et al., 1981; DÖBEREINER; PEDROSA, 1987).

O padrão de colonização das raízes das gramíneas pelas espécies de *Azospirillum* mostra uma tendência de especificidade entre grupos de plantas e as

bactérias: *A. lipoferum* ocorre amplamente no córtex de milho, sorgo e de diversas outras gramíneas, mas foi também observada em uma espécie de ciperácea (DÖBEREINER, 1992), enquanto *A. brasilense* ocorre preferencialmente associado a trigo, cevada, aveia, arroz e centeio (DÖBEREINER; DE-POLLI, 1980; ROCHA ; BALDANI; DÖBEREINER, 1981).

Azospirillum halopraeferans é mais específica, tendo sido isolada apenas de uma espécie de gramínea, o 'Kallar grass' (*Leptochloa fusca*), planta nativa do Paquistão, altamente tolerante a solos salinos (REINHOLD et al., 1987). Já a espécie *A. irakense*, tem sido apenas isolada de raízes de arroz (KHAMMAS et al., 1989).

Azospirillum canadense sp., foi isolado da rizosfera de milho no Canadá. Além de realizar a Fixação Biológica de Nitrogênio - FBN produz Ácido Indolacético – AIA (MEHNAZ; WESELOWSKI; LAZAROVITS; 2007a).

Azospirillum oryzae sp., uma bactéria fixadora de nitrogênio, foi isolada das raízes da planta de arroz (*Oryza sativa*), além de fixar N, ela produz várias enzimas, como a catalase, oxidase, uréase, fosfatase e Dnase (XIE; YOKOTA; 2005).

Em plantas de milho crescidas no campo, a infecção dos tecidos das raízes e colmos pela bactéria ocorre apenas no período reprodutivo das plantas (MAGALHÃES et al., 1979), período em que também se observam as maiores taxas de atividade da nitrogenase. Observações semelhantes já foram relatadas para arroz (WATANABE; BARRAQUIO; GUZMAN; 1979) e trigo (KAVIMANDAN; SUBBARAO; MOHRIR; 1978).

Segundo BALDANI et al. (1997a), embora várias características ecológicas e fisiológicas estejam sendo desvendadas, ainda falta conhecimento sobre o mecanismo envolvido na interação bactéria-planta e como ele contribui para o nitrogênio acumulado nas plantas. Apesar das diferentes formas de interação, estes diazotróficos, quando estão em associação com gramíneas, garantem aumentos de 5 a 30% na produção (BALDANI et al., 1983; OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

3.3.2 Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* foi primeiramente descrito como um grupo de bactérias possuindo uma única espécie, *Herbaspirillum seropedicae*. Esta bactéria é fixadora de nitrogênio, endofítica, microaerófila, gram-negativa e coloniza os tecidos de diversas espécies de plantas, predominantemente membros da família das Poaceas, como o milho, sorgo, arroz e etc., sem produzir sintomas de doença nas plantas associadas e, por vezes, produtora de fitohormônios (BALDANI et al., 1986; BODDEY et al., 1995; OLIVARES et al., 1996). Estes microrganismos possuem a habilidade de colonizar estas plantas, sendo isoladas do interior de raízes, hastes e folhas (OLIVARES et al., 1996). A colonização de Poaceas por *Herbaspirillum* sp. ocorre através da adesão da bactéria à superfície da planta, seguida de proliferação preferencialmente nas raízes secundárias e ferimentos (RONCATO-MACCARI, 2003).

Uma vez no interior da planta, os microrganismos podem espalhar-se e alcançar os tecidos aéreos, provavelmente via vasos do xilema (HUREK et al, 1994; JAMES; OLIVARES, 1998; RONCATO-MACCARI et al., 2003).

Atualmente compreende mais sete espécies descritas *H. rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996a), *H. frisingense* (KIRCHHOF et al., 2001), *H. lusitanum* (VALVERDE et al., 2003), *H. chlorophenicum*, *H. putei*, *H. huttiense* e *H. autotrophicum* (DING; YOKOTA, 2004), e três propostas com novas espécies, *H. magnetovibrio*, (GAO et al., 2005), *H. rhizosphaerae* (JUNG et al., 2007) e *H. hiltneri* (ROTHBALLER et al., 2005). Entre as onze espécies descritas acima, apenas as quatro primeiras são fixadoras de nitrogênio.

Herbaspirillum seropedicae foi à primeira espécie descrita do gênero, isoladas de raízes lavadas e desinfetadas superficialmente de milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), e sorgo (*Sorghum bicolor*). Mais tarde, foi isolada de raízes, folhas e colmo de cana-de-açúcar, *Brachiaria decumbens* e *Digitaria decumbes* (BALDANI et al., 1996a); de raízes, caule e folhas de cana-de-açúcar cultivada na Austrália (BODDEY et al., 1998); dendezeiro e pupunheira (FERREIRA et al., 1995), bananeiras (CRUZ et al., 2001); detectada em capim elefante (REIS JÚNIOR et al., 2000), e isolada em associação com arroz inundado (RODRIGUES, 2004; BRASIL, 2005).

H. rubrisubalbicans pertencia ao gênero *Pseudomonas* (GILLIS et al., 1991), e foi reclassificada por BALDANI et al. (1986). Tem sido encontrada em associação com cana-de-açúcar e raiz da planta *Digitaria insularis*, crescida no interior da

plantação de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1996). Foi detectada também em capim elefante (REIS et al., 2000), abacaxizeiros e bananeiras (CRUZ et al., 2001). Tem ocorrência mais restrita, se comparada à espécie *H. seropedicae* e pode causar a doença chamada "estria mosqueada" na variedade de cana-de-açúcar B3462 (OLIVARES et al., 1993).

H. frisinguense foi descrita recentemente, isolada de amostras de tecido de raízes e colmos de diversos genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum Schum*) coletados no Brasil e das gramíneas *Spartina pectinata*, *Miscanthus sinensis* e *M. sacchariflorus*, coletadas na Alemanha (KIRCHHOF et al., 2001).

A mais nova espécie de bactéria diazotrófica descrita para o gênero *Herbaspirillum* é o *H. lusitanum*, que foi isolada de nódulos de *Phaseolus vulgares* em Portugal (VALVERDE et al., 2003).

Inúmeros experimentos foram conduzidos com inoculação de bactérias do gênero *Herbaspirillum*, principalmente com a espécie *H. seropedicae*, pela sua ocorrência em maior número de plantas estudadas. A inoculação com as estirpes Z67 e HRC54 de *H. seropedicae* em plantas micropopagadas de cana-de-açúcar, mostram incrementos significativos no acúmulo de massa fresca de raízes e parte aérea aos 24 dias após a inoculação e massa fresca de parte aérea aos 64 dias após a inoculação (OLIVEIRA et al., 1996). A inoculação de *H. seropedicae* estirpe HRC54 juntamente com *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL 5, em cana-de-açúcar, estimulou a atividade da H⁺ ATPase, provocou mudanças morfológicas radiculares e incrementos na fase inicial do estabelecimento, e *H. seropedicae* contribuiu para o incremento de biomassa radicular, área foliar, conteúdo de nutrientes (OLIVEIRA et al., 2002).

3.3.3 Gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* é constituído por 37 espécies. Dentre estas, somente nove espécies apresentam descrita a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico. Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* apresentam ampla distribuição, se associam com plantas não leguminosas e formam nódulos em leguminosas.

A capacidade de algumas estirpes de *B. cepacia* isoladas de rizosfera, fixarem nitrogênio atmosférico, foi relatada em 1994 (BEVIVINO et al., 1994). Porém, a primeira espécie de *Burkholderia* diazotrófica descrita foi *B. vietnamiensis*, isolada da rizosfera de plantas de arroz crescidas no Vietnã (GILLIS et al., 1995). Posteriormente, ela foi encontrada associada com milho e café em diferentes regiões do México (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). Novos isolados foram obtidos de cereais como milho, sorgo e arroz (BALDANI et al., 1999), bem como de frutas (CRUZ et al., 2001) crescidas no Brasil. Outra espécie, *B. kururiensis*, representada pela estirpe KP23, foi originada de amostras de sedimentos coletadas numa área contendo tricloetileno no Japão (ZHANG et al., 2000). A sua capacidade de fixar nitrogênio foi demonstrada por ESTRADA DE LOS SANTOS et al. (2001). Porém, não há informação sobre a ocorrência dessa espécie em associação com plantas. Outras três novas espécies diazotróficas foram descritas: *B. tuberum* e *B. phymatum*, isoladas de nódulos de duas leguminosas tropicais, *Aspalathus carnosus* e *Machaerium lunatum* respectivamente (VANDAMME et al., 2002); e *B. mimosarum* (CHEN et al., 2006) isolada de diferentes plantas da família mimosaceae no Brasil e na Venezuela.

As quatro espécies de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* descritas mais recentemente, colonizando Poaceae, são *B. unamae*, *B. tropica*, *B. xenovorans* e *B. silvatlantica* (PERIN et al., 2006). A espécie *B. unamae* foi isolada da rizosfera de plantas de milho, café e cana-de-açúcar crescidas no México (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) e *B. tropica* (REIS et al., 2004) foi isolada de cana-de-açúcar no Brasil. A espécie *B. xenovorans* foi descrita com apenas três isolados, obtidos a partir de solo contaminado com policlorinado bifenil (PCB) nos EUA, sangue humano na Suécia e café no México (GORIS et al., 2004). A bactéria descrita *B. silvatlantica* foi isolada de plantas de cana-de-açúcar, abacaxi e milho cultivadas no Brasil (PERIN et al., 2006).

A inoculação da espécie proposta *B. brasilensis* em plantas de arroz contribuiu com 31% do total de nitrogênio da planta, tendo aumentado 69% da biomassa das plantas (BALDANI et al., 2000). Contribuição também foi observada com inoculação de *Burkholderia* spp. em plantas de bananeiras (WEBER et al., 2000).

3.4 Fixação Biológica de Nitrogênio na Cultura do Milho

Na cultura do milho, a maioria dos experimentos foram conduzidos com a inoculação de *Azospirillum*, mostrando variáveis aumentos da FBN. Estudos recentes mostraram a possibilidade de aumento da produtividade de alguns cultivares em até 34%, tendo havido grande variabilidade na capacidade de obter N via FBN (ALVES, 2007). Esta contribuição das bactérias é maior quando a planta recebe doses de fertilizante nitrogenado (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON; 2003).

Aumento significativo no rendimento da produção de grãos é observado com a inoculação de *Azospirillum* spp., juntamente com um aumento no conteúdo de fósforo, potássio e de nitrogênio total das plantas (BASHAN; HOLGUIN, 1997; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN et al., 2004). O aumento na produção e crescimento após a inoculação com estirpes de *Azospirillum* spp. tem sido atribuído principalmente a um efeito geral no crescimento das raízes e uma conseqüente melhora na capacidade de absorção de nutrientes pela planta (KAPULNIK et al., 1985; BASHAN e HOLGUIN, 1997). A teoria mais aceita é de que o efeito benéfico da associação com *Azospirillum* ocorra devido a uma soma de múltiplos mecanismos (a maior densidade e comprimento dos pêlos radiculares, resultando no aumento da superfície do sistema radicular, permitindo melhor exploração dos nutrientes e água do solo, liberação de substâncias promotoras do crescimento: AIA, giberelinas e citocininas) (BASHAN et al., 2004).

A partir das últimas décadas, outras bactérias passaram a ser estudadas quanto à associação com gramíneas, com destaque para *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia tropica*, as quais possuem um modo de colonização diferente de *Azospirillum*, pois são consideradas endofíticas obrigatórias (BALDANI; BALDANI, 2005). Estas espécies citadas vêm recebendo maior atenção da comunidade científica por acreditar-se que a forma de fornecimento de nitrogênio propiciado por endofíticos obrigatórios seja mais efetiva.

O gênero *Burkholderia* tem sido apontado como de ampla ocorrência em associação com o milho cultivado no Brasil e no México (PERIN et al., 2006), sendo que a espécie *B. tropica* tem sido detectada em maior freqüência. A ocorrência

destes organismos em associação com o milho em diferentes regiões geográficas pode indicar que certos gêneros de bactérias diazotróficas estão associados preferencialmente ao milho, independente do tipo de solo e do clima da região de cultivo (ROESCH, 2007).

Em Roraima, ZILLI et al., (2007), conduziram experimentos com o objetivo de testar a contribuição da inoculação da estirpe diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*, ZAE 94 quanto ao rendimento de milho. Ao final do experimento, constatou-se que a inoculação com a estirpe ZAE 94 de *Herbaspirillum seropedicae* contribui significativamente para o aumento da produtividade de grãos no híbrido de milho BRS 1010, ao passo que na variedade BRS 4157 este efeito não foi observado ZILLI et al., (2007). As razões para a variabilidade de resposta da FBN em gramíneas ainda não foram completamente elucidadas. Tem sido sugerido que a interação genótipo da planta e ambiente exerçam um papel decisivo sobre a eficiência do diazotrófico (GYANESHWAR et al., 2002).

Estudos mostram que as influências geográficas e ambientais podem gerar a associação de diferentes bactérias diazotróficas endofíticas com plantas de milho, demonstrando que a exploração do potencial de bactérias diazotróficas associadas ao milho deve ser feita em uma perspectiva regional (ROESCH, 2007).

Os resultados acima mostram que a cultura do milho se associa com bactérias e recebe contribuições da FBN. Porém poucos trabalhos básicos de isolamento de bactérias diazotróficas gerais foram realizados nesta cultura. A maioria dos trabalhos com milho no Brasil são da década de 70, quando as cultivares plantadas eram outras e as técnicas usadas pela pesquisa eram menos precisas. A maioria dos trabalhos de inoculação são de outros países, como México e Argentina, e quando realizados no Brasil, são testadas bactérias isoladas de outras plantas. Ainda não conhecemos quais as bactérias que colonizam as plantas de milho. Portanto, trabalhos básicos de isolamento de bactérias são necessários para uma melhor exploração do sistema.

Inoculantes comerciais contendo *A. brasilense* foram lançados no mercado dos Estados Unidos visando aumentar o vigor da semente, sistema radicular, resistência à geada e uma melhoria geral da “saúde” da planta (FALLIK; OKON, 1996). Na Europa, foi desenvolvido um produto contendo uma mistura de *A. brasilense* estirpe Cd e *A. lipoferum* estirpe Br17, comercializado na forma de mistura com vermiculita ou em forma líquida, cuja expectativa dos fabricantes era

reduzir a necessidade de nitrogênio mineral em 30 a 40 % (OKON, Y.; LABANDERA-GONZALES, C.A., 1994). Semelhantemente, também no México e Argentina existem inoculantes contendo *Azospirillum* para a cultura do milho, havendo a expectativa de aumento da produtividade de grão em até 20%.

Mesmo que os efeitos das bactérias diazotróficas sejam menos efetivos em cereais, observam-se efeitos significativos das bactérias na produtividade do milho, arroz, sorgo e trigo (BALDANI et al., 1981; BALDANI et al., 1983;). Com isto abriu-se um caminho para uma agricultura mais econômica, e, principalmente, mais ecológica.

4 ARTIGO A: BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM CULTIVARES DE MILHO EM ÁREAS DE CERRADO E MATA NO ESTADO DE RORAIMA

4.1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a densidade e diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em 4 genótipos de milho, cultivados em área de cerrado e mata alterada no estado de Roraima, suplementado ou não com nitrogênio na forma de uréia. As bactérias endofíticas foram isoladas e caracterizadas fenotipicamente no meio de cultura DYG'S sólido e identificadas quanto à capacidade de FBN em meio de cultura semi-sólido BMGM. Posteriormente, as bactérias diazotróficas foram caracterizadas nos meios de cultura semi-seletivos JMV, LGI e NFb (3x) juntamente com bactérias usadas como referências: HRC54 (*Herbaspirillum seropedicae*), CBAmC (*Azospirillum amazonense*), Ppe8 (*Burkholderia tropica*), M130 (*Burkholderia kururienensis*) e Sp7 (*Azospirillum brasilense*). Estas bactérias foram agrupadas através do índice de similaridade SM (Simple Matching) e avaliou-se a diversidade através do índice de Shannon-Weaver. Foram obtidos 537 isolados de bactérias endofíticas, destas, 55 apresentaram capacidade de FBN. A população das bactérias diazotróficas variou de 0,83 a $10,8 \times 10^3$ células g^{-1} de tecido radicular e o valor máximo encontrado no colmo foi de 0,83 células g^{-1} de tecido vegetal. Além disso, tanto a percentagem de bactérias diazotróficas endofíticas em relação ao número total de bactérias, quanto o número de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas refletiram uma interação entre as cultivares de milho e os ambientes. Com 85% de similaridade entre as bactérias, constatou-se a formação de doze grupos fenotípicos e poucos isolados se assemelharam às bactérias usadas como referências. Observou-se ainda que as bactérias se agruparam em relação à cultivar e ao ambiente de onde foram isoladas e que a presença de nitrogênio não interferiu no agrupamento. A presença de nitrogênio aumentou a densidade das bactérias em área de cerrado, ambiente caracterizado por menor teor de matéria orgânica no solo. Foi observada maior diversidade de bactérias em área de mata em relação ao cerrado e nas variedades de milho em relação aos híbridos.

Palavras-chave: *Zea mays*, fixação biológica de nitrogênio, Amazônia, caracterização.

ENDOPHYTIC DIAZOTROPHIC BACTERIAS IN MAIZE CULTIVARS IN CERRADO AND FOREST AREAS IN RORAIMA STATE

4.2 ABSTRACT

The aim of this study was to structure a collection of endophytic diazotrophic bacterias as well as to characterize the density and diversity of this bacterias in four maize genotypes cultivated in cerrado and altered forest area in Roraima, with and without application of nitrogen fertilizer. The endophytic bacterias were isolated and phenotypically characterized in DYG'S solid culture medium and inoculated in BMGM semi-solid culture medium to evaluate nitrogen fixation capacity. The endophytic diazotrophic bacterias were later characterized in semi-selective culture medium JMV, LGI and NFb (3x) together with bacterias used as references: HRC54 (*Herbaspirillum seropedicae*), CBAmC (*Azospirillum amazonense*), Ppe8 (*Burkholderia tropica*), M130 (*Burkholderia kururiensis*) e Sp7 (*Azospirillum brasilense*). These bacterias were clustered using Simple Matching similarity index and the diversity was evaluated by the Shannon-Weaver index. A total of 537 endophytic bacterias isolated were obtained, and 55 presented BNF capacity. The population of diazotrophic bacterias ranged from 0.83 to 10.8×10^3 cells g^{-1} of the root and it presented in a maximum of 0.83 cells g^{-1} of the vegetable stem. Besides, so much the diazotrophic bacterias percentage in relation to the total number of endophytic bacterias, as well as the number of diazotrophic bacterias isolated, reflected an interaction among the maize cultivars and environments. Twelve phenotypic groups were verified with 85% of similarity among the bacterias, and few isolated were similar to the references strains. The bacterias clustered in relation to maize cultivars and environment where were isolated and, the presence of nitrogen did not interfered in the bacterias clustering. The presence of nitrogen increased the bacterias density in cerrado area that was the environment which presented smaller soil organic matter content. It was also observed larger diversity of bacterias in forest area in relation to the cerrado and in the maize varieties in comparison to the hybrids.

Key words: *Zea mays*, biological nitrogen fixation, Amazônia, characterization.

4.3 INTRODUÇÃO

Entre as atividades desempenhadas por microrganismos do solo, a fixação biológica de nitrogênio – FBN, talvez seja o processo microbiano relacionado à agricultura mais bem estudado e explorado tecnologicamente. Além dos benefícios econômicos, a redução nas aplicações de fertilizantes nitrogenados tende a melhorar a qualidade ambiental, com menor aporte de nitratos para águas superficiais e subterrâneas e menor emissão de gases que contribuem com o efeito estufa (GALLOWAY et al., 2003). A maximização das contribuições da FBN nos agroecossistemas tornou-se, então, parte dos esforços de pesquisa visando à sustentabilidade da produção agrícola. A busca de bactérias diazotróficas endofíticas para aplicação na cultura do milho tem sido alvo da pesquisa nos anos mais recentes, revelado que esses microrganismos colonizam não só raízes, mas também colmos e folhas de gramíneas (ROESCH, 2007; QUADROS, 2009). Diversos estudos têm mostrado que bactérias diazotróficas eficientes podem contribuir significativamente para o desenvolvimento da cultura do milho (ZILLI et al., 2007; PERIN, 2007; ALVES, 2007).

Em um processo de seleção de bactérias eficientes na FBN, o isolamento, visando à constituição de uma coleção de microrganismos, com posterior estudo dos isolados obtidos, representa uma etapa crucial para o sucesso da pesquisa. Neste sentido, a investigação da ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio em plantas da família *Poaceae*, como o milho, cultivadas na região Amazônica recebe destaque tanto pela carência de estudos dessa natureza quanto pelo potencial que a região representa em termos de recursos genéticos.

Neste sentido, este estudo objetivou avaliação da densidade e diversidade de bactérias endofíticas em 4 cultivares de milho (variedade: BRS 4157 e BR 106; Híbridos: BRS 1010 e BRS 3030), em dois ambientes: cerrado e mata alterada em Roraima. Também teve como objetivo estruturar uma coleção de bactérias diazotróficas endofíticas dos cultivares de milho estudados.

4.4 MATERIAL E MÉTODOS

4.4.1 Ensaio de Campo e Coleta de Amostras

As amostragens foram realizadas em experimentos conduzidos no Campo Experimental Água Boa (CEAB) da Embrapa Roraima, município de Boa Vista, representativo de área de cerrado (N 02° 15'00" e W 60° 39'54") e, no Campo Experimental Confiança (CEC) da Embrapa Roraima, município do Cantá (N 02° 39'48" e W 60° 50' 15"), que compreende uma região de mata. No CEAB, o local do experimento compreendia uma área em segundo ano de cultivo, tendo sido cultivada com soja no primeiro ano, com textura de 870 g kg⁻¹ de areia, 120 g kg⁻¹ de argila e 10 g kg⁻¹ de silte, enquanto no CEC, compreendia uma área cultivada com culturas anuais diversas por mais de uma década, com textura 670 g kg⁻¹ de areia, 270 g kg⁻¹ de argila e 60 g kg⁻¹ de silte.

Os cultivares de milho BRS 1010, BRS 3003, BRS 4157 (Sol da Manhã), e BR 106 foram semeadas em faixas de 4 m de largura por 30 m de comprimento. Para cada cultivar, empregou-se um tratamento com a aplicação de N-mineral na forma de uréia, 100 e 80 kg ha⁻¹, no CEAB e CEC, respectivamente, tendo sido aplicado 50% no plantio e 50% aos 25 dias após a emergência das plantas e adubação de plantio e um controle apenas com a adubação de plantio. Esta adubação de plantio compreendeu a aplicação de 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples, 90 kg ha⁻¹ de K₂O na forma de cloreto de potássio aplicado 50% no plantio e 50% aos 30 dias após a emergência das plantas.

No CEAB, o plantio foi realizado diretamente sobre vegetação espontânea dessecada com glyphosate na dosagem recomendada pelo fabricante, enquanto no CEC o preparo da área foi realizado através de grade aradora e niveladora.

Aos 45-50 dias após a emergência das plantas, no período do pendoamento (Vt), uma coleta foi realizada para avaliação da presença de bactérias diazotróficas. Para este fim, amostras de plantas foram coletadas para cada cultivar e tratamento suplementado ou não com nitrogênio, sendo cada uma composta por três plantas localizadas a uma distância de 3-5 m entre si. Nesta coleta, as plantas foram removidas com o auxílio de uma pá reta e, imediatamente, transportadas em

temperatura ambiente para o laboratório, seguindo-se o processamento em, no máximo 12 horas da coleta.

A coleta de folhas para a avaliação de nutrientes foi realizada na folha indicadora, que é a 1ª folha oposta à inflorescência feminina, tendo sido coletada 30 folhas por bloco (MALAVOLTA, VITTI, OLIVEIRA, 1997). Para a análise de solo, coletou-se uma amostra composta a 0-20 cm para cada cultivar de milho e tratamento suplementado ou não com nitrogênio, tendo sido 10 pontos para cada amostra ao longo dos 30 m da faixa de plantio. Estas análises foram realizadas no laboratório de solos da Universidade Federal de Viçosa, seguindo as metodologias descritas pela EMBRAPA (1977).

Tabela 4.4.1.1 - Características químicas Analíticas das Análises de Solo.

Amostra Cultivar/ Tratamento	pH	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	MO	Zn	Fe	Mn	Cu	Precipitação (mm)				
	H ₂ O	-mg dm ⁻³		-----cmol _c dm ⁻³		-----	Dag kg ⁻¹	-----mg/dm ³					mai	jun	jul	ago	set
CEAB/CERRADO																	
BRS330 S/N	6,5	19,9	19	1,2	0,4	0,0	1,7	1,0	0,8	31,9	1,9	0,4					
BRS330 C/N	5,2	33,2	13	1,6	0,1	0,1	1,3	0,9	0,9	36,4	1,5	0,4					
BRS1010 S/N	5,4	2,6	15	0,7	0,3	0,0	2,4	0,8	0,4	30,5	1,7	0,2					
BRS1010 C/N	6,8	17,1	14	2,5	0,2	0,0	1,1	0,9	0,9	19,9	2,6	0,4	441,2	355,6	626,0	121,6	124,8
BRS106 S/N	6,5	18,6	23	0,8	0,3	0,0	1,6	0,9	0,6	28,8	1,2	0,2					
BRS106 C/N	5,4	3,3	17	0,4	0,2	0,1	1,7	1,0	0,6	33,8	2,7	0,2					
BRS4157 S/N	5,9	5,5	23	0,8	0,3	0,0	1,1	0,9	0,3	49,3	1,4	0,3					
BRS4157 C/N	5,1	17,0	16	0,5	0,1	0,2	1,9	1,0	0,4	48,7	1,6	0,3					
CEC/MATA																	
BRS330 S/N	5,6	9,2	51	1,7	0,9	0,0	3,8	2,8	2,0	86,1	5,8	0,3					
BRS330 C/N	5,14	6,7	52	0,8	0,3	0,5	5,2	2,8	2,1	116,6	2,9	0,8					
BRS1010 S/N	5,28	5,2	68	0,8	0,4	0,1	3,3	2,1	1,6	161,8	1,8	0,2					
BRS1010 C/N	5,53	7,7	63	1,7	0,8	0,0	3,3	2,4	3,5	106,9	3,1	0,5	524,1	413,6	438,9	185,6	190,2
BRS106 S/N	5,69	7,4	32	1,7	0,8	0,0	3,0	2,6	1,7	74,1	2,7	0,4					
BRS106 C/N	5,46	4,2	45	1,1	0,5	0,0	3,5	2,3	1,6	75,3	2,2	0,3					
BRS4157 S/N	5,57	7,6	71	1,6	0,8	0,0	4,1	3,2	3,2	65,6	6,2	0,3					
BRS4157 C/N	5,38	7,7	43	1,1	0,5	0,1	3,8	2,3	1,9	85,1	4,2	0,3					

Obs.: pH em água, KCl e CaCl - Relação 1:2,5; P - Na - K - Fe - Zn - Mn - Cu - Extrator Mehlich 1; CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva; Ca - Mg - Al - Extrator: KCl - 1 mol L⁻¹; H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol L⁻¹ - pH 7,0; V = Índice de Saturação de Bases; B - Extrator água quente; S - Extrator - Fosfato monocálcico em ácido acético; SB = Soma de Bases Trocáveis; Matéria Orgânica (MO) = C.Org x 1,724 - Walkley-Black.

Tabela 4.4.1.2 - Resultados Analíticos das Análises Foliares de Plantas de Milho cultivadas em áreas de cerrado (CEAB) e mata (CEC) com (C) e sem (S) aplicação suplementar de nitrogênio (N).

Amostra Cultivar/ Tratamento	N	P	K	Zn	Co	Mo
	dag kg ⁻¹			mg kg ⁻¹		
CEAB/CERRADO						
BRS330 S/N	1,5	0,4	1,5	15,5	5,5	3,7
BRS330 C/N	2,0	0,3	1,2	12,7	1,3	0,5
BRS1010 S/N	1,6	0,4	1,4	14,7	0,6	1,7
BRS1010 C/N	2,0	0,2	1,5	13,0	0,5	0,0
BRS106 S/N	1,6	0,3	1,5	12,2	0,5	2,4
BRS106 C/N	2,5	0,3	1,1	14,9	0,2	0,1
BRS4157 S/N	1,3	0,4	1,4	13,6	0,1	1,1
BRS4157 C/N	2,3	0,3	1,4	13,5	0,2	0,5
CEC/MATA						
BRS330 S/N	2,7	0,4	1,6	21,0	0,0	1,6
BRS330 C/N	2,4	0,2	1,5	16,6	0,0	0,0
BRS1010 S/N	2,0	0,4	1,8	20,3	0,0	0,0
BRS1010 C/N	1,6	0,3	2,2	18,2	0,0	0,0
BRS106 S/N	1,7	0,4	1,6	18,5	0,0	1,0
BRS106 C/N	2,4	0,4	1,3	17,8	0,0	0,9
BRS4157 S/N	1,4	0,4	1,9	14,0	0,0	0,1
BRS4157 C/N	1,7	0,4	1,5	11,6	0,0	0,3

4.4.2 Isolamento de Bactérias Endofíticas e Densidade

Plantas de milho foram seccionadas em raízes e colmos, sendo que os seguimentos de colmos foram considerados a partir 10 cm de distância das raízes, e processadas para isolamento de colônias de bactérias endofíticas e posterior contagem. As raízes e os colmos de cada amostra composta foram lavados com água corrente abundantemente, fragmentados em partes menores e separadas em porções de 10 g. Estas amostras foram transferidas para um erlenmeyer, onde foi realizada a desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio a 1% durante 5 minutos. Em seguida, as amostras, foram lavadas três vezes com água deionizada estéril e trituradas em 90 mL de solução salina a 0,85% (anexo), usando liquidificador. Posteriormente o “caldo” permaneceu em repouso por uma hora.

Depois de trituradas e agitadas em solução salina, as amostras de raízes e colmos foram diluídas seriadamente até 10^{-6} , acrescentando-se 100 μ L da solução original (diluição 10^{-1}) em tubos contendo 900 μ L de solução salina. Das amostras

de parte aérea, foram plaqueadas as diluições 10^{-2} (CEC) e 10^{-4} (CEAB) e das amostras de raízes foram plaqueadas as diluições 10^{-4} (CEC) e 10^{-6} (CEAB). Para tal, uma alíquota de 100 μ L foi depositada em placas de Petri contendo o meio de cultura DYG'S sólido (anexo) (RODRIGUES NETO et al., 1986), com 2 repetições.

As placas foram incubadas, a 28 °C por um período de 10 dias na ausência de luz até a observação de colônias bacteriana isoladas. Findo este período contou-se o número de colônia por placa para estimar a população de bactérias endofíticas associadas ao milho.

4.4.3 Caracterização Fenotípica das Colônias

Cada colônia com aspecto fenotípico diferente, crescida nas placas de Petri, foi considerada para fins de contagem como uma bactéria diferente. Cada uma destas colônias fenotipicamente diferentes recebeu uma numeração e foi repicada em câmara de fluxo laminar para uma nova placa de Petri contendo, o meio de cultura DYG'S sólido (RODRIGUES NETO et al., 1986) - no caso de haver mais de uma colônia fenotipicamente igual, apenas um representante foi repicado. Após a repicagem as placas foram mantidas a 28°C por dez dias na ausência de luz.

Quarenta e oito horas após a incubação, foi realizada a 1ª leitura visando constatar a presença ou ausência de crescimento bacteriano. Após a leitura, as placas retornaram a incubadora e foram observadas a cada 48 horas durante dez dias consecutivos. Depois desse período, a caracterização das colônias foi efetuada. Os parâmetros analisados para a caracterização foram: tempo de crescimento, tamanho da colônia, forma da colônia, elevação da colônia, bordas da colônia, brilho da colônia, aspecto da colônia, cor, aspecto do muco, elasticidade do muco e tipo do muco (NEDER, 1992).

4.4.4 Armazenamento dos Isolados

Após a caracterização das colônias em meio de cultura DYG'S sólido (RODRIGUES NETO et al., 1986), a massa celular foi retirada com alça microbiológica estéril e adicionada a tubos contendo 700 µL de meio de cultura DYG'S com 25% de seu volume de glicerol. As amostras foram homogeneizadas em agitador para tubos e armazenadas em freezer a -20° C.

4.4.5 Identificação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas

Os isolados foram testados quanto à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em meio de cultura semi-sólido (DÖBEREINER et al. 1995) usando microtubos com capacidade de 1,5 mL, contendo 0,5 mL meio de cultura semi-sólido BMGM (anexo) (ESTRADA de LOS SANTOS et al., 2001). Os microtubos inoculados foram incubação por dez dias a 28 °C. Findo o período de incubação, a presença de bactérias diazotróficas microarofílicas nas amostras de raízes e colmos de milho foi verificada pela formação de película na superfície do meio de cultura.

4.4.6 Caracterização Fenotípica dos Isolados de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Meios de Cultura Semi Seletivos

Os isolados identificados como bactérias diazotróficas endofíticas foram repicados em duplicata, diretamente em placas de Petri, contendo os meios de cultura semi seletivos LGI (MAGALHÃES et al., 1983) semi seletivo para *Azospirillum amazonense*; NFb (3x) DÖBEREINER et al. 1995; (com 3x a concentração do corante), semi seletivo para *Herbaspirillum* spp., *A. brasiliense* e *A. lipoferum* que acumulam corante em suas colônias e JMV (BALDANI, 1996) semi seletivo para *Burkholderia* spp. e mantidos a 28°C por 10 dias, na ausência de luz, para o crescimento de colônias isoladas.

Também foram repicados as estirpes HRC54 (*Herbaspirillum seropedicae*), CBAmC (*Azospirillum amazonense*), Ppe8 (*Burkholderia tropica*), M130 (*Burkholderia* sp.), Sp7 (*Azospirillum brasilense*) como padrões de comparação.

Após os 10 dias, foram realizadas as caracterizações fenotípicas considerando o tempo de crescimento e os seguintes aspectos da colônia: tamanho da colônia, forma da colônia, elevação da colônia, bordas da colônia, brilho da colônia, aspecto da colônia, cor, aspecto do muco, elasticidade do muco e tipo do muco (NEDER, 1992).

4.4.7 Análise Estatística

Os dados da estimativa da frequência de bactérias diazotróficas nos tecidos das plantas de milho, bem como o número de bactérias diazotróficas obtidas, foram comparadas através de análise de variância, considerando os fatores: ambiente (CEAB e CEC), cultivares de milho (BRS 1010, BRS 3003, BRS 4157 e BR 106), parte da planta (colmo e raiz) e adubação com N (suplementação ou não com uréia).

Todos os dados foram transformados pela equação raiz quadrada ($x + 1,0$).

A similaridade entre os isolados, através de suas características fenotípicas, foi avaliada por uma matriz binária, sendo atribuído valor positivo para a presença da característica e valor negativo para a ausência de característica. Os dados foram comparados e a similaridade entre os isolados foi estimada pelo coeficiente *Simple Matching-SM-*, e agrupada pelo método das distâncias médias UPGMA (Unweighted Pair Group Method) e representados graficamente por um dendrograma construído pelo programa NTSYS (Numerical Taxonomy System Using Multivariate Statistical Program), versão 2.1 (ROHLF, 1994).

O índice de diversidade de Shannon-Weaver foi calculado considerando-se os grupos morfológicos originados na análise de similaridade e contraste de valores analisado pelo teste t de Hutcheson (ZAR, 1996).

Obteve-se o valor tabelado do de $t_{(\alpha; GL)}$ para comparar com o $t_{\text{calculado}}$. Quando o valor calculado foi maior que o tabelado, aceitou-se a hipótese alternativa de que amostras ou áreas possuíam índice de Shannon-Weaver estatisticamente diferentes para um determinado nível de probabilidade de 5%.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Número de Bactérias Endofíticas nas Plantas de Milho

A população total de bactérias endofíticas observadas em meio de cultura DYG'S (RODRIGUES NETO et al., 1986) foi de 537 isolados, sendo 183 isolados oriundos de área de cerrado e 354 isolados oriundos de área de mata. Destes, 340 isolados foram obtidos de raízes e 197 da parte aérea (colmo). Com essa contagem, estimou-se a população total de bactérias endofíticas, tendo ocorrido, para todas as cultivares, freqüência significativamente maior nas raízes, comparativamente ao colmo (Tabela 4.5.1.1).

O grande número de bactérias no sistema radicular parece ser regra e representa uma resposta dos microrganismos à presença do vegetal. A grande área superficial das raízes é um habitat para abrigar uma grande densidade e diversidade de bactérias, desde saprofíticas a comensais, mutualísticas, simbióticas, endofíticas e patogênicas (WELBAUM et al., 2004). Assim, o crescimento radicular implica no aumento de substratos de carbono na zona radicular, os quais promovem a proliferação de rizobactérias em face deste ambiente rico em alimento, o que explica, ao menos parcialmente, a maior densidade de bactérias detectada nas raízes das plantas de milho. O maior número de bactérias nas raízes comparativamente ao colmo de milho, provavelmente, se deve ao fato desta parte da planta representar o primeiro local de entrada dos endofíticos (LODEWYCKX et al., 2002).

Mecanismos de penetração e distribuição são necessários para que as bactérias colonizem o interior dos tecidos da planta, sendo que tais mecanismos podem ocorrer devido à interação com outras bactérias ou a diferente necessidade de cada organismo – planta ou bactéria - que determinam a colonização de diferentes nichos dentro da planta (LODEWYCKX et al., 2002). Provavelmente, apenas parte da população que coloniza o sistema radicular migra para a parte aérea, refletindo em menor população e diversidade, como evidenciado pelo uso de

fontes de carbono por bactérias diazotróficas isoladas de cana-de-açúcar (BARBOSA et al., 2006).

Tabela 4.5.1.1 - Número de Bactérias Endofíticas Totais e Número de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Isoladas de Plantas de Milho e % de Bactérias Endofíticas Diazotróficas Coletadas em Área de Cerrado (CEAB) e Mata (CEC) no Estado de Roraima.

Ambiente	Parte da planta	Cultivares	Nº de bactérias endofíticas totais ($\times 10^3$) ¹	Nº de bactérias endo. diazotróficas totais ($\times 10^3$) ¹	% de diazotróficas em relação às totais
CERRADO (CEAB)	Raiz	BRS 1010	663,00	5,83	1,58 ²
		BR 106	369,0	7,5	1,82 ²
		BR 4157	1005,0	1,67	0,60
		BRS 3003	170,0	0,83	0,64
	Parte aérea	BRS 1010	9,17	ND ³	ND ³
		BR 106	4,17	ND ³	ND ³
		BR 4157	83,3	0,83	0,59
		BRS 3003	5,83	ND ³	ND ³
MATA (CEC)	Raiz	BRS 1010	127,0	2,5	1,06
		BR 106	153,0	2,5	0,93
		BR 4157	922,0	10,8	0,91
		BRS 3003	90,0	4,17	1,38
	Parte aérea	BRS 1010	1,33	0,08	0,35
		BR 106	0,62	0,08	0,81
		BR 4157	2,49	0,08	0,18
		BRS 3003	1,58	0,04	1,73
C.V. (%)					59,12

1: Número de bactérias por grama de tecido vegetal fresco;

2: Significativamente superior em relação às mesmas cultivares e parte da planta pelo teste t em 5% de probabilidade;

3: Não detectado pelo método;

Obs.: Dados transformados pela equação $Y + 1.0 - \text{SQRT}(Y + 1.0)$

4.5.2 Densidade e Frequência de Bactérias Diazotróficas Endofíticas

Semelhantemente ao número total de bactérias endofíticas, observou-se maior número de bactérias diazotróficas endofíticas nas raízes das plantas de milho, para todas as cultivares (Tabela 4.5.1.1). A população de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas variou de 0,83 a 10,8 $\times 10^3$ células g^{-1} de tecido vegetal no

sistema radicular e foi de, no máximo 0,83 células g⁻¹ de tecido vegetal no colmo (Tabela 4.5.1.1).

Tal fato corrobora com outros estudos avaliando culturas como, milho (ROESCH, 2007; QUADROS, 2009), arroz (RODRIGUES et al., 2006) e cana-de-açúcar (REIS JUNIOR et al., 2000), quando se constatou que a população de bactérias diazotróficas endofíticas é maior nas raízes do que na parte aérea das plantas. Estudando a colonização de milho e arroz por *Bacillus megaterium* observaram que esta bactéria migrou lentamente das raízes em direção ao colmo e as folhas, mostrando assim, que apenas poucas células bacterianas podem ser encontradas nas partes aéreas dessas plantas (LIU; ZHAO; CHEN, 2006).

Comparativamente a outros trabalhos da literatura, o número de bactérias diazotróficas endofíticas observado pode ser considerado baixo para uma Poaceae, quando frequentemente são observadas populações de até 10⁸ células g⁻¹ de tecido vegetal de arroz (RODRIGUES et al., 2006), trigo (SALA et al., 2005) e cana-de-açúcar (REIS JUNIOR et al., 2000). É preciso considerar que nestes trabalhos a obtenção das bactérias diazotróficas endofíticas classicamente foi realizada diretamente em meios semi-sólidos seletivos ou semi-seletivos, seguida de estimativa da população de bactérias através de tabelas de Número Mais Provável - NMP - (DÖBEREINER, 1995). Ao contrário, nesse trabalho o isolamento foi realizado em placas de Petri contendo o meio de cultura DYG's sólido (RODRIGUES NETO et al., 1986), que representa um meio pouco seletivo para o desenvolvimento de bactérias e muito rico em nutrientes, permitindo o isolamento amplo e com baixa pressão de seleção, diferindo, portanto, de outros trabalhos.

Aparentemente, apesar de demandar maior trabalho laboratorial, o uso do meio DYG's (RODRIGUES NETO et al., 1986) fornece informações mais realísticas do número de bactérias, uma vez que preconiza a contagem direta em placas e não uma estimativa. E, além disso, também favorece bactérias raras que não teriam habilidade para crescer nos meios tradicionalmente utilizados. Isto se torna pertinente pelo fato de que pode existir competição entre bactérias consideradas mais frequentes como *Azospirillum* e as menos frequentes *Azoarcus*, respectivamente (RODRIGUES, 2003). Segundo REINHOLD-HUREK et al. (1993), a predominância bacteriana do gênero *Azoarcus* no interior da raiz da gramínea "Kallar grass" foi favorecida após desinfestação superficial, o que poderia ter reduzido a quantidade de *Azospirillum*.

Além disso, o insucesso no isolamento de *Gluconacetobacter johannae* e *Gluconacetobacter azotocaptans* em cana-de-açúcar e a baixa diversidade observada na espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi atribuída a produção de bacteriocina por 2 grupos de bactérias da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* (MUÑOZ-ROJAS et al., 2005). Desta forma, a estratégia de utilização de meio de cultura sólido tende a diminuir este efeito negativo de competição.

Entre as cultivares de milho, observou-se diferenças significativa no percentual dos números de bactérias diazotróficas e, também, interação entre as cultivares e os ambientes (Tabela 4.5.1.1). Ao passo que no CEC todas as cultivares apresentaram percentagem de bactérias diazotróficas significativamente igual em relação ao total de bactérias, no CEAB, as cultivares BR 106 e BRS 1010 tiveram maior quantidade dessas bactérias em relação as demais cultivares, chegando a mais de 1,5% da população do total de bactérias (Tabela 4.5.1.1). Vale destacar, contudo, que apesar de não significativa, no CEC, a cultivar BRS 3003 apresentou uma percentagem de bactérias diazotróficas expressivamente maior – mais de 1,5% - enquanto as demais cultivares apresentaram valores abaixo de 0,85% em relação ao número total de bactérias.

A interação entre cultivares e ambientes também foi observada para o número de bactérias endofítica diazotróficas avaliadas pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade (Figura 4.5.2.1). Nesse caso, em ambos ambientes, houve diferença significativa no número total de bactérias endofítica diazotróficas, sendo no CEAB, número significativamente maior para a cultivar BR 106, seguida de BRS 1010, a qual não diferiu das outras duas cultivares. Por outro lado, no CEC, o maior número de bactérias isoladas ocorreu na cultivar BRS 4157, seguida de BRS 3003, que não diferiu das demais (Figura 4.5.2.1).

Esta diferença entre cultivares representa um fato comumente reportado na literatura, as variedades de milho tendem a apresentar respostas positivas em relação a colonização com bactérias diazotróficas endofíticas (BLECKER; LÉON, 1988). Também foi mostrado que o genótipo da planta interfere na resposta à inoculação, como foi demonstrado para trigo (AVIVI; FELDMAN, 1982), milho (GARCIA de SALOMONE et al., 1996) e cana-de-açúcar (URQUIAGA et al., 1992). Neste último estudo, usando a metodologia de diluição isotópica de ^{15}N , os autores mostraram claramente a diferença entre variedades de cana-de-açúcar quanto ao ganho de N derivado da FBN.

Aparentemente, esta característica das variedades de milho poderia estar relacionada com a estrutura genética da planta e da própria bactéria que influenciam no resultado da interação genótipo x ambiente x bactéria. Geneticamente falando, é esperado que genótipos heterozigotos sejam menos suscetíveis às variações ambientais que os homozigotos, e que populações heterogêneas sejam mais tolerantes que as homogêneas (BLECKER; LÉON, 1988).

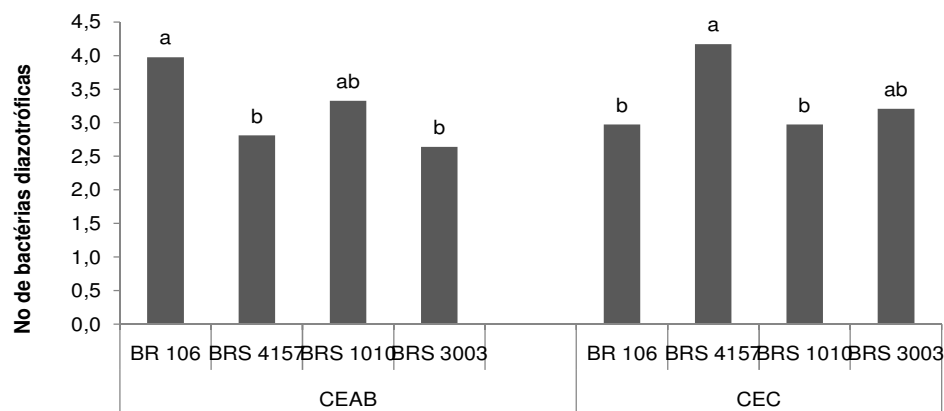


Figura 4.5.2.1 - Densidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Obtidas de Raízes de Cultivares de Milho.

Valores seguidos de mesmas letras, para um mesmo ambiente, não diferem significativamente entre si pelo teste t em 5% de probabilidade. C.V.(%) = 29,83

Obs.: Dados foram transformados pela equação $Y + 1.0 - \text{SQRT} (Y + 1.0)$

Nesse trabalho, a contagem de bactérias diazotróficas endofíticas também mostrou interação entre ambiente e cultivares com a aplicação de nitrogênio na adubação de plantio do milho pelo teste t a 5% de probabilidade (Figura 4.5.2.1). Nessa Figura, observa-se que, tanto em área de mata alterada quanto no cerrado, houve frequência significativamente maior de bactérias diazotróficas endofíticas em relação ao total de bactérias para dois dos cultivares, quando se utilizou adubação nitrogenada, comparativamente ao tratamento sem nitrogênio. Na mata, a cultivar BRS 3003 apresentou maior frequência de diazotróficos quando recebeu nitrogênio, o que aconteceu também para a BR 106 em área de cerrado (Figura 4.5.2.1).

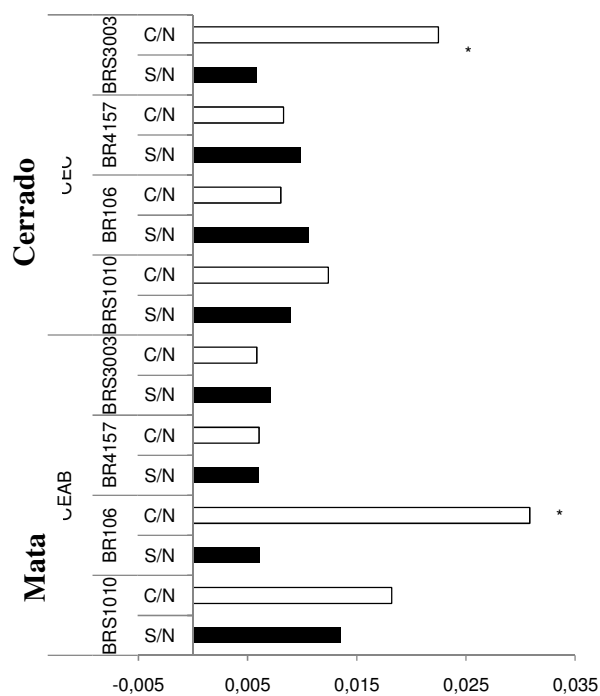
Considerando todas as cultivares no cerrado, houve menor proporção de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas no tratamento sem N em comparação a aplicação de N, 5 e 18 bactérias, respectivamente. Ao passo, que na área de mata, no tratamento sem N, obteve-se 17 bactérias e 15 com N, respectivamente.

De forma generalizada, parece existir um consenso que a presença de nitrogênio mineral inibe a presença e a atividade de bactérias endofíticas diazotróficas, assim como a diversidade genética desses organismos em plantas da família Poaceae (CABALLERO-MELLADO e MARTÍNEZ-ROMERO, 1994; CABALLERO-MELLADO et al., 1995; GONZALEZ e BARRAQUIO, 2000; PERIN et al., 2004). E esta inibição poderia dar-se tanto pelo fato da planta preferencialmente utilizar N mineral, o qual apresentaria menor custo energético, ou ainda pelo fato dos íons amônio inibirem estes organismos dentro dos tecidos do vegetal, como demonstrado para cana-de-açúcar (MUTHUKUMARASAMY et al., 2002).

Por outro lado, também tem sido observado que a aplicação de nitrogênio pode favorecer a atividade das bactérias endofíticas diazotróficas na planta. Tal fenômeno está sendo atribuído ao fato da planta, especialmente em solos oligotróficos, apresentar um melhor “status” nutricional quando fertilizada com N, o que favoreceria melhores condições de desenvolvimento bacteriano e pode explicar a baixa quantidade de bactérias diazotróficas obtidas do tratamento sem N no cerrado.

De fato, a inoculação de bactérias na presença de pequenas doses de fertilizantes nitrogenados tem mostrado uma maior eficiência para o sistema planta/bactéria quando comparado com o uso isolado da bactéria. Foi observado que o efeito da inoculação em milho e trigo foi mais pronunciado quando houve inoculação e doses intermediárias de N (DOBBELAERE et al., 2002) e que as bactérias não são inibidas pela presença de nitrogênio (PRADO JÚNIOR, 2008).

Além disso, é possível também que em plantas mais nutridas, as bactérias diazotróficas endofíticas sejam capazes de produzir fitohomônios de forma mais pronunciada e, dessa forma, a promoção do crescimento vegetal se daria também por essa via, haja vista, muitas diazotróficas também apresentarem esta característica (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993, RADWAN et al., 2002).



Frequência de bactérias endofíticas totais por grama de plantas

Figura 4.5.2.2 - Frequência (Número de bactérias endofítica diazotróficas/número de bactérias endofítica totais por grama de plantas) em área de cerrado e mata no estado de Roraima em solos suplementados ou não com nitrogênio. Mostrando o efeito do Nitrogênio.

*Valores diferem significativamente dentro do mesmo ambiente pelo teste t em 5% de probabilidade. C.V.(%) = 59,12.

Obs.: Dados foram transformados pela equação $Y + 1.0 - \text{SQRT}(Y + 1.0)$

4.5.3 Caracterização das Bactérias Endofíticas Diazotróficas Isoladas de Planta de Milho

As 55 bactérias diazotróficas endofíticas foram caracterizadas fenotipicamente em meio de cultivo DYG's, além dos semi-seletivos e, posteriormente agrupadas, considerando-se as características apresentadas nos meios através do índice de similaridade - SM (Simple Matching). Dessa forma, quatro dendrogramas foram obtidos – um para cada meio de cultura. Observou-se

que a maioria das bactérias diferiam consideravelmente dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* utilizados como referência. Diante dessa observação, optou-se por realizar uma análise de similaridade com as características observadas em todos os meios de cultivo conjuntamente em uma única matriz.

Considerando uma similaridade de 85% entre as bactérias, constatou-se a formação de doze grupos fenotípicos (Figura 4.5.3.1; Tabela 4.5.3.1), sendo que as bactérias utilizadas como referências distribuíram-se em três grupos. As espécies *H. seropedicae*, *B. tropica* e *A. amazonense* posicionaram-se no grupo 1, juntamente com outros 5 isolados desse trabalho. Normalmente, estas 3 bactérias, vem sendo isoladas em plantas de milho e outros cereais, pelos meios de cultura NFb, JMV e LGI, respectivamente (RODRIGUES et al., 2006; PERIN, et al., 2006). Contudo, observou-se que todas apresentaram crescimento em todos os meios testados, evidenciando, que são capazes de utilizar as fontes de carbono: manitol, sacarose e ácido málico (anexo). Vale destacar, que não é possível inferir que os isolados agrupados com estas bactérias referências sejam pertencentes a uma destas espécies, apenas com base nas características fenotípicas e fisiológicas avaliadas, sendo necessário, para tanto, análise de biologia molecular das bactérias isoladas.

A bactéria *B. kururiensis*, também utilizada como referência, se agrupou juntamente com outras 8 bactérias oriundas da cultivar BR 106 e BRS 1010 isoladas na área de cerrado (Figura 4.5.3.1), sendo que todas também se desenvolveram em todos os meios de cultura avaliados. Esta bactéria, igualmente às anteriores, aparentemente apresenta baixa especificidade hospedeira, tendo sido constatada em plantas de milho, café, cana-de-açúcar e arroz (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001; RODRIGUES et al., 2006).

A outra bactéria referência, *A. brasilense*, agrupou-se tanto com bactérias oriundas da mata quanto do cerrado, cujo grupo não apresentou crescimento no meio de cultura JMV, o qual apresenta manitol como fonte de carbono e pH 5,5. Também esta bactéria foi encontrada em milho (BALDANI et al., 1997).

Plantas de milho podem ser colonizadas simultaneamente por inúmeras bactérias. Uma diversidade de diazotróficos tem sido identificada em milho como *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Klebsiella* dentre outros (BALDANI et al., 1980, 1986; CHELIUS & TRIPLETT, 2001). Recentemente, novas espécies diazotróficas foram descritas em associação com milho como *A. zae* e *A. canadense* (MEHNAZ et al.,

2007a e 2007b), indicando que número de espécies descritas tende a crescer nos próximos anos.

Dos mais 80 gêneros endofíticos cultiváveis, pouco mais de uma dezena são reconhecidamente diazotróficos. Estes resultados indicam claramente a necessidade de se reavaliar as estratégias atualmente adotadas para que seja possível a descrição da biodiversidade total das bactérias diazotróficas associadas às plantas (ROESCH, 2007).

Semelhantemente a outros trabalhos presentes na literatura, frequentemente isolados de bactérias diazotróficas oriundas de amostras vegetais de ambientes tropicais apresentam pouca semelhança com características fenotípicas, fisiológicas e mesmo genotípicas de estirpes tradicionalmente utilizadas como referência (PERIN, 2007). Apesar de discrepâncias entre características fenotípicas inicialmente observadas de novos isolados com bactérias referências, espécies novas vem sendo descritas, como é o caso de *Burkholderia silvatlantica* para cana-de-açúcar (PERIN et al., 2006).

Neste sentido, é pertinente mencionar que entre os diversos grupos fenotípicos observados nesse trabalho, existe a possibilidade de estarem presentes novas espécies bacterianas, o que exige etapas posteriores de identificação taxonômica.

Na análise de similaridade, de maneira geral, observaram-se bactérias predominantemente agrupadas de acordo com a cultivar e, ou ambiente onde foram isoladas e outras distribuídas por vários grupos (Figura 4.5.3.1 e Tabela 4.5.3.1). As bactérias presentes nos grupos 1 e 4 foram isoladas apenas no cerrado nas cultivares BR 106 e BRS 1010. Por outro lado, os grupos 3, 7 e 8 – com pelos menos 4 bactérias cada – e os grupos 5, 6, 10 e 11 – a maioria com apenas uma bactéria – foram exclusivos da área de mata. Sendo importante destacar que o grupo 3 teve apenas bactérias oriundas da cultivar BRS 4157, e no grupo oito houve predomínio de bactérias também dessa cultivar. Os demais grupos – 2, 9 e 12 – apresentaram bactérias provenientes de ambas as áreas e mais de uma cultivar de milho.

É importante destacar ainda, que não houve agrupamento de bactérias em função da presença de nitrogênio, com exceção do grupo 5 com apenas 1 isolado, o que evidencia que este elemento aparentemente favoreceu a densidade de bactérias em determinados grupos, sendo que estes reuniram bactérias isoladas

também de amostras sem nitrogênio. Ainda outra observação, foi a não formação de grupos exclusivos com bactérias oriundas do colmo, o que evidencia que as bactérias presentes na raiz, são aquelas que posteriormente colonizaram o colmo das plantas de milho, como destacado por LIU; ZHAO; CHEN, (2006).

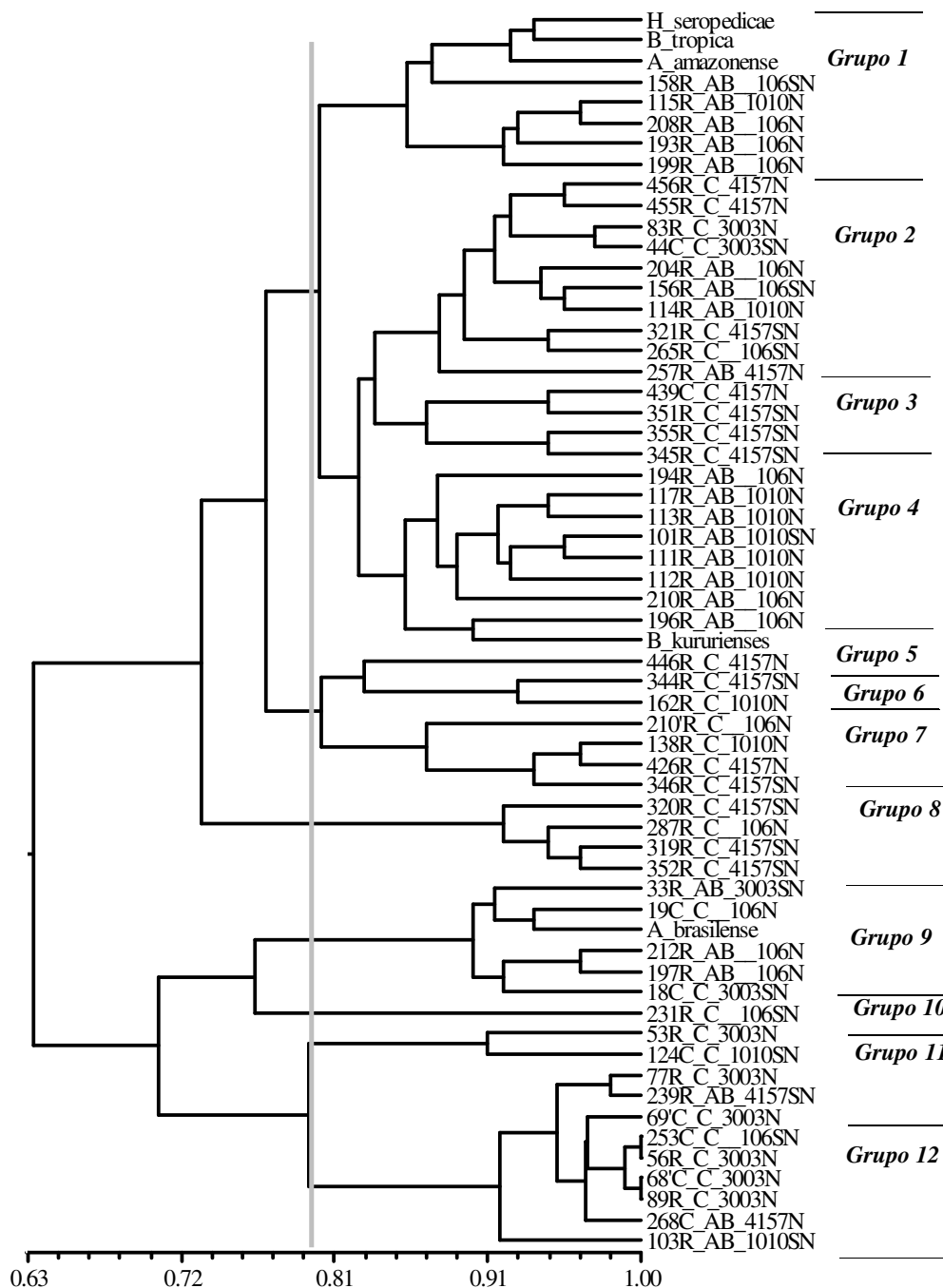


Figura 4.5.3.1 - Dendrograma de similaridade baseado no Coeficiente SM (Simple Matching) e UPGMA (Unweighted Pair Group Method) dos isolados de bactérias diazotróficas endofíticas e bactérias de referência nos meios DYG'S, NFb (3x), LGI, JMV provenientes dos cultivares de milho.

Tabela 4.5.3.1 - Grupos fenotípicos de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de cultivares de milho no cerrado e mata e respectivas características utilizadas para a elaboração do dendrograma de similaridade.

Grupos fenotípicos	Ambiente		Cultivar de milho				Parte da Planta		Nitrogênio		Nº isolados	Principais características nos meio de cultura semiseletivos			
	AB	CO	1010	3003	106	4157	R	C	Sim	Não		DYG'S	NFB	JMV	LGI
1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	5	a1-a2, b1, c1, d1, e2, f1, g2	a1, b1, c2-c3, d1, e2, f2, g8, g9	a2, b1-b2, c2, d1-d2, e1- e2, f1- f2, g3	a1-a2, b1, c2, d1, e1-e2, f1-f2, g3, g7, g10-g11
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10	a1-a2, b1-b2, c1-c2, d1-d2, e1-e2, f1-f2, g2 ou, g3-g4	a1, b1, c1-c2, d1, e1-e2, f1, g1 ou, g2-g5	a1, b1, c2, d1, e1-e2, f1, g1, g2-g3-g5	a1-a2, b1, c2, d1, e1-e2, f1, g2-g3-g5-g7
3	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	4	a1-a2, b1-b2, c1-c2, d1-d2, e1-e2, f1-f2, g2-g3-g4	a1-a2, b1-b2, c1-c2, d1-d2, e1-e2, g11-g12	a1, b1, c2, d1, e2, f1, g 2-g6	a1-a2, b2-b3, d1, e2, f1, g6
4	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	8	a1 e a2, b1, c2, d1, e2, f1-f2, g2-g3	a1, b1, c3, d1, e2, f1-f2, g2-g8	a1-a2, b1, c2-c3, d1-d2, e1-e2, f1-f2, g6-g11	a1-a2, b1, c2, d1, e2, f1-f2, g3-g11
5	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	1	a1, b1, c2, d1, e2, f1, g2	a1, b1, c2, d1, e1, f1, g2	a2, b1, c2, d1, e2, f2, g13	a2, b1, c2, d1, e2, f2, g2
6	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	2	a2, b2, c1, d2, e1-e2, f1-f2, g1-g2	não houve crescimento	a2, b1, c2, d1, e2, f2, g13	a2, b1, c2, d1, e1-e2, f1, g2
7	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	4	a1-a2-a3, b1-b2, c1-c2, d1-d2, e1-e2, f1-f2, g2-g3	não houve crescimento	a1-a2, b1-b2, c2, d1-d2, e2, f1, g2-g3	a1-a2, b1-b2, c2, d1-d2, e1-e2, f2-f2, g6-g7
8	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	4	a1-a2, b1-b2, c1, d1, e1-e2, f1-f2, g1-g4-g12	a2, b2, c1, d2, e1, f2, g2-g12	a1, b1, c2, d1, e2, f1, g2-g3	a2, b2, c1, d2, e1, f2, g12
9	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	5	a1-a2, b1, c1-c2, d1, e1-e2, f1-f2, g2-g3-g4	a1, b1, c1-c3, d1, e2, f1-f2, g8, g9-g5	não houve crescimento	a1, b1, c2, d1, e2, f1, g3-g7
10	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	1	a3, b2, c2, d2, e1, f2, g2	não houve crescimento	não houve crescimento	a2, c1, c2, d1, e1, f1, g7
11	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	2	a2, b1, c2, d1, e2, f1, g2-g3	a1, b1, c1, d2, e1-e2, f1-f2, g1-g8	a2, b1, c2, d1, e2, f1-f2, g13	não houve crescimento
12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9	a1-a2, b1, c2, d1, e2, f1, g1-g2-g3-g4	a1, b1, c2, d1, e2, f2, g8-g9	a1, b1, c2, d1, e2, f1, g3	não houve crescimento

Tamanho: a1: pequena, a2: média, a3: grande; Forma: b1, circular, b2: irregular; Elevação: c1: plana, c2: elevada, c3: convexa; Borda: d1: lisa, d2: ondulada; Transparência: e1: transparente, e2: opaca; Aspecto da colônia: f1: homogênea, f2: heterogênea; Cor: g1: branca, g2: bege, g3: amarela, g4: salmão, g5: rosa, g6: laranja, g7: verde, g8: centro azul e borda branca, g9: centro verde e borda branca, g10: centro preto e borda transparente, g11: centro amarelo e borda transparente, g12: centro branco e borda transparente, g13: centro amarelo escuro e borda clara. AB – Campo Experimental Água Boa; CO – Campo Experimental Confiança; 1010 – BRS 1010; 3003 - BRS 3003; 106 – BR 106; 4157 – BR4157; R-raiz; C-colmo.

4.5.4 Diversidade de Grupos Fenotípicos de Bactérias Endofíticas Diazotróficas nas Plantas de Milho

Houve maior riqueza de grupos fenotípicos – maior número de grupos - de bactérias diazotróficas endofíticas na área de mata, comparativamente ao cerrado, 10 e 5 grupos, respectivamente. Entre as cultivares, maior riqueza de grupos fenotípicos decresceu na seguinte ordem: BR 106, BRS 4157, BRS 1010 e BRS 3003, as quais apresentaram 8, 7, 6 e 4 grupos respectivamente (Tabela 4.5.3.1).

Com base na riqueza de grupos fenotípicos e na distribuição das bactérias dentro dos respectivos grupos, calculou-se o índice de diversidade de Shannon-Weaver. Este índice ecológico tem sido considerado padrão para estimar a diversidade de espécies de forma sensível, levando em consideração a uniformidade e abundância de espécies (ATLAS; BARTHA, 1998).

Entre os ambientes avaliados, maior índice diversidade de grupos fenotípicos de bactérias diazotróficas endofíticas de milho foi observado na área de mata, comparativamente ao cerrado (Figura 4.5.4.1). E, entre as cultivares, maior diversidade foi observada para as variedades de milho, BR 106 e BRS 4157, enquanto para os híbridos, isso ocorreu para a cultivar BRS 1010 e menor para BRS 3003, a qual apresentou índice de diversidade significativamente inferior ao observado para as variedades (Figura 4.5.4.1).

A maior riqueza e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofítica observadas na área de mata (Figura 4.5.4.1), indica que neste ambiente existem determinadas características edafoclimáticas que favorecem o desenvolvimento e estabelecimento de um maior número de espécies de bactérias. Tais características são na maioria das vezes complexas e se estabelecem por condicionantes químicos, físicos, além dos biológicos (WIDMER et al., 1999; POLY et al., 2001). Fatores ambientais como tipo de solo e regime hídrico são fatores determinantes da estrutura da comunidade de diazotróficos (TAN et. al 2003). Se a comunidade de bactérias endofíticas diazotróficas é representada por uma fração da comunidade microbiana presente no solo (SEGHERS et. al, 2004), então a composição da comunidade endofítica será determinada pela influência ambientais e a especificidade entre microorganismos e hospedeiro.

Na análise de solo realizada no período de coleta das plantas de milho (Tabela 4.4.1.1), observou-se que no solo de mata havia mais que o dobro de matéria orgânica, comparativamente a área de cerrado, e também maior teor de argila. Além disso, de forma geral, observaram-se, também maiores teores dos micronutrientes Zn, Fe e Mn em solo de mata. Por outro lado, na parte aérea das plantas, observaram-se maiores teores de Zn no tecido vegetal na área de mata e menores teores de Co e Mo, comparados às plantas de milho do cerrado. Todos os cultivares de milho, com suplementação de N na área de cerrado – CEAB, apresentam maior quantidade de N nas folhas, enquanto que na área de mata – CEC, nem todos com suplementação de N apresentam maior quantidade de N nas folhas (Tabela 4.4.1.2), indicando que na área de cerrado o N mineral foi totalmente utilizado enquanto que na área de mata o mesmo não aconteceu.

Em trabalhos realizados no Rio Grande do Sul, os autores verificaram que bactérias diazotróficas endofíticas oriundas de plantas de milho variam de diversidade genética, dependendo das condições edafoclimáticas da região onde foram coletadas, tendo sido sugerido que o pH do solo, matéria orgânica, e teores de argila, além da pluviosidade estariam influenciando a diversidade destes microrganismos (ROESCH et al., 2007).

Entre as cultivares, o fato de ter havido maior riqueza e diversidade nas variedades, aparentemente indica que genótipos heterozigotos possibilitariam a associação do vegetal com um maior número de espécies bacterianas. O que não necessariamente seria uma regra, pois o híbrido BRS 1010 apresentou diversidade igual às variedades avaliadas.

De fato, existe certo consenso que variedades de milho tendem a se associar mais facilmente com bactérias diazotróficas e, assim obterem maior quantidade de N via fixação biológica. Contudo, alguns trabalhos têm mostrado que não necessariamente as variedades de milho apresentam melhores resposta a inoculação. ALVES (2007) observou que o híbrido SHS 5050 foi capaz de se beneficiar mais da inoculação com *Herbaspirillum* que a variedade BRS 4157 e BR 106 quando as avaliações foram realizadas em condições de campo. Por outro lado, quando as avaliações foram realizadas em substrato estéril, foram observados incrementos significativos na biomassa vegetal da cultivar BRS 4157 quando inoculada. Estes resultados sugerem que esta variedade tem uma adaptação às espécies bacterianas nativas, as quais poderiam competir como a bactéria

inoculante e restringir a fixação biológica de nitrogênio. Vale destacar que também trabalhos realizados em Roraima mostraram incrementos significativos de produtividade em função da inoculação para o híbrido BRS 1010, enquanto não houve resposta significativa para BRS 4157, quando inoculadas também com *Herbaspirillum* (ZILLI et al., 2007).

A inoculação de *A. amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio, em casa de vegetação resultou em maior quantidade de matéria seca e mais acúmulo de P nas raízes do híbrido que na variedade testada (REIS JÚNIOR et al, 2008).

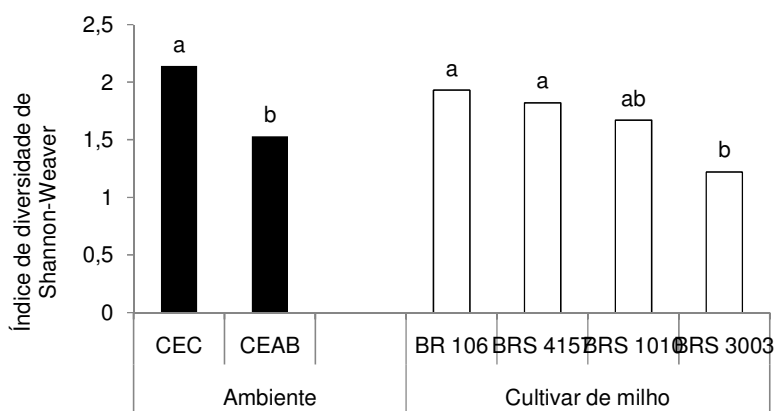


Figura 4.5.4.1 – Diversidade de Grupos Fenotípicos de Bactérias Endofíticas Diazotróficas Isoladas de Cultivares de Milho em Área de Cerrado (CEAB) e Mata (CEC) no Estado de Roraima.

* Médias seguidas de mesmas letra, dentro de ambiente ou cultivar de milho, não diferem significativamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste t.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Em ambos os ambientes estudados houve grande riqueza de grupos fenotípicos de bactérias endofíticas de milho obtidas no meio de cultura DYG's sólido (RODRIGUES NETO et al., 1986), tendo ocorrido maior percentual dessas bactérias nas raízes comparativamente ao colmo das plantas;

Tanto a percentagem de bactérias diazotróficas endofíticas em relação ao número total de bactérias endofíticas, quanto o número de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas refletiram uma interação entre as cultivares de milho e os ambientes;

Os cultivares BR 106 (híbrido) e BRS 1010 (cultivar), do cerrado, e BRS 4157 (híbrido) e BRS 3003 (cultivar) da mata, apresentaram as maiores densidades de bactérias diazotróficas endofíticas, mostrando haver interação entre genótipos de milho e ambiente;

A adubação nitrogenada favoreceu maior densidade de bactérias diazotróficas endofíticas, nas cultivares BR 106 e BRS 3003, nos ambientes de cerrado e de mata, respectivamente;

Maior diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas ocorreu nas plantas de milho cultivadas na área de mata.

REFERÊNCIAS

ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do milho**. 2007. 63p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

AMADO, T.J.C.; MILNICZUK, J.; AITA, C. Recomendação de adubação nitrogenada para o milho no RS e SC adaptada ao uso de culturas de cobertura do solo, sob sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.26, p.241-248, 2002.

ARAÚJO, W. F; SAMPAIO, R. A.; MEDEIROS, R. D. de; Irrigação e adubação nitrogenada em milho, **Scientia Agrícola**. Piracicaba . v.56, n.4, 1999.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4 ed. Redwood: Cummings Science, 1998. 694p.

AVIVI, Y.; FELDMAN, N. The response of wheat to bacteria of the genus *Azospirillum*. **Israel Journal of Botany**. Jerusalem, v. 32, p. 237-241, 1982.

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

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, 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.; DE AZEVEDO, M. S.; REIS, V.M.; DOS S. TEIXEIRA, K.R.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: Avanços e aplicações. In: **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (eds.), p. 621-666, 1999.

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**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 911-922, 1997a.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, R.S; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legumes plants. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.29, p.922-928, 1997b.

BALDANI, J.I.; PEREIRA, P.A.; ROCHA, R.E.M.; DÖBEREINER, J. Especificidade na infecção de raízes por *Azospirillum* spp. em plantas com via fotossintética C₃ e C₄. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.16, p. 323-325, 1981.

BALDANI, J. I.; POT, B. KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.

BALDANI, J. I.; REIS, V.M, TEIXEIRA, K.R., SANTOS; BALDANI,V.L.D. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: Avanços e APLICAÇÕES. IN: **Inter-relação fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas**. SBCE, UFLA, Lavras – MG. p. 621-650, 1999.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996. 238 f . Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 485-491, 2000.

BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 433-439, 1980.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 29, p. 284-299, 1983.

BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; KIMURA, O.; DÖBEREINER, J. **Bactérias fitopatogênicas fixadoras de N₂ em associação com plantas**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, p.25,1997.

BALDANI, V. L. D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHOFF, G; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliense* sp. XXX uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v.69, p.116-166, 1996b.

BARBOSA, E. A.; PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Uso de fontes de carbono por *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolados de plantas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. , v.41, p.827 - 833, 2006.

BARRAQUIO, W.L.; LADHA, J.K. & REVILLA, L., Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**. v.194, p.15-24, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E., *Azospirillum* – plant relationships: physiological , MOLECULAR, AGRICULTURAL, AND environmental advances (1997 – 2003). **Canadian Journal of Microbiology**. v. 20. n. 8. p. 521 – 577, 2004.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996), **Canadian Journal of Microbiol.** v.43, p.103 – 121, 1997.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p.591-605, 1990.

BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L. CARUSI, M. V.; DEL GALLO, M.; VISCA, P. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacea*. **Microbiology**, v. 140, p. 1069-1077, 1994.

BLECKER, H.C.; LÉON, J. Stability analysis in plant breeding. **Plant Breeding**, v. 101, n. 1, p. 1-23, 1988.

BODDEY, L. H.; DART, P.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I. Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 23., Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 7., Simposio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 5., Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2., 1998, Caxambu, **Resumos...** Caxambu: UFLA/SBCS/SBM, p. 809, 1998.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 53-65, 1988.

BODDEY, R.M; OLIVEIRA, O.C.; URQUAIA, S.; OLIVARES, F. L., BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v.174, p.195-209, 1995.

BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v.174, p. 195-209, 1995.

BRASIL, M. DA S. **Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz.** 2005, 137 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitotecnia)- Instituto de Agronomia, UFRRJ, Seropédica.

CABALLERO-MELLADO, J. & MARTINEZ-ROMERO, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied Environmental Bacteriology**, v. 60, p. 1532-1537, 1994.

CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMIREZ, L. E.; REIS, V. M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group. **Applied and Environmental Bacteriology**, v. 61, n. 8, p. 3008-3013, 1995.

CAMPOS, T.; FILHO, V.C. **Principais Culturas de ensino agrícola**, Campinas, SP, v.2, p. 195, 1981. CANTARELLA, H.; DUARTE, A. P. Manejo da fertilidade do solo para a cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V., **Tecnologias de Produção do milho**. Viçosa, MG: Editora UFV, p. 139-182. 2004.

CANUTO, E. L. **Seleção de Bactérias Diazotróficas Endofíticas para Uso com Insumo Biológico em Plantas de Cana-de-açúcar oriundas de sementes**. 2003 72 f. Tese (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. Immunolocalization of dinitrogenase reductase produced by *Klebsiella pneumoniae* in association with *Zea mays* L. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 783-787, 2001.

CHEN, W. M., JAMES, E. K.; COENYE, T.; CHOU, J. H.; BARRIOS, E.; FARIA, S. M. de; ELLIOTT, G. N.; SHEU, S. Y.; SPRENT, J. I.; VANDAME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1847-1851, 2006.

CONAB. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Companhia Nacional de Abastecimento – Conab, 2009. **Acompanhamento da safra agrícola 2008/2009 – 9º Levantamento – junho/2009**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/download/safra/BOLETIM_9_Levantamento_junho2009.pdf> Acesso em: 21/06/2009.

CRUZ, L.M.; SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. 16 S Ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merril.), **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.5, p.2375-2379, 2001.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p. 2223-2230, 2004.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A.; TRYSS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, p. 284-297, 2002.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 22, 2, p. 107-149, 2003.

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

DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992.

DÖBEREINER, J. Emerging technology based on biological nitrogen fixation by associative N_2 - fixing organisms. Graham, P.H.; Harris, S.C., ed. **Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, p.469-483, 1982.

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

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**, Rio de Janeiro, v.34, p.869-881, 1982.

DÖBEREINER, J.; DAY, L.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J. (Eds.). **Nitrogen Fixation**. Pullman: Washington State University , v.2, p.518-538. 1976.

DÖBEREINER, J.; GARCIA DE SALAMONE, I. Biological dinitrogen fixation in maize. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O MILHO EM PERSPECTIVA, 1992. Belo Horizonte. **Anais**. Sete Lagoas: Embrapa/CNPMS, p. 286-294, 1995.

DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison: Science Tech Publishers, p.154, 1987.

DÖBEREINER, J.; DE-POLLI, H. Diazotrophic rhizocoenoses. Stewart D.P.; Gallon, J.R., ed. **Nitrogen fixation**. London: Academic Press, p.301-334, 1980.

DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, p251-258, 1959a.

DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* na solo. II Influência das diversas partes do vegetal. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, p.251-258, 1959b.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária; **Manual de Métodos de Análise de Solo**. Rio de Janeiro. RJ. p. 212, 1997.

EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro de Pesquisa Agroflorestral de Roraima. **Plano Diretor**. Boa Vista: EMBRAPA, CPAF, p.28,1994.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide

environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, p.2790-2798, 2001.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, p.1-42, 1992.

FAGERIA, N.K. **Solos tropicais e aspectos fisiológicos das culturas**. Brasília, p.425, 1989.

FALLIK, J.; OKON, Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 511-515, 1996.

FAO. Food and Agriculture. Organization. FAO Statistical Yearbook 2005-2006. Disponível em:<http://www.fao.org/statistics/yearbook/vol_1_1/index_en.asp>. Acesso em: 12 de outubro de 2008.

FERREIRA, A. C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A. R. V.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis, R.J. **Abstracts...** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB; UFRRJ; p. 210, 1995.

FRANCO, A.A.; BALIEIRO, F.C. Fixação biológica de nitrogênio: alternativas aos fertilizantes nitrogenados. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S; LOPES, A.S.; GUILERME, L.R.G.; FAQUIM, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Lavras, p. 577-595, 1999.

FREITAS, J.L.M.; PEREIRA, P.A.A.; DOBEREINER, J. Effect of organic matter and *Azospirillum* spp. strains in the metabolism of nitrogen in *Sorghum vulgare*. In: VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P., ed. **Associative N₂ fixation**. Boca Raton: CRC Press, v.1, p.155-163, 1981.

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

GALINAT, W.C. The origin of maize: grain of humanity. New York: **New York Botanical Garden Journal**, v. 44, p.3-12, 1995.

GALLOWAY, J. N., ABER, J. D., ERISMAN, J. W., SEITZINGER, S. P., HOWARTH, R. W., COWLING, E. B., COSBY, J. B. The Nitrogen Cascade. **BioScience**. v. 53, n. 4, p. 341-356. 2003.

GARCIA DE SALOMONE, I. E.; DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as

evaluated by ^{15}N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p. 249-256, 1996.

GILLER, K.E.; MERCKX, R. Exploring the boundaries of N_2 -fixation in cereals and grasses: na hypothetical and experimental framework. **Symbiosis**, v. 35, p. 3-17, 2003.

GILLIS, M., V. TRAN VAN, R. BARDIM, M. GOOR, P. HEBBAR, A. WILLEMS, P. SEGERS, K. KERSTENS, T. HEULIN, AND M. P. FERNANDEZ. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to na amended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N_2 -fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology** v. 45, p. 274-289, 1995.

GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, P.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationship between (*Pseudomonas*) *Rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *Autotrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VICENZINI, M. eds. **Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p.293-294, 1991.

GONZALEZ, M. S.; BARRAQUIO, W. L. Isolation and characterization of *Acetobacter diazotrophicus* in *Saccharum officinarum* L., *Saccharum spontaneum* L., and *Erianthus* sp. **The Philippine Agricultural Scientist**, Manila, v. 83, n. 2, p. 173-181, 2000.

GORIS, J.; VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.; FALSEN, E.; QUENSEN, J. F.; TIEDJE, J. M.; VANDEMME, P. Classification of the PCB-and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, p.1677-1681, 2004.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; REDDY P. M.; LADHA, J. K. *Herbaspirillum* colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, v. 154, n. 1, p.131. 2002.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systematic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.1913-1923, 1994.

IBGE Grupo de Coordenação de Estatísticas Agropecuárias – GCEA/IBGE, DPE, COAGRO, **Levantamento sistemático da Produção Agrícola** – outubro de 2005. Em <http://www.ibge.gov.br>, Acessado em 12 de outubro de 2008.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen – fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.45, p. 757 – 766, 1994.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 17, p. 77-119, 1998.

JUNG, S. Y., LEE, M. H., OH, T. K.; YOON, J. H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 2284-2288, 2007.

KAPULNIK, Y.; GAFNY, R.; OKON, Y. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃-uptake in wheat (*Triticum aestivum*, cv. Miriam) in hydroponic systems. **Canadian Journal of Botany**, v.63, p.627-631, 1985

KAVIMANDAN, S.K; SUBBA-RAO, N.S.; MOHRIR, A.V. Isolation of *Spirillum lipoferum* from the stems of wheat and nitrogen fixation in enrichment cultures. **Current Sciences**, Middletown, v.47, p.96-98, 1978.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology e Biochemistry**, v. 36, p. 1229-1244, 2004.

KENNEDY, I.R.; GERK-PEREG, L.L.; WOOD, C.; DEAKER, R.; GILCHRIST, K.; KATUPITIYA, S. Biological nitrogen fixation in non-legumes field crops: facilitating the evolution of in effective association between *Azospirillum* and wheat. **Plant and Soil**, v. 194, p. 65-79, 1997.

KHAMMAS, K.M., AGERON, E., GRIMONT, P.A.D., KAISER, P. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research Microbiology**, n. 140, p. 679-693, 1989.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing a bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.51, p.157-168, 2001.

LIU, X.; ZHAO, H.; CHEN, S. Colonization of maize and rice plants by strain *Bacillus megaterium* C4. **Current Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 186-190, 2006.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E.R.B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; LELIE, D. van der. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.

MAGALHÃES, F. D.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417-430, 1983.

MAGALHÃES, F.M.M.; PATRIQUIN, D.; DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. **Revista Brasileira de Biologia**. Rio de Janeiro, v.39, p. 587-596, 1979.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição de plantas**. São Paulo. Editora Ceres, p. 638, 2006.

MALAVOLTA, E. **Nutrição mineral e adubação do milho**. 2.ed. Divulgação técnica. Ultrafertil, p. 4, 1981.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, p. 319, 1997.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil *Zea mays*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 2805-2809, 2007a.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium isolated from corn rhizosphere., **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 620-624, 2007b.

MUÑOZ-ROJAS, J.; FUENTES-RAMÍRES, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain in culture media and in endophytic association. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 57-66, 2005.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconacetobacter diazotrophic* (syn. *Acetobacter diazotrophic*): a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 137-145, 2002.

NEDER, R. N.; **Microbiologia: Manual de laboratório**, São Paulo, Nobel, 1992. NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, p. 15-60. 1998.

NORMAN, M.J.T.; PEARSON, C.J.; SEARLE, P.G.E. **The ecology of tropical food crops**. 2ed. Melbourne: Cambridge University Press, 430p., 1995.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of *Azospirillum* – inoculated roots. **Plant and Soil**, v. 90, n. 1-3, p. 3-16, 1986.

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

OKON, Y.; BURDMAN, S.; KIGEL, J.; ITZIGSOHN, R. Physiological properties of *Azospirillum brasilense* and its growth promoting effects in the rhizosphere. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: the Role of

Biological Nitrogen Fixation, **Program and Abstracts**. Angra do Reis, p. 55-56, 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. 353f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

OLIVARES, F. L., JAMES, E. K., REIS, V. M., BALDANI, V. L. D., BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Colonização do tecido vascular por *Herbaspirillum* spp. em sorgo e cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, Suplemento, v. 18, p. 313, 1993.

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**, Cambridge, Grã-Bretanha, v. 135, p. 575-597, 1997.

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, Berlin**, v.21, p.197-200, 1996.

OLIVARES, F.L.; FERREIRA, F.P.; SILVA, L.G.; FAÇANHA, A.R.; RAMOS, A.C.; NETTO, A.T.; CAMPOSTRINI, E.; REIS, V.M. & MIGUENS, F.C. Physiological changes induced on the host plant during the endophytic interaction between sugar cane and diazotrophic bacteria. **9th International Symposium on Nitrogen Fixation with non-legumes**, Leuven, Belgium, 2002.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E. T.; TAN, Z. *Azospirillum melinis* sp. Nov., a group of diazotrophs isolated from tropical grass. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Reading, v. 56, p. 1263-1271, 2006.

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007, 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo)-Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

PERIN, L., BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. , v.39, p.763 - 770, 2004.

PERIN, L., MARTINEZ-AGUILAR, L., PAREDES-VALDEZ, G., Baldani, J. I., ESTRADA de LOS SANTOS, P., Caballero-Mellado, J. *Burkholderia silvatlantica* sp nov., a novel diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. , v.56, p.1931 - 1937, 2006.

PERIN, L.; SILVA, M.F. DA; FERREIRA, J.F.; CANUTO, E.L.; MEDEIROS, A.F.A.; OLIVARES, F.L.; REIS, V. M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia**, v. 37, p. 47-53, 2003.

POLY, F.; RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOURBIERE, F.; MONROZIER, L.J. Comparison of nifH gene pools in soils and soil microenvironments with contrasting properties. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, p.2255-2262, 2001.

POSTGATE, J.R. Biological nitrogen fixation: Fundamental. **Philosophical Transactions of the Royal Society**. London, v.296, p.375-85, 1982.

PRADO JUNIOR, J. P. Q. **Qualidade e produtividade da cana-de-açúcar inoculada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e adubada com nitrogênio mineral e orgânico**. 2008, 49f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) Instituto Agrônomo, Campinas, São Paulo.

QUADROS, P. D. de; **Inoculação de *Azospirillum* spp. em Sementes de Genótipos de Milho Cultivados no Rio Grande do Sul**. 2009, 60f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia Ciência do Solo)- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre.

RADWAN, T. EL-S., EL-D.; MOHAMED, Z.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, v. 32, p. 39-54, 2002.

REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEMANS, S.; DE LEY, J. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.37, p.43-51, 1987.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of "Kallar grass" (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 43, n. 3, p. 574-584, 1993.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 985-994, 2000.

REIS JUNIOR, F. B. dos; MACHADO, C. T. T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência de Solo**, v. 32, p. 1139 – 1146, 2008.

REIS JUNIOR, F.B. dos; SILVA, M.F. da; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Intra-specific diversity study of the nitrogen fixing bacterium *Azospirillum amazonense* isolated from different *Brachiaria* species. **Symbiosis**, v.36, p.41-56, 2004.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 19, p. 227-247, 2000.

RONCATO-MACCARI, L. D. B. **Colonização de Gramíneas por *Herbaspirillum seropedicae* e expressão de genes *nif* 'in planta'**. Curitiba, 2003. 93 f. **Tese de doutorado em Ciências Bioquímica** – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 39 – 47, 2003.

ROCHA, R.E.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Specificity of infection by *Azospirillum* spp. in plant with C₄ photosynthetic pathway. **Associative N₂ fixation**. Boca Raton. p.67-69, 1981.

RODRIGUES, E. P. **Caracterização fisiológica de estirpes de *Azospirillum amazonense* e avaliação dos efeitos da inoculação em plantas de arroz inundado**. 2004, 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo)- Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

RODRIGUES, L. da S. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado**. 2003, 94 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo)- Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, p. 275 – 284, 2006.

RODRIGUES NETO, J.; MALVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

ROESCH, L. F. **Diversidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho cultivadas no estado do Rio Grande do Sul**. 2007, 165 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo)- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ROESCH, L. F., CAMARGO F., SELBACH, P., SÁ de, E. S., PASSAGLIA, L., Identificação de cultivares de milho eficientes na absorção de nitrogênio e na associação com bactérias diazotróficas, **Ciência Rural**, Santa Maria, v35, n.4,

p.924-927, jul-ago, 2005. ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O.; DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE MILHO. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 31:1367-1380, 2007.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc – Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. State University for New York, 1994.

RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L.S.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 45, p. 39 – 47, 2003.

ROTHBALLER, M., SCHMID, M., KLEIN, I., AND HARTMANN, A. Characterization of *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov. isolated from surface sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.56, p. 1341-1348, 2006.

SALA, V. M. R., FREITAS, S. S., DONZELI, V. P., FREITAS, J. G., GALLO, P. B., SILVEIRA, A. P. D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p. 345-352, 2005.

SALA, V.M.R. **Atividade microbiana do solo e a interação de diazotróficos endofíticos e fungos micorrízicos arbusculares na cultura do trigo**. 2002. 123p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. SP.

SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E.M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S.D. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1475-1482, 2004.

SOUSA, D.M.G. de; LOBATO, E. Adubação com nitrogênio. In: SOUSA, D.M.G. de; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2.ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, p.129-144, 2004.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms**. London: Chapman and Hall, 2ed., 1990. 256p.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 42, p.487 - 506, 2000.

TAN, Z.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Effect of Nfertilization, plant genotype and environmental conditions on *nifH* gene pools in roots of rice. **Environmental Microbiology**. v.5, p.1009-1015, 2003.

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

TOLLENAAR, M.; DWYER, L.M. Physiology of maize. In: SMITH, D.L.; HAMEL, C. ed. Crop Yield: **Physiology and Processes**. Berlin: Springer, p.169-204, 1999.

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

USDA Official Estimates world corn production, consumption and stocks. **Created in 1/1/2006**. Disponível em:<http://www.faz.usda.gov/psd/complete_tables/GF-table9-81.htm>, Acesso em 12 de outubro de 2008.

VALVERDE, A, VELÁZQUEZ, E., GUTIÉRREZ, C., CERVANTES, E., VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of Phaseolus vulgaris. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 53, p. 1979-1983, 2003.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; VOS, DE P. E WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 25, p. 507-512, 2002a.

VILARINHO A. A. BRS 1010 – Híbrido Simples de Milho para os Cerrados de Roraima. **Comunicado Técnico 6**, Embrapa Roraima;,04p, 2006.

VILARINHO A. A. **Variedade de milho Sol da Manhã: opção para solos de baixa fertilidade**. 2006. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=23287>>. Acesso em: 21/6/2009.

VILARINHO A. A., MARSARO JÚNIOR A. L., NECHET K. de L., GIANLUPPI D, GIANLUPPI V., SMIDERLE O. J. Recomendações Técnicas para o Cultivo do Milho nos Cerrados de Roraima, **Circular Técnica 03**, Embrapa Roraima; 22p, 2005.

VILARINHO, A.A. **Dois novas opções de milho híbrido para Roraima: BRS 1010 e BRS 3003**. 2007. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_2/MilhoHibrido/index.htm>. Acesso em: 21/6/2009.

WATANABE, I.; BARRAQUIO, W.L.; GUZMAN, M.R.. Nitrogen-fixing (acetilene reduction) activity and population of aerobic heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland rice. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 37, n. 5, p. 813–817, 1979.

WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.35, n.11, p. 2277-2285, 2000.

WELBAUM, G.E.; STURZ, A.V.; DONG, Z.; NOWAK, J.; Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 23, n. 2, p. 175-193, 2004.

WIDMER, F.; SHAFFER, B.T.; PORTEOUS, L.A. & SEIDLER, R.J. Analysis of nifH gene pool complexity in soil and litter at a Douglas fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65 p.374-380, 1999.

XIE, C-H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1435–1438., 2005.

ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; KAMAGATA, Y.; KANAGAWA, T.; KURANE, R. *Burkholderia kururienses* sp. nov., a trichloroethylene (TCE) – degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. , **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 50, p. 743-749, 2000.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; REIS, V. M., ALVES, G. C.; BALDANI, L. D.; CORDEIRO, A. C. Contribuição da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* para o rendimento de grãos de arroz e milho em Roraima, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa Roraima; n. 6, p. 20, 2007.

ANEXOS

ANEXO A

MEIOS DE CULTURAS E SOLUÇÕES

MEIO DE CULTURA DYG'S SÓLIDO (RODRIGUEZ NETO, 1986) (para inocular as amostras e posteriormente isolar as bactérias endofíticas e caracterizar).

Glicose	2,0 g
Ácido málico.....	2,0 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Ácido glutâmico	1,5 g

Ajustar pH para 6,5 com solução de KOH a 10%.

Completar para 1000 mL com H₂O destilada.

Adicionar 15gL⁻¹ de agar para meio sólido.

MEIO DE CULTURA DYG'S LÍQUIDO (RODRIGUEZ NETO, 1986) (para estocar as bactérias).

Glicose	2g
Ácido málico	2g
Peptona bacteriológica.....	1,5g
Extrato de levedura.....	2,0g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,5g
Ácido glutâmico.....	1,5g

Ajustar pH para 6,5 com solução de KOH a 10%.

Completar para 1000 mL com H₂O deonizada autoclavada.

Adicionar 15gL^{-1} de agar para meio sólido.

Acrescentar 25% de glicerol

MEIO DE CULTURA BMGM (ESTRADA DE LOS SANTOS, 2001) (para identificar as bactérias diazotróficas endofíticas).

Ácido málico	2g
Glicose.....	1g
Monitol.....	1g
K_2HPO_4	0,5g
KHPO_4	0,5g
MgSO_4	0,2g
CaCl_2	0,02g
Na_2MoO_4	0,002g
FeSO_4	0,01g
pH.....	6,0
Agar.....	2,3g (usar 2,0g)
H_2O	1000 mL (deonizada e autoclavada)

MEIO DE CULTURA SEMI SELETIVO LGI (MAGALHÃES et al., 1983)

Sacarose.....	5 g
K_2HPO_4 Sol.10%	2 mL
KH_2PO_4 Sol.10%	6mL
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Sol.10%	2 mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Sol. 1%.....	2 mL
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Sol, 0.1%	2 mL
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Sol 1%.....	1 mL
Azul de bromotimol 0.5% em 0.2 N de KOH	5 mL
FeEDTA Sol 1,64%	4mL
Vitamina para meio de cultura.....	1 mL

Completar para 1000 mL com H₂O destilada.

Ajustar o pH para 6,0 – 6,2 com H₂SO₄ sol. 5%

Colocar 1,4 gL⁻¹ de Agar para semi-sólido e 15gL⁻¹ para sólido.

MEIO DE CULTURA SEMI SELETIVO JMV (BALDANI, 1996)

Manitol	5 g
K ₂ HPO ₄ Sol, 10%	6 mL
KH ₂ PO ₄ Sol, 10%.....	18 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O Sol, 10%	2 mL
NaCl Sol, 10%	1 mL
CaCl ₂ . 2H ₂ O Sol, 1%	2 mL
Azul de bromotimol, solução 0,5% em 0,2 N de KOH	2 mL
FeEDTA sol. Sol, 1,64%	4 mL
Sol. de micronutrientes para meio de cultura.....	2 mL
Vitamina para meio de cultura	1 mL
Extrato de levedura.....	100 mg

Completar para 1000 mL com água destilada.

Ajustar o pH para 4,2 – 5,4.

Adicionar o ágar 1,6gL⁻¹ para semi-sólido e 25gL⁻¹ para sólido.

MEIO DE CULTURA SEMI SELETIVO NFb (3x) (BALDANI; DÖBEREINER, 1980)

Ácido málico.....	5,0 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,5 g L ⁻¹
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g L ⁻¹
NaCl	0,1 g L ⁻¹
CaCl ₂ . 2H ₂ O.....	0,02 g L ⁻¹
Solução de micronutrientes	2 mL
Azul de bromotimol (solução 0,5% em 0,2N KOH).....	6 mL
FeEDTA (solução 1,64%).....	4 mL

Solução de micronutrientes para meio de cultura.....	2 mL
Solução de vitaminas	1 mL
KOH	4,5 g L ⁻¹
Extrato de levedura	50mg

Completar para 1000 mL com água destilada.

Ajustar o pH 6,5 - 6,8 com solução de KOH a 1%

Adicionar 1,3 gL⁻¹ de agar para semi sólido e 15gL⁻¹ para sólido.

MEIO DE CULTURA SEMI SELETIVO NFB (BALDANI; DÖBEREINER, 1980)

Ácido málico.....	5 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	Sol.10%.....5 mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sol.10%.....2 mL
NaCl	Sol.10%.....1 mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sol.1%.....2 mL
Azul de bromotimol.....	0.5% em 0.2N de KOH.....2 mL
Solução de micronutrientes para meio de cultura.....	2 mL
FeEDTA	Sol.1.64%.....4 mL
KOH.....	4.5 g L ⁻¹
Vitamina para meio de cultura.....	1mL
Extrato de levedura	50mg

Completar para 1000 mL com H₂O destilada.

Ajustar o pH. para 6,5 e colocar o agar por último.

Adicionar 1,8 gL⁻¹ de agar para semi sólido e 15gL⁻¹ para sólido.

SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES (DÖBEREINER et al. 1995)

CuSO ₂ . 5H ₂ O	0,04 g L ⁻¹
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1,20 g L ⁻¹
H ₃ BO ₃	1,40 g L ⁻¹

Na₂Mo₄. 2H₂O.....1,00 g L⁻¹
MnSO₄. 2H₂O.....1,175 g L⁻¹

SOLUÇÃO DE VITAMINAS (DÖBEREINER et al., 1995)

Biotina.....10mg
Pirridoxol – HCl20 mg

Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100 mL com água destilada.
Manter a solução em geladeira.

SOLUÇÃO SALINA (para diluição)

8,5g de NaCl para 1000 mL de H₂O deionizada e autoclavada

SOLUÇÃO PARA CORREÇÃO DE pH (NaOH à 10%)

10g de NaOH para 100 mL de H₂O deionizada e autoclavada.

SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO A 10% (para desinfecção as amostras de raiz e colmo)

100 mL de Hipoclorito
900 mL de H₂O estéril

ANEXO B**IMAGEM DOS EXPERIMENTOS E PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS**

Plantio de milho no CEC – Área de Mata.



Plantio de milho no CEAB – Área de Cerrado.



Coleta das folhas para análise foliar.



Coleta da raiz e colmo dos cultivares de milho.



Amostra sendo medida 10 cm de distância da raiz para ser retirada a amostra de colmo.



Amostra já separada em raiz e colmo.



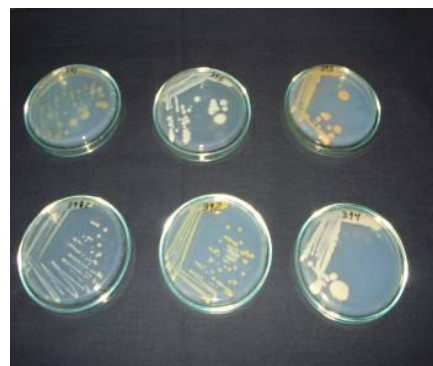
Amostras lavadas e levadas ao Laboratório de Microbiologia do Solo para pesagem.



Amostras processadas em repouso por 1 hora.



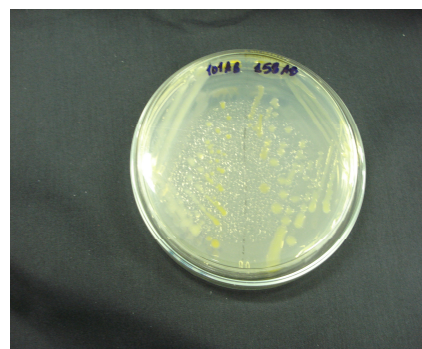
Colônias diferentes fenotipicamente foram isoladas.



Colônias isoladas em placas de Petri.



A presença de bactérias diazotróficas microaerófilas foi verificada pela formação de película na superfície do meio de cultura.



Os meios semi seletivos utilizados foram LGI, NFb (3x) e JMV