

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS  
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA  
NÍVEL MESTRADO

TAÍS VARGAS GARCIA

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A DUAS VARIEDADES DE *Oryza sativa* L.  
CULTIVADAS NA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL DO ARROZ-IRGA, RS

SÃO LEOPOLDO

2014

TAÍS VARGAS GARCIA

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A DUAS VARIEDADES DE *Oryza sativa* L.  
CULTIVADAS NA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL DO ARROZ-IRGA, RS

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre, pelo  
Programa de Pós-Graduação em Biologia da  
Universidade do Vale do Rio dos Sinos -  
UNISINOS

Área de concentração: Conservação e Manejo  
de Ecossistemas e de Vida Silvestre

Orientadora: Dra. Lidia Mariana Fiuza

Coorientador: Dr. Vilmar Machado

SÃO LEOPOLDO

2014

TAÍS VARGAS GARCIA

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A DUAS VARIEDADES DE *Oryza sativa* L.  
CULTIVADAS NA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL DO ARROZ-IRGA, RS

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre, pelo  
Programa de Pós-Graduação em Biologia da  
Universidade do Vale do Rio dos Sinos -  
UNISINOS

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

---

Dra. Rute Terezinha da Silva Ribeiro - Universidade de Caxias do Sul - UCS

---

Dr. Victor Hugo Valiati - Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS

---

Dra. Neiva Knaak - Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS

Dedico esta dissertação aos meus pais, José e Iloni, meus maiores exemplos.



## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Dra. Lidia Mariana Fiuza, pela confiança e ensinamentos.

Ao meu incansável coorientador, Dr. Vilmar Machado que, mesmo estando tão longe, sempre se fez presente, pelos ensinamentos, paciência e constante incentivo. (Tu és “o cara”!)

À CAPES e à UNISINOS, pelo apoio financeiro.

Ao IRGA, pelo material biológico, em especial a Graziela Scheer e ao Dr. Roberto Luis Weiler, pela indispensável ajuda.

Aos incomparáveis professores, Dr. Victor Hugo Valiati e Dra. Anelise Vicentini Kuss, por todo o auxílio e colaboração.

A todos os professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia (PPG-Biologia) - UNISINOS, em especial: Mateus de Oliveira, Jonas Cavalli e Gustavo Aver, fiéis escudeiros dos tempos das disciplinas.

À colega MSc. Catusca Reali, pelas inúmeras dúvidas esclarecidas.

Aos demais colegas do Laboratório de Microbiologia e Toxicologia - UNISINOS e às laboratoristas MSc. Diouneia Berlitz e Irene Olkoski. Em especial à última, pela amizade, companheirismo e constante colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, pela compreensão e incentivo.

Ao Israel Rosa de Oliveira, meu amor, agradeço pelo carinho, paciência e todo auxílio psicológico prestado durante esta dura caminhada. Te amo muito!

A minha mãe Iloni, minha melhor amiga, que compartilhou comigo todos os momentos e sentimentos desta jornada. Te amo mais do que tudo!

Ao meu pai José, meu grande mestre, por todos os ensinamentos, carinho, dedicação, e pelo incondicional apoio aos meus estudos sempre. Te amo mais do que tudo!

Ao meu sábio avô, Amandio de Vargas (*in memoriam*), por ter sido um grande incentivador da minha formação profissional. Saudades!

## RESUMO

Microrganismos vivendo no interior dos tecidos das plantas sem causar efeitos prejudiciais visíveis de sua presença são chamados endofíticos. As bactérias endofíticas podem promover o crescimento das plantas de várias maneiras: através da secreção de reguladores de crescimento vegetal, pela solubilização de fosfato, entre outras. Na busca de práticas agrícolas ambientalmente sustentáveis, tem sido dada considerável atenção à fixação biológica de nitrogênio atmosférico. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar, através de métodos dependentes de cultivo, a ocorrência de bactérias endofíticas em colmos e folhas de duas amostras das variedades “RG 121” e “RG 900” de arroz irrigado, num sistema de cultivo convencional. Foram coletadas plantas de arroz de duas variedades na Estação Experimental do Arroz, do Instituto Rio Grandense do Arroz (EEA-IRGA), Cachoeirinha/RS, no ano agrícola 2012/2013. As plantas coletadas em campo foram submetidas à desinfecção superficial, seguida do isolamento e cultivo das bactérias endofíticas em meios de cultura semi-sólidos, livres de nitrogênio: NFb (*Azospirillum brasilense/A. lipoferum*), JNFb (*Herbaspirillum seropedicae/H. rubrisubalbicans*) e LGI-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*). Ao final desses procedimentos, foram obtidos 190 isolados bacterianos, os quais agruparam-se, de acordo com suas características fenotípicas, em 29 morfotipos. A partir disso, o padrão de distribuição dos morfotipos entre oito condições foi avaliado por Análise de Correspondência Destendenciada (DCA). As oito condições foram: C1 = amostra (planta) 1, variedade “RG 121”, colmos; C2 = amostra 1, variedade “RG 121”, folhas; C3 = amostra 1, variedade “RG 900”, colmos; C4 = amostra 1, variedade “RG 900”, folhas; C5 = amostra (planta) 2, variedade “RG 121”, colmos; C6 = amostra 2, variedade “RG 121”, folhas; C7 = amostra 2, variedade “RG 900”, colmos; C8 = amostra 2, variedade “RG 900”, folhas. Os dois primeiros eixos da DCA explicaram 28,5 % da variância total do conjunto de dados - 23,9 % de explicação somente pelo eixo 1. Ainda, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) na tentativa de estabelecer quais morfotipos melhor explicam as diferenças observadas entre as condições. Deste modo, os eixos 1 e 2 da PCA tiveram uma proporção de explicação acumulada correspondente a 45,61 %, sendo o eixo 1 responsável por 25,91 % destes. Por fim, em função do número de isolados obtidos por grupo fenotípico, pôde-se calcular o índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ), que relaciona a riqueza e uniformidade de espécies (morfotipos) para cada área (condição) em estudo. Estes foram testados par-a-par pelos métodos de *bootstrapping* e permutação quanto a possíveis diferenças significativas. De modo que valores de  $H'$  estatisticamente diferentes apresentados por

algumas das combinações de condições puderam ser relacionados à amostra (planta), à estrutura vegetal (colmos e folhas) e à variedade, isolada ou conjuntamente. O crescimento bacteriano em meios de cultura livres de nitrogênio, em condições microaerofílicas, infere a ocorrência da capacidade de fixação biológica de nitrogênio.

Palavras-chave: Arroz irrigado. Microrganismo. Endofítico. Citomorfologia. Biologia molecular.



## ABSTRACT

Microorganisms living within the tissues of plants without causing visible detrimental effects of their presence are known as endophytes. The endophytic bacteria can promote plant growth in various ways: by secreting plant growth regulators, by phosphate solubilization, among others. In pursuit of environmentally sustainable agricultural practices, considerable attention has been given to the biological nitrogen fixation. Thus, the aim of this study was to evaluate, by culture-dependent methods, the occurrence of endophytic bacteria in stems and leaves of two samples of varieties "RG 121" e "RG 900" of irrigated rice, on a conventional cropping system. Rice plants from two varieties were collected in the Estação Experimental do Arroz, from Instituto Riograndense do Arroz (EEA-IRGA), Cachoeirinha/RS, in the agricultural year 2012/2013. Plants collected in the field were submitted to surface disinfection, followed by isolation and cultivation of endophytic bacteria in semisolid, nitrogen-free, culture media: NFb (*Azospirillum brasilense/A. lipoferum*), JNFb (*Herbaspirillum seropedicae/H. rubrisubalbicans*) and LGI-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*). At the end of these procedures, 190 bacterial isolates were obtained, which were grouped, according to their phenotypic characteristics, in 29 morphotypes. From this, the pattern of distribution of morphotypes in eight conditions was assessed by Detrended Correspondence Analysis (DCA). The eight conditions were: C1 = sample (plant) 1, variety "RG 121", stems; C2 = sample 1, variety "RG 121", leaves; C3 = sample 1, variety "RG 900", stems; C4 = sample 1, variety "RG 900", leaves; C5 = sample (plant) 2, variety "RG 121", stems; C6 = sample 2, variety "RG 121", leaves; C7 = sample 2, variety "RG 900", stems; C8 = sample 2, variety "RG 900", leaves. The first two axes of DCA explained 28.5 % of the total variance of the data set - 23.9 % of explanation only by axis 1. In addition, a Principal Components Analysis (PCA) was performed in attempt to establish which morphotypes best explain the observed differences between the conditions. Thus, the axes 1 and 2 of the PCA had a proportion of accumulated explanation corresponding to 45.61 %, being the axis 1 responsible for 25.91 % of them. Finally, according to the number of isolates obtained by phenotypic group, the Shannon-Weaver diversity index ( $H'$ ) were calculated, which relates the richness and evenness of species (morphotypes) for each area (condition) in study. These were tested pair-to-pair by bootstrapping and permutation methods for possible significant differences. Thus, statistically different values of  $H'$  presented by some of the combinations of conditions could be related to the sample (plant), plant structure (stems and leaves) and

variety, individually or together. The bacterial growth in nitrogen-free culture media, under microaerophilic conditions, implies the occurrence of biological nitrogen fixation capacity.

Keywords: Rice paddy field. Microorganism. Endophytic. Cytomorphology. Molecular biology.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>51</b>
ANEXO A - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS .....	52
ANEXO B - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA, PRODUÇÃO TÉCNICA E ATIVIDADES COMPLEMENTARES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

Microrganismos vivendo no interior dos tecidos das plantas sem causar efeitos prejudiciais visíveis de sua presença são chamados endofíticos. Comunidades endofíticas cultiváveis podem ser isoladas após desinfecção superficial do material vegetal (BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006; KHAN; DOTY, 2009).

É possível concluir nos dias de hoje, após serem mais bem estudados, que estes microrganismos tenham efeitos positivos sobre a planta hospedeira, por exemplo, promovendo o crescimento vegetal, aumentando a resistência a patógenos e o fornecimento de nitrogênio atmosférico (AZEVEDO et al., 2000; MANO; MORISAKI, 2008).

As bactérias endofíticas podem promover o crescimento das plantas de várias maneiras: através da secreção de reguladores de crescimento vegetal (por exemplo, o ácido indolacético), pela solubilização de fosfato, entre outras (BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006).

No solo, há grandes reservas de fósforo (P) em formas insolúveis, que não podem ser utilizadas pelas plantas. Algumas bactérias presentes na rizosfera são, porém, capazes de secretar ácidos orgânicos e fosfatases que facilitam a conversão das formas insolúveis de P em formas disponíveis para as plantas hospedeiras. Já os sideróforos, quelantes de ferro de baixo peso molecular, também sintetizados por essas bactérias, disponibilizam tal elemento para as plantas e atuam, assim, como promotores do crescimento vegetal (KUSS, 2006). Além disso, as bactérias endofíticas fornecem vitaminas essenciais para as plantas. As auxinas aumentam a produção de sementes e a germinação, juntamente com o aumento do crescimento da parte aérea da planta e do perfilhamento. Outros efeitos da colonização endofítica na planta hospedeira incluem o ajuste osmótico, a regulação estomática e a modificação morfológica da raiz (BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006).

O arroz (*Oryza sativa* L.) é o cereal cultivado de maior importância econômica e social no mundo, suprimindo mais de 50 % da população global (CARDOSO et al., 2010; KAGA et al., 2009). São cerca de 150 milhões de hectares utilizados para o seu cultivo, e destes, 75 % estão em solos alagados (KUSS, 2006). O Brasil encontra-se entre os 10 principais países produtores de arroz, e a região Sul, onde está concentrado o cultivo de arroz irrigado, contribui com 70 % da produção brasileira (CARDOSO et al., 2010). Na safra 2012/13, o Rio Grande do Sul registrou uma área plantada com arroz correspondente a 1.078.833 hectares (REVISTA LAVOURA ARROZEIRA, 2014).

Na busca de práticas agrícolas ambientalmente sustentáveis, tem sido dada considerável atenção à fixação biológica de nitrogênio atmosférico. Várias bactérias diazotróficas, incluindo *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Alcaligenes* spp., *Azospirillum* spp. e *Serratia* spp., têm sido isoladas da rizosfera do arroz. No entanto, a associação de espécies endofíticas diazotróficas dos gêneros *Acetobacter*, *Azoarcus* e *Herbaspirillum* com gramíneas é que tem despertado um novo interesse devido a sua ocorrência principalmente no interior dos tecidos vegetais e à evidência de significativa fixação biológica de nitrogênio (ELBELTAGY et al., 2001). Alguns estudos têm demonstrado que muitas endofíticas têm uma ampla gama de hospedeiros: *H. seropedicae*, por exemplo, tem sido encontrada em diversas culturas de importância agropecuária, incluindo milho, sorgo, cana-de-açúcar, e outras gramíneas (ZAKRIA et al., 2007).

Bactérias endofíticas vêm sendo consideradas potenciais agentes de controle biológico (BACILIO-JIMÉNEZ et al., 2001; BANDARA; SENEVIRATNE; KULASOORIYA, 2006; JOSHI; TYAGI; BHATT, 2011; KAGA et al., 2009; KUSS, 2006; MANO; MORISAKI, 2008; TANTAWY, 2009). O mecanismo pelo qual essas bactérias induzem proteção nas plantas hospedeiras ainda permanece incerto. No entanto, a produção de sideróforos, metabólitos com atividade anti-fúngica e/ou a competição por nutrientes e exclusão de nicho de outros microrganismos colonizadores têm sido sugeridos (BACILIO-JIMÉNEZ et al., 2001). Desta forma, a inoculação dessas bactérias em sementes ou plantas vem sendo utilizada com sucesso na redução do impacto de doenças causadas por bactérias, fungos, vírus, nematoides e insetos (BERG; HALLMANN, 2006; KERRY, 2000; PING; BOLAND, 2004; RAMESH; JOSHI; GHANEKAR, 2009; STURTZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000).

A colonização endofítica da cepa B510 de *Azospirillum* sp. em plantas de arroz induz resistência contra a brusone, doença causada pelo fungo *Magnaporthe grisea* e contra a ferrugem bacteriana, causada pela bactéria *Xanthomonas oryzae* (IKEDA et al., 2010). Várias bactérias endofíticas são conhecidas por inibir fitopatógenos, e sua aplicação na agricultura vem sendo testada (MANO; MORISAKI, 2008). Mukhopadhyay et al. (1996) relatam que várias bactérias endofíticas isoladas de sementes do arroz exibem forte atividade anti-fúngica contra *Rhizoctonia solani*, *Pythium myriotylum*, *Gaeumannomyces graminis* e *Heterobasidium annosum*. Igualmente, o endófito do arroz *Bacillus megaterium* desempenha forte atividade antagônica contra *Meloidogyne graminicola*, praga que afeta a orizicultura (MANO; MORISAKI, 2008). Cho et al. (2007) sugerem que a virulência de *Burkholderia glumae*, o patógeno causador do apodrecimento das plântulas e grãos do arroz, controlada por “quorum sensing”, é inibida por *Burkholderia* sp. KJ006, que possui um gene N-acil-

homoserina lactona (aiiA). Neste mesmo estudo, foram encontradas duas cepas rizóbias indutoras de ácidos fenólicos, que desencadeiam a resistência sistêmica e fornecem bioproteção às plantas de arroz infectadas por *Rhizoctonia solani*, o agente causador da doença da queima da bainha nessa cultura. Além disso, ambas cepas rizóbias promovem o crescimento e aumentam a produtividade das plantas de arroz em estufa.

Apesar da associação entre as bactérias do gênero *Rhizobium* e as culturas de plantas leguminosas ser a mais bem estudada, e apresentar a maior contribuição quanto à fixação biológica de nitrogênio, algumas gramíneas têm demonstrado potencial significativo, como a cana-de-açúcar, o milho, o arroz e o trigo (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007). A fixação biológica de nitrogênio por bactérias diazotróficas em leguminosas é evidenciada pela formação de nódulos. No entanto, como não há nodulação nas gramíneas, a averiguação da eficiência da fixação biológica de nitrogênio tem sido feita através da observação de parâmetros que indicam a capacidade das plantas de crescer e acumular nitrogênio. Quanto aos sistemas de produção agrícola, o sucesso na utilização de bactérias diazotróficas está relacionado à habilidade de selecionar, incorporar e manter populações benéficas no campo. A rotação de culturas e a forma de manejo da lavoura podem influenciar as populações microbianas do solo, sendo que se busca o desenvolvimento de sistemas de produção que beneficiem as populações de diazotróficos. O uso de protetores vegetais químicos, por sua vez, reduz a quantidade e a qualidade de populações microbianas específicas (KUSS, 2006).

Curá et al. (2005) consideram a atuação de *Azospirillum brasilense* benéfica para as plantas, uma vez que libera fitohormônios, controla o crescimento de patógenos presentes na rizosfera e fixa nitrogênio atmosférico, transformando-o em amônia facilmente assimilável pela planta. Deste modo, *Azospirillum* sp. B510, mencionada anteriormente por atuar no controle biológico, tem sido escolhida como um inoculante endofítico benéfico para a produção de arroz no Japão, e suas interações com essa cultura têm sido avaliadas em experimentos de laboratório e campo. Em suma, *Azospirillum* sp. B510 promove o crescimento de plantas de arroz levando ao aumento de perfilhos na fase inicial, e resultando no aumento da produção de sementes através do aumento do número de panículas. Apesar de algumas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal produzirem fitohormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, desconhece-se, até o momento, se *Azospirillum* sp. B510 produz fitohormônios no tecido da planta hospedeira de modo a promover seu crescimento (IKEDA et al., 2010).

Li et al. (2007) indicam que *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* tem potencial para ser utilizada como endófito para expressão de genes exógenos (introduzidos por meio de um vetor de transformação) no arroz.

Ainda, a cepa B501 de *Herbaspirillum* sp., originalmente isolada do arroz selvagem (*O. officinalis*), é uma importante endofítica diazotrófica. A cepa B501*gfp1* coloniza brotos e sementes de *O. officinalis* e fixa quantidades significativas de nitrogênio. Também tem sido relatada a habilidade dessa cepa bacteriana em colonizar raízes e colmos basais de cana-de-açúcar após inoculação pela raiz. Isso indica que, sob condições adequadas de crescimento e com a técnica de inoculação apropriada, pode colonizar outras plantas além de sua hospedeira original (ZAKRIA et al., 2007).

O isolamento em meios de cultura é a metodologia mais comum para avaliar comunidades bacterianas de diferentes ambientes, principalmente devido a sua aplicação simples. No entanto, é uma análise limitada e influenciada por certos fatores, quase sempre subestimando a diversidade bacteriana. A elevada diversidade presente na maioria das amostras ambientais é difícil de representar em meios de cultura, uma vez que a grande maioria das espécies bacterianas não cresce em meios de isolamento padrão. Tem sido demonstrado que os isolados obtidos por plaqueamento não representam seu habitat natural porque métodos de isolamento aplicados acessam somente um pequeno subconjunto da comunidade microbiana total do ambiente. Melhorias experimentais para o cultivo baseiam-se em imitar o ambiente de origem das bactérias de interesse. Por exemplo, a suplementação de meios de cultura com extratos do solo pode resultar em maior diversidade de espécies cultiváveis. Além disso, alterar as condições de incubação das culturas pode estimular o crescimento de bactérias, por exemplo, através da mudança da composição atmosférica e da adição de nutrientes específicos e moléculas sinalizadoras. Embora estudos preliminares revelem melhorias nos métodos de isolamento microbiano destinados à análise da diversidade bacteriana em ambientes distintos, ainda é imprescindível a utilização de abordagens polifásicas para uma avaliação satisfatória das comunidades bacterianas que interagem com as plantas (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009).

Bactérias endofíticas podem ser isoladas através de meios de cultura seletivos, semi-sólidos, livres de nitrogênio e que se diferenciam devido às fontes de carbono. Por exemplo, o meio seletivo NFb, cuja fonte de carbono é o ácido málico, e o meio LGI, cuja fonte de carbono é a sacarose. Ainda, a condição de semi-sólido cria um ambiente com baixo nível de oxigênio, semelhante ao que ocorre em nichos no solo ou na planta, onde estão localizadas estas bactérias diazotróficas microaerofílicas (CARDOSO et al., 2010; KUSS, 2006).

A caracterização das colônias bacterianas baseada em morfotipos tem potencial tanto para superestimar quanto para subestimar a diversidade de espécies, e isso pode ocorrer devido variações morfológicas intraespecíficas ou pela impossibilidade de diferenciar morfologias comuns a várias espécies. Além disso, quando essa abordagem é conduzida por diferentes pesquisadores, pode não ser adequadamente padronizada. Entretanto, em estudo realizado por Watrud et al. (2006), foi encontrada grande correspondência entre os resultados obtidos por essa técnica e técnicas de taxonomia clássica e molecular (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição associado à Reação em Cadeia da Polimerase; PCR-RFLP), suportando a ideia de que a classificação baseada na morfotipagem de colônias bacterianas pode ser utilizada como um método inicial viável de caracterização microbiana. Conclusão esta corroborada por Cottyn et al. (2009), que cita o fato da análise de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (FAME) não ter sido conclusiva na diferenciação de espécies da família Enterobacteriaceae, ao passo que puderam ser diferenciadas em grupos morfotípicos de acordo com os diferentes atributos das colônias. Porém, ao contrário do estudo anterior, o autor destaca que o número de perfis genéticos (obtidos por BOX-PCR) diferenciados entre isolados pertencentes a um mesmo grupo morfotípico indica que isolados fenotipicamente similares podem diferir em termos de perfil genético de uma amostra para outra.

A análise de sequências do gene 16S rRNA tem sido uma abordagem amplamente utilizada em ecologia microbiana, uma vez que permite estudos em vários níveis taxonômicos (LEMOS et al., 2011), sendo uma das principais aplicações desse gene a identificação de bactérias cultiváveis (TRIVEDI; SPANN; WANG, 2011).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar, através de métodos dependentes de cultivo, a ocorrência de bactérias endofíticas em colmos e folhas de duas amostras das variedades “RG 121” e “RG 900” de arroz irrigado, num sistema de cultivo convencional. Mais especificamente, buscou-se: (i) classificar em morfotipos as bactérias endofíticas cultiváveis oriundas de colmos e folhas das variedades em estudo; e (ii) comparar a composição, a riqueza e a abundância morfotípica de bactérias endofíticas cultiváveis entre colmos e folhas e entre as variedades.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

Foram coletadas plantas de arroz de duas variedades (Tabela 1), na Estação Experimental do Arroz, do Instituto Rio Grandense do Arroz (EEA-IRGA; 29° 56' 77", S; 51° 07' 95", W), Cachoeirinha/RS (Figura 1), no ano agrícola 2012/2013, durante a fase



reprodutiva da cultura (períodos R6 e R9). De cada variedade, foram coletadas duas amostras, as quais foram individualmente acondicionadas em sacos plásticos e devidamente identificadas até seu encaminhamento para o Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da UNISINOS.

**Tabela 1.** Características das duas variedades de arroz irrigado coletadas na Estação Experimental do Arroz, do Instituto Rio Grandense do Arroz (EEA-IRGA), Cachoeirinha/RS, no ano agrícola 2012/2013, as quais foram utilizadas nesta pesquisa.

<b>VARIEDADE “RG 121”</b>	<b>VARIEDADE “RG 900”</b>
Pilosa;	Pilosa;
Arista ausente;	Arista presente;
Grão de comprimento médio;	Grão de comprimento médio;
Cor do ápulo amarela;	Cor do ápulo amarela;
Introdução de material genético do CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical - Colômbia), nominada no banco de germoplasma como CT-9038-5-5C-17C-2C-4C-M.	Introdução de material genético do IRRI (Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz - Filipinas), nominada no banco de germoplasma como IR-72158-11-5-2-3;
	Larga.

Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 1.** No detalhe, Estação Experimental do Arroz, do Instituto Rio Grandense do Arroz (EEA-IRGA; 29° 56' 77", S; 51° 07' 95", W), área de coleta das plantas de arroz, no município de Cachoeirinha/RS.



Fonte: GOOGLE EARTH, versão 6.1.0.5001 (2013).

Os processos de desinfecção superficial das amostras, isolamento e cultivo das bactérias endofíticas seguiram metodologia descrita por Döbereiner; Baldani; Baldani (1995).

Colmos e folhas de arroz, na quantidade de 10 g cada, foram lavados em água corrente para retirada de partículas de solo aderidas, secos em papel-toalha e desinfetados superficialmente com etanol 70 %. Logo após, foram triturados (em moedor de facas) com 90 mL de solução salina (ANEXO A-1) por um a dois minutos, quando foram feitas as diluições seriadas das amostras ( $10^{-2}$  a  $10^{-7}$ ). De cada uma das diluições, alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas, em triplicata, em tubos de vidro contendo 5 mL de meios de cultura semi-sólidos, livres de nitrogênio (ANEXOS A-2, A-3 e A-4, respectivamente): NFb (*Azospirillum brasilense*/*A. lipoferum*), JNFb (*Herbaspirillum seropedicae*/*H. rubrisubalbicans*) e LGI-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*). Os tubos contendo os meios NFb e JNFb foram incubados a 35 °C por quatro a sete dias, enquanto que aqueles contendo o meio LGI-P foram incubados a 30 °C durante sete a 10 dias. Após essa etapa, foi realizada a quantificação das bactérias pelo método do Número Mais Provável (NMP), baseado na presença ou ausência de uma película formada no meio semi-sólido, conforme apresentado na tabela de McCrady. Quando a película fina atingiu a superfície dos meios, transferiu-se, com alça de platina, uma quantidade da cultura para novos meios semi-sólidos, tendo sido os tubos incubados nas

mesmas condições anteriormente citadas até a formação de um novo véu. Após, as culturas foram riscadas em placas contendo os meios seletivos sólidos (ANEXOS A-2, A-3 e A-4) acrescidos de 20 mg L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, as quais foram incubadas por três a cinco dias a 35 °C para NFb e JNFb, e a 30 °C por uma semana para LGI-P. Para purificação final, as colônias que cresceram nos meios sólidos NFb e JNFb foram transferidas, com o auxílio de palitos estéreis, para respectivos novos meios semi-sólidos, os quais foram incubados por sete dias a 35 °C. Após a formação do véu, fez-se novamente a semeadura por esgotamento de uma quantidade da cultura, desta vez em placas de meio Batata sólido (ANEXO A-5), as quais foram incubadas a 35 °C durante sete dias. Já para o meio LGI-P, a purificação das colônias foi feita diretamente do meio seletivo sólido para placas de meio Batata-P sólido (ANEXO A-6), com incubação de sete a 10 dias, a 30 °C.

Após esse período, as características morfológicas das colônias crescidas nos meios Batata e Batata-P sólidos foram analisadas conforme métodos internacionais de classificação bacteriana, contidos em “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*” (HOLT et al., 1994), de modo que os seguintes atributos foram avaliados: tamanho (grande, média, pequena), forma (circular, irregular, rizoide, filamentosa, puntiforme), elevação (côncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada, convexa), bordos (lisa, lacerada, lobada, filamentosa, ondulada), estrutura (lisa, granulosa, filamentosa, rugosa), brilho (transparente, translúcida, opaca), cor (incolor, pigmentada), e aspecto (viscosa, úmida, membranosa, leitosa, seca).

Além disso, foi realizado o método de coloração diferencial de Gram (MELO; AZEVEDO, 1998) com esfregaços obtidos a partir de colônias axênicas dos meios Batata e Batata-P sólidos. A análise de dados e os registros foram efetuados pelo sistema de microscopia de contraste interferencial de fase Zeiss.

A identificação dos microrganismos endofíticos foi determinada com base na análise das sequências do gene 16S rRNA. Para tanto, primeiramente foi feita extração de DNA das colônias bacterianas cultivadas. As colônias obtidas nos meios Batata e Batata-P sólidos foram individualmente transferidas, com auxílio de uma alça de platina, para tubos de vidro contendo 4 mL de caldo Luria-Bertani (MILLER, 1972; ANEXO A-9). Após 48 horas de incubação a 35 °C (para colônias provenientes dos meios Batata sólidos) e 30 °C (para colônias provenientes dos meios Batata-P sólidos), o crescimento bacteriano foi dividido entre dois microtubos com capacidade para 1,5 mL cada. Em seguida, os mesmos foram submetidos à centrifugação a 12000 rotações por minuto (RPM) durante um minuto. O sobrenadante foi, então, descartado e os *pellets* reunidos em um único microtubo, ao qual

foram adicionados 750  $\mu\text{L}$  de solução de lise I (ANEXO A-10). O mesmo foi homogeneizado em vórtex a 40 Hertz (Hz) por cinco minutos e, após centrifugação por 10 minutos a 12000 RPM, o *pellet* foi ressuspensionado em 100  $\mu\text{L}$  de solução de lise II (ANEXO A-11). Em seguida, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10 % e 2,5  $\mu\text{L}$  de proteinase-K (20 mg/mL). Essa solução foi incubada a 37 °C por 15 minutos, e a 60 °C durante 15 minutos. Após, foram acrescentados 67,5  $\mu\text{L}$  de cloreto de sódio (NaCl) 5 M, sendo essa solução submetida à centrifugação a 12000 RPM por 20 minutos. A fase superior foi recuperada e transferida para novos microtubos, onde foram adicionadas duas vezes o volume de isopropanol absoluto a -20 °C. Posteriormente, as amostras foram incubadas a -20 °C, onde permaneceram *overnight*. No dia seguinte, foram centrifugadas a 12000 RPM por 30 minutos. Por fim, o *pellet* foi lavado com 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % a -20 °C, sendo novamente centrifugado a 12000 RPM por 30 minutos e ressuspensionado em 15  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e 1  $\mu\text{L}$  de RNase (10 mg/mL), sendo ainda incubado a 37 °C durante 60 minutos.

Os produtos de extração (3  $\mu\text{L}$ ) foram avaliados após eletroforese em gel de agarose (1 %). De modo que foi realizada a migração durante 30 minutos a 90 V, em tampão Tris-Borato-Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA; TBE) 1 X, e coloração com brometo de etídeo. Ainda, a foto-documentação ocorreu com o auxílio de transluminador ultravioleta (Kodak<sup>®</sup> *Electrophoresis Documentation and Analysis System* - 120), e do programa ID *Digital Science*, versão 2.0.3 (Kodak<sup>®</sup> *Scientific Imaging Systems*).

A amplificação dos produtos de extração (100-500 ng/ $\mu\text{L}$ ) foi conduzida utilizando os *primers* universais PRBA338f e PRUN518r (*Eurofins MWG Operon*; Tabela 2), os quais amplificam um fragmento de 236 pares de bases. O mix de PCR usado para amplificação do gene 16S rRNA continha: 100 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP; Ludwig Biotecnologia LTDA), 50 mM de cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ; *Gibco/BrI<sup>®</sup>, Life Technologies, Inc.*), 20  $\mu\text{M}$  de cada *primer*, 500 U de TAQ-polimerase (Ludwig Biotecnologia LTDA) em tampão 10 X (Ludwig Biotecnologia LTDA), 1  $\mu\text{L}$  da amostra, e água Milli-Q estéril para um volume final de 25  $\mu\text{L}$ . As reações de amplificação foram conduzidas utilizando o termociclador *Mastercycler<sup>®</sup> Personal* (Eppendorf) nas seguintes condições: 92 °C por dois minutos para desnaturação inicial, seguida por 35 ciclos de 92 °C por um minuto para desnaturação, 57 °C por 30 segundos para anelamento dos *primers*, 72 °C por um minuto para extensão, com uma extensão final de 72 °C por seis minutos (OVREAS et al., 1997). Os produtos da PCR (5  $\mu\text{L}$ ) foram avaliados após eletroforese em gel de agarose (1 %), sendo a migração, coloração e foto-documentação realizadas da mesma forma que na

extração de DNA. Como marcador de peso molecular, foi utilizado o 100-bp DNA *ladder* (Promega).

**Tabela 2.** Sequências dos *primers* utilizados nos experimentos de PCR

<b>PRIMER</b>	<b>ALVO</b>	<b>SEQUÊNCIA (5' → 3')</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
*			
PRBA338f	Bactéria, região V3	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	OVREAS et al., 1997
PRUN518r	Universal, região V3	ATTACCGCGGCTGCTGG	OVREAS et al., 1997

\* f, *forward primer*; r, *reverse primer*.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os fragmentos foram enviados para sequenciamento no *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*, na ACTGene Análises Moleculares (Ludwig Biotecnologia LTDA), Porto Alegre/RS. As sequências foram comparadas com um banco de sequências de DNA bacteriano, disponível na base de dados GenBank, utilizando o *software Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) dos Estados Unidos da América (EUA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a fim de inferir suas relações filogenéticas.

Os dados experimentais relativos ao método do NMP foram submetidos a Testes-*t* de Student (nível de significância de 5 %), com uso dos procedimentos disponíveis no pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2013) do *software R*, versão 3.0.2 (2013).

Os isolados bacterianos obtidos foram agrupados em dendrograma de similaridade pelo método *Complete Linkage* e Distância Euclidiana (EVERITT, 1993), por meio do programa SPSS 17.0.0 (2008), de acordo com os valores atribuídos as suas características morfológicas. A partir disso, o padrão de distribuição dos morfotipos entre oito condições foi avaliado por Análise de Correspondência Destendenciada (DCA; JONGMAN; TER BRAAK; VAN TONGEREN, 1995; LEGENDRE; LEGENDRE, 1998; MANLY, 1994). As oito condições foram: C1 = amostra (planta) 1, variedade “RG 121”, colmos; C2 = amostra 1, variedade “RG 121”, folhas; C3 = amostra 1, variedade “RG 900”, colmos; C4 = amostra 1, variedade “RG 900”, folhas; C5 = amostra (planta) 2, variedade “RG 121”, colmos; C6 = amostra 2, variedade “RG 121”, folhas; C7 = amostra 2, variedade “RG 900”, colmos; C8 = amostra 2, variedade “RG 900”, folhas. O programa PC-ORD 4.0 (MCCUNE; MEFFORD, 1999) foi utilizado para realizar a DCA. Além disso, para se obter uma visão mais detalhada da similaridade entre as condições, resultante das diferenças na distribuição dos morfotipos

em função destas, foi feita uma segunda análise de agrupamento, nos mesmos moldes da anterior.

Ainda, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA; PEARSON, 1901), utilizando o pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2013) do *software* R, versão 3.0.2 (2013). O objetivo dessa análise é estabelecer uma combinação de variáveis originais para descrever as tendências observadas na matriz original de dados, ou seja, para este estudo especificamente, estabelecer quais morfotipos melhor explicam as diferenças observadas entre as condições. Assim, a matriz para a Análise de Componentes Principais foi construída usando os dados de presença e ausência dos morfotipos para as oito condições analisadas. Como critério para extração de componentes principais, foi construído, também pelo pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2013) do *software* R (2013), um gráfico do tipo *scree plot*, que ilustra como a variabilidade dos dados está distribuída entre os eixos da ordenação, permitindo identificar o número de eixos mais significativos.

Finalmente, em função do número de isolados obtidos por grupo fenotípico, pôde-se calcular o índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ; SHANNON; WEAVER, 1949), que relaciona a riqueza e uniformidade de espécies (morfotipos) para cada área (condição) em estudo (ODUM, 1983). Além disso, utilizando o programa PAST, versão 2.17c (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001), foram aplicados os métodos de *bootstrapping* e permutação par-a-par aos índices de diversidade de Shannon obtidos para as oito condições, de modo a avaliar possíveis diferenças significativas entre as mesmas (EFRON, 1979).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estimativa de abundância de bactérias endofíticas, através do método do Número Mais Provável (NMP; DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995), corresponde à média dos valores encontrados nas amostras (plantas) representantes das duas variedades de arroz irrigado, para cada estrutura vegetal (colmos e folhas) e meio seletivo (NFb, JNFb e LGI-P), e pode ser observada na Tabela 3. Para os grupos bacterianos em estudo, os valores são obtidos com base na presença ou ausência de uma película em forma de véu próxima à superfície dos meios de cultura semi-sólidos, livres de nitrogênio (Figura 2).

**Tabela 3.** Estimativa de abundância de bactérias endofíticas em *Oryza sativa* L., no ano agrícola 2012/2013, na Estação Experimental do Arroz, do Instituto Rio Grandense do Arroz (EEA-IRGA), em Cachoeirinha/RS. Bactérias cultivadas em meio NFb (*Azospirillum brasilense/A. lipoferum*), JNFb (*Herbaspirillum seropedicae/H. rubrisubalbicans*) e LGI-P (*Gluconacetobacter diazotrophicus*; ANEXOS A-2, A-3 e A-4, respectivamente), e quantificadas pelo método do Número Mais Provável (NMP; DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

VARIEDADE	COLMO			FOLHA		
	NFb	JNFb	LGI-P	NFb	JNFb	LGI-P
	----- NMP x 10 <sup>6</sup> bactérias g <sup>-1</sup> de matéria fresca -----					
Variedade “RG 121”	82,5a *	140a	70,55a	140a	140a	140a
Variedade “RG 900”	140a	140a	92,5a	140a	140a	70,55a

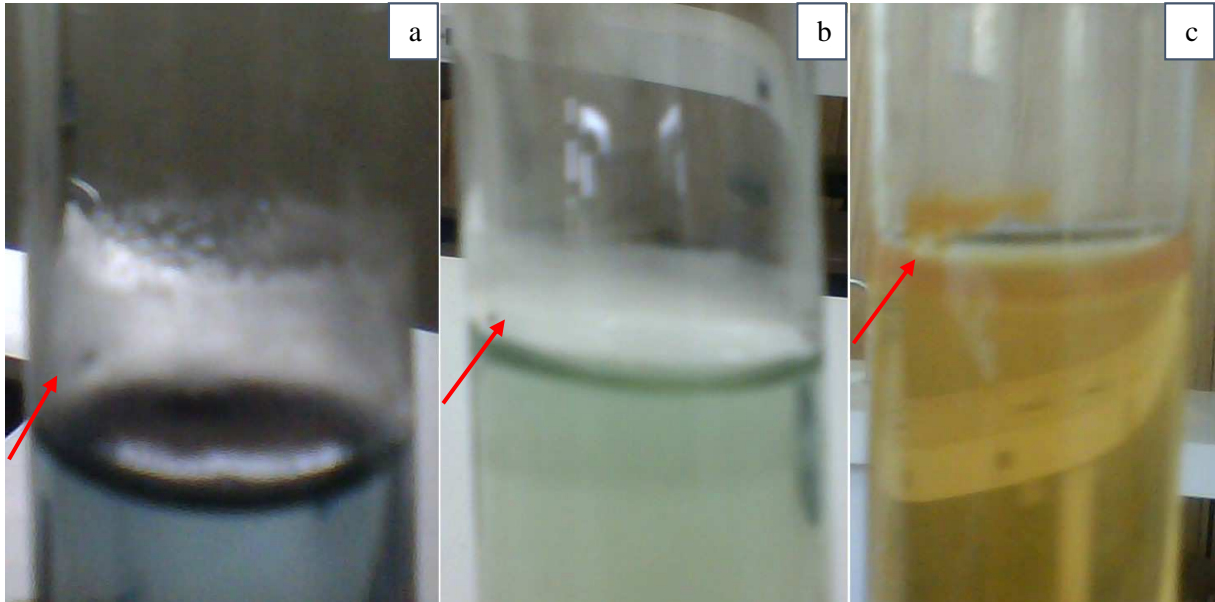
\* Médias seguidas por letras iguais em variedades diferentes, dentro do mesmo meio seletivo e estrutura vegetal (colmos e folhas), não diferem estatisticamente entre si. Fonte: Elaborada pela autora.

Entre as populações de bactérias endofíticas presentes nos colmos das amostras da variedade “RG 121”, verificou-se que a maior população foi detectada em meio JNFb (para *Herbaspirillum seropedicae/H. rubrisubalbicans*) e a menor em meio LGI-P (para *Gluconacetobacter diazotrophicus*). O meio NFb (para *Azospirillum brasilense/A. lipoferum*) apresentou um valor populacional intermediário. Com relação às folhas dessa variedade, os três meios de isolamento apresentaram o mesmo valor populacional, superior àqueles encontrados nos colmos, para os meios NFb e LGI-P, e idêntico para o meio JNFb. No que diz respeito à variedade “RG 900”, no meio LGI-P, tanto para colmos quanto para folhas, foi detectada a menor população entre os três meios, sendo que, para os meios NFb e JNFb, foi encontrado o mesmo valor populacional tanto nos colmos como nas folhas. Ainda, para o meio LGI-P, o valor populacional registrado nas folhas foi menor do que aquele registrado nos colmos.

Com relação aos resultados dos Testes-*t* de Student ( $p \leq 0,05$ ), as populações de bactérias crescidas em meio NFb, relacionadas a *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*, não diferiram estatisticamente entre si nos colmos das variedades em estudo ( $t = -1$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,4226$ ). Resultado encontrado também para as populações relacionadas a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, crescidas em meio LGI-P e relativas aos colmos ( $t = -0,2609$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,8186$ ) e às folhas ( $t = 1$ ,  $df = 2$ ,  $p = 0,4226$ ) das variedades comparadas (Tabela 3).



**Figura 2.** Crescimento de bactérias endofíticas, aplicado na estimativa de abundância pelo método do Número Mais Provável (NMP; DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995), de amostra da variedade “RG 121”. As bactérias foram crescidas em meios semi-sólidos, livres de nitrogênio (ANEXOS A-2, A-3 e A-4, respectivamente): (a) NFb (folhas, diluição  $10^{-3}$ ); (b) JNFb (colmos, diluição  $10^{-2}$ ); e (c) LGI-P (colmos, diluição  $10^{-2}$ ).



Fonte: Elaborada pela autora.

De um modo geral, os valores de abundância de bactérias endofíticas podem estar relacionados a fatores como: (i) o estágio fenológico das plantas ou o sistema de cultivo utilizado, de modo que as populações endofíticas podem variar em termos de composição, riqueza e abundância no decorrer do crescimento vegetal (MANO et al., 2006; MANO et al., 2007; OKUNISHI et al., 2005) ou de acordo com as práticas culturais adotadas (SILVA et al., 2013; SOARES et al., 2006); (ii) as diferentes vias de disseminação das bactérias para o interior dos tecidos vegetais, isto é, a capacidade e o modo de colonização endofítica (KAGA et al., 2009); (iii) a composição química do solo (BENEDUZI et al., 2008; TANTAWY, 2009), por exemplo, altos teores de matéria orgânica parecem fornecer proteção da ação de fatores fisiológicos do solo a certas espécies bacterianas (JIMENEZ-SALGADO et al., 1997), bem como a competição por nutrientes com outros microrganismos no ambiente rizosférico (BACILIO-JIMÉNEZ et al., 2001); e ainda (iv) as espécies de bactéria avaliadas, já que no presente estudo buscou-se isolar grupos específicos de bactérias que podem ocorrer em alta frequência nas variedades analisadas, não havendo assim grupos dominantes. Contudo, para confirmar ou refutar a hipótese aqui levantada, de que não há diferenças significativas nos valores de abundância de bactérias endofíticas encontrados a partir dos três meios de

isolamento, igualmente para colmos e folhas de ambas as variedades, um maior esforço amostral em campo, ou seja, ampliar o número de amostras (plantas), faz-se necessário.

Ao final dos processos de isolamento e cultivo das bactérias endofíticas, foram obtidos 190 isolados bacterianos. Quanto às percentagens, 75 isolados (39,5 %) originaram-se do meio NFb, 61 (32,1 %) do meio JNFb e 54 (28,4 %) do meio LGI-P, sendo que destes, 87 (45,8 %) habitavam os colmos e 103 (54,2 %) as folhas. Observou-se também que as diferentes variedades não revelaram afinidade por grupos específicos de bactérias endofíticas, apesar dos isolados em meio NFb (*A. brasilense/A. lipoferum*) merecerem destaque por terem representado valores percentuais de 40,4 % (colmos = 33,3 %, folhas = 66,7 %) do total das bactérias endofíticas encontradas na variedade “RG 121”, enquanto que os isolados provenientes dos meios JNFb (*H. seropedicae/H. rubrisubalbicans*) e LGI-P (*G. diazotrophicus*) corresponderam, respectivamente, a 33,7 % (colmos = 40 %, folhas = 60 %) e 25,9 % (colmos = 51,9 %, folhas = 48,1 %) do total de endofíticas presentes nessa variedade. No que se refere à variedade “RG 900”, a distribuição dos isolados nos três meios seletivos foi similar à da outra variedade em estudo, isto é, havendo maior concentração em NFb (38,4 %, sendo 54,5 % dos colmos e 45,5 % das folhas), seguido por LGI-P (31,4 %, sendo 44,4 % dos colmos e 55,6 % das folhas), e então JNFb (30,2 %, sendo 57,7 % dos colmos e 42,3 % das folhas).

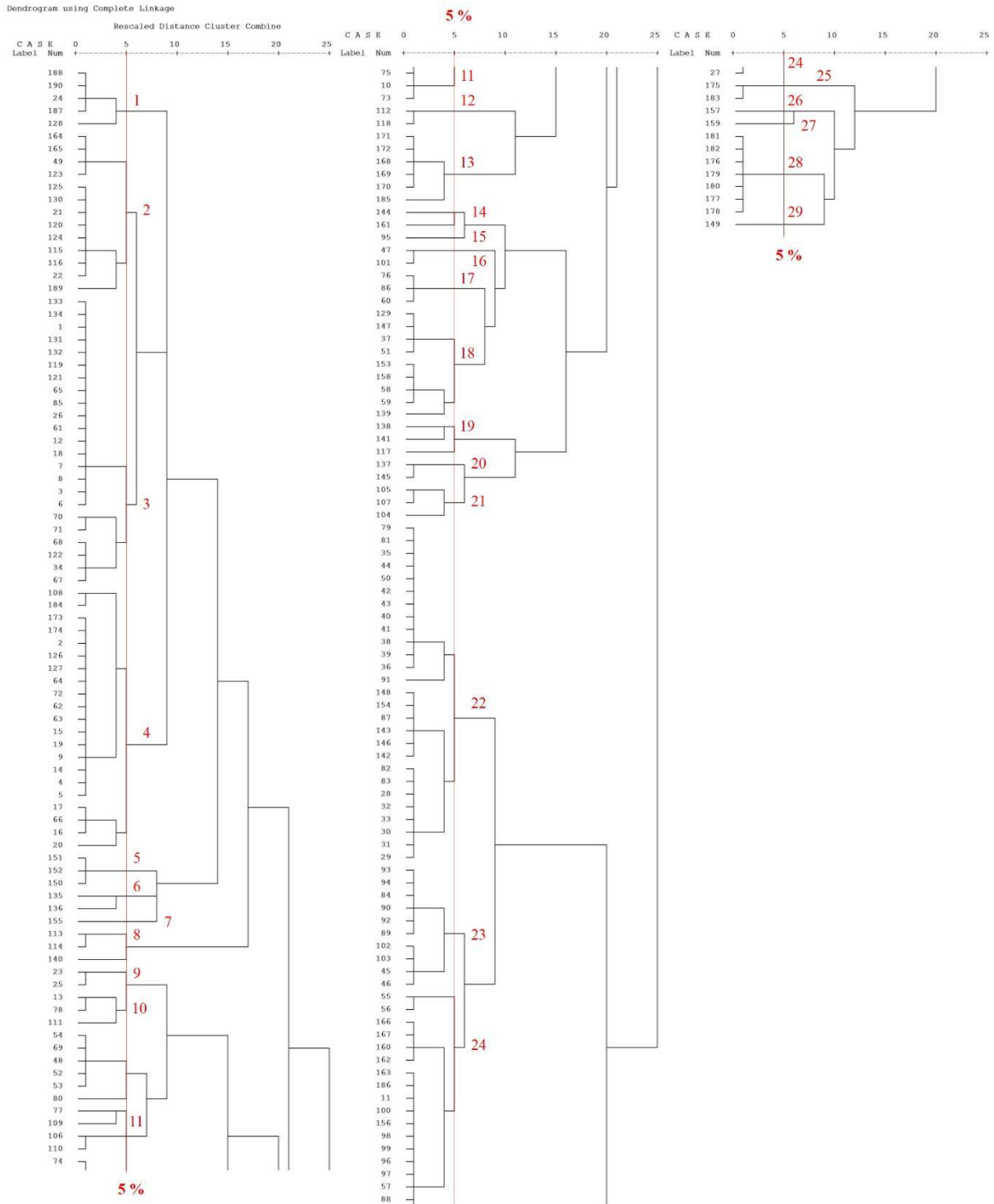
Conforme a análise de agrupamento, considerando até 5 % de divergência, os isolados reuniram-se, de acordo com suas características fenotípicas (Figura 3), em 29 morfotipos (Figura 4).

**Figura 3.** Bactérias endofíticas crescidas nos meios Batata e Batata-P sólidos (ANEXOS A-5 e A-6, respectivamente) e caracterizadas morfológicamente, representadas nas amostras: (a) variedade “RG 121”, NFb, colmos, diluição  $10^{-2}$ ; (b) variedade “RG 900”, JNFb, colmos, diluição  $10^{-4}$ ; (c) variedade “RG 121”, LGI-P, colmos, diluição  $10^{-3}$ ; (d) variedade “RG 900”, NFb, folhas, diluição  $10^{-5}$ ; (e) variedade “RG 900”, JNFb, folhas, diluição  $10^{-5}$ ; e (f) variedade “RG 900”, LGI-P, folhas, diluição  $10^{-3}$ .



Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 4.** Dendrograma de similaridade considerando as características fenotípicas culturais (tamanho, forma, elevação, bordos, estrutura, brilho, cor e aspecto das colônias) dos 190 isolados de bactérias endofíticas das variedades “RG 121” e “RG 900”, no ano agrícola 2012/2013. Método de análise de agrupamento: *Complete Linkage* e Distância Euclidiana (EVERITT, 1993), por meio do programa SPSS 17.0.0 (2008).



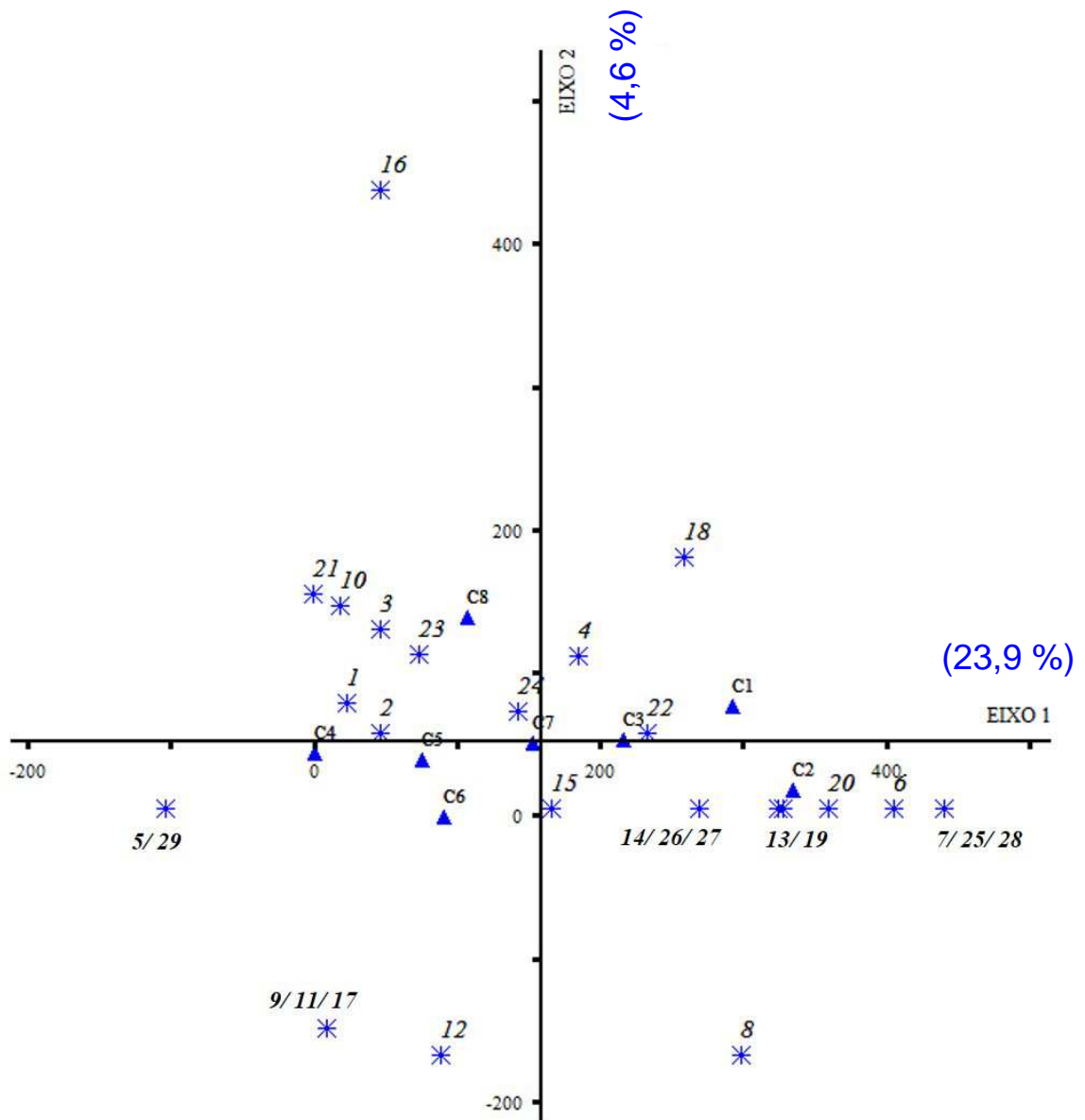
Fonte: Elaborada pela autora.

A Análise de Correspondência Destendenciada (DCA; Figura 5) mostrou estruturação dos grupos, isto é, das oito condições avaliadas, semelhante àquela detectada pela segunda análise de agrupamento (Figura 6), com exceção das posições relativas às condições 1 e 4 (mais similares pela segunda análise do que pela primeira). Entretanto, a variação observada pode ser considerada aceitável por tratarem-se de análises baseadas em métodos de distância diferentes: a DCA utiliza o método da Média Recíproca (RA) ou Análise de Correspondência (CA), enquanto a análise de agrupamento, para este caso, foi feita pelo método da distância euclidiana. Os dois primeiros eixos explicaram 28,5 % da variância total do conjunto de dados - 23,9 % de explicação somente pelo eixo 1.

As condições 7 e 8 mostraram-se as mais correlacionadas em termos dos morfotipos a elas associados, seguidas pelas condições 5 e 6, possivelmente por serem relativas à mesma variedade (“RG 900” e “RG 121”, respectivamente). Além disso, as condições 5 e 6 estiveram menos correlacionadas com as demais no que se refere à ocorrência dos morfotipos, alcançando 25 % de divergência. É interessante notar que as condições 1 e 4 apresentaram maior semelhança entre si, depois maior semelhança com 3, então com 7 e 8, e por último com 2. O que quer dizer que os morfotipos que ocorreram nos colmos de uma variedade (“RG 121”, condição 1) também puderam ser observados nas folhas da outra (“RG 900”, condição 4), e que morfotipos encontrados em uma das amostras (amostra 1, condições 1 e 4) também foram registrados na outra (amostra 2, condições 7 e 8). Assim, pôde-se inferir que o padrão de distribuição dos morfotipos em função das oito condições, encontrado para o presente estudo, esteve mais relacionado à amostra (planta) e à variedade, do que à estrutura vegetal (colmos e folhas).

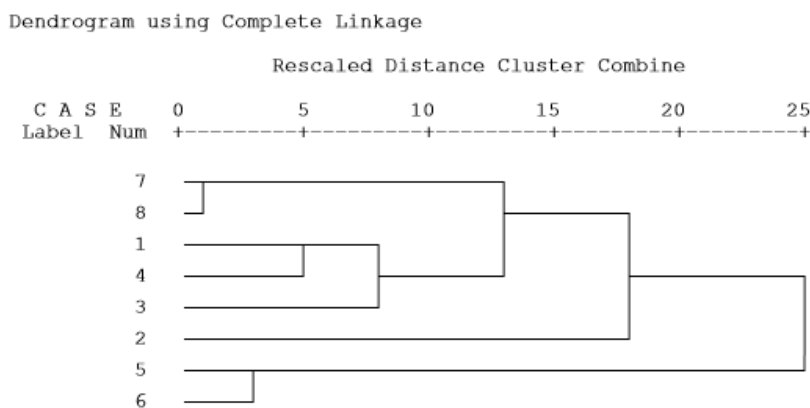
Por fim, vale ressaltar que, no gráfico da DCA, os morfotipos mais próximos de cada condição são mais representativos das mesmas. Deste modo, na tentativa de identificar quais morfotipos foram mais importantes para explicar as diferenças encontradas entre as condições, e quanto dessa variação pode ser explicada por eles, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA).

**Figura 5.** Diagrama de ordenação para os primeiros dois eixos da Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) para dados dos 29 morfotipos distribuídos em oito condições. C1 = amostra (planta) 1, variedade “RG 121”, colmos; C2 = amostra 1, variedade “RG 121”, folhas; C3 = amostra 1, variedade “RG 900”, colmos; C4 = amostra 1, variedade “RG 900”, folhas; C5 = amostra (planta) 2, variedade “RG 121”, colmos; C6 = amostra 2, variedade “RG 121”, folhas; C7 = amostra 2, variedade “RG 900”, colmos; C8 = amostra 2, variedade “RG 900”, folhas. DCA realizada no programa PC-ORD 4.0 (MCCUNE; MEFFORD, 1999).



Fonte: Elaborada pela autora.

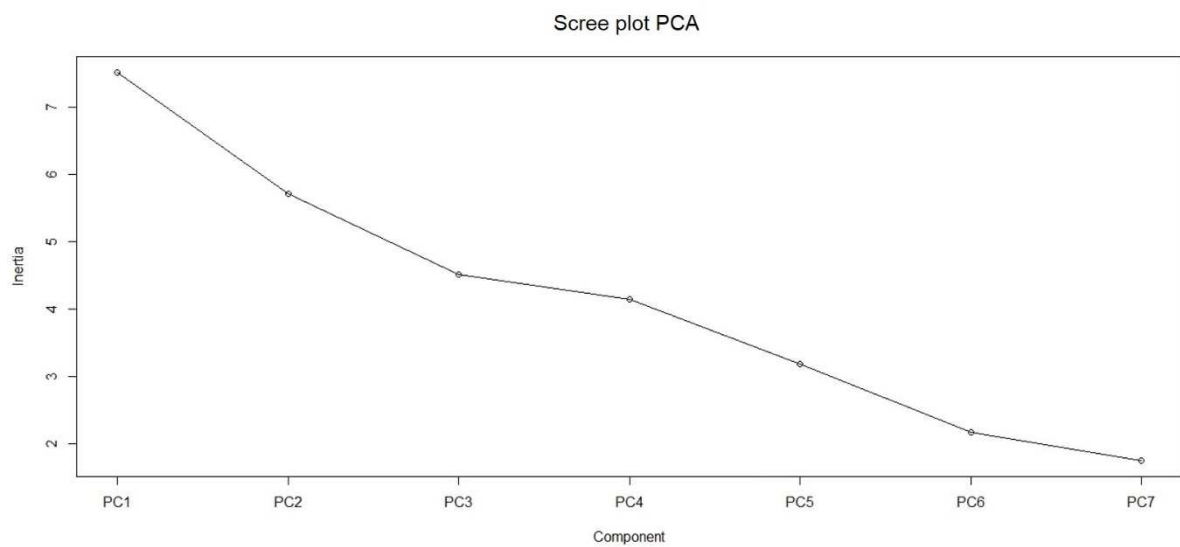
**Figura 6.** Dendrograma de similaridade entre as oito condições baseado na distribuição dos 29 morfotipos. C1 = amostra (planta) 1, variedade “RG 121”, colmos; C2 = amostra 1, variedade “RG 121”, folhas; C3 = amostra 1, variedade “RG 900”, colmos; C4 = amostra 1, variedade “RG 900”, folhas; C5 = amostra (planta) 2, variedade “RG 121”, colmos; C6 = amostra 2, variedade “RG 121”, folhas; C7 = amostra 2, variedade “RG 900”, colmos; C8 = amostra 2, variedade “RG 900”, folhas. Método de análise de agrupamento: *Complete Linkage* e Distância Euclidiana (EVERITT, 1993), por meio do programa SPSS 17.0.0 (2008).



Fonte: Elaborada pela autora.

A partir do gráfico *scree plot* (Figura 7), é possível constatar que o percentual de variação explicada mantém-se elevado ao longo dos componentes, o que sugere que vários componentes seriam necessários para resumir os dados. A proporção de explicação acumulada alcança 100 % quando incorporado o autovetor 7, que tem autovalor igual a 1,75 e explica 6 % da variância do conjunto de dados. Ainda com relação aos autovalores, os eixos 1 e 2 têm uma proporção de explicação acumulada correspondente a 45,61 %, sendo o eixo 1 responsável por 25,91 % destes (Figura 8).

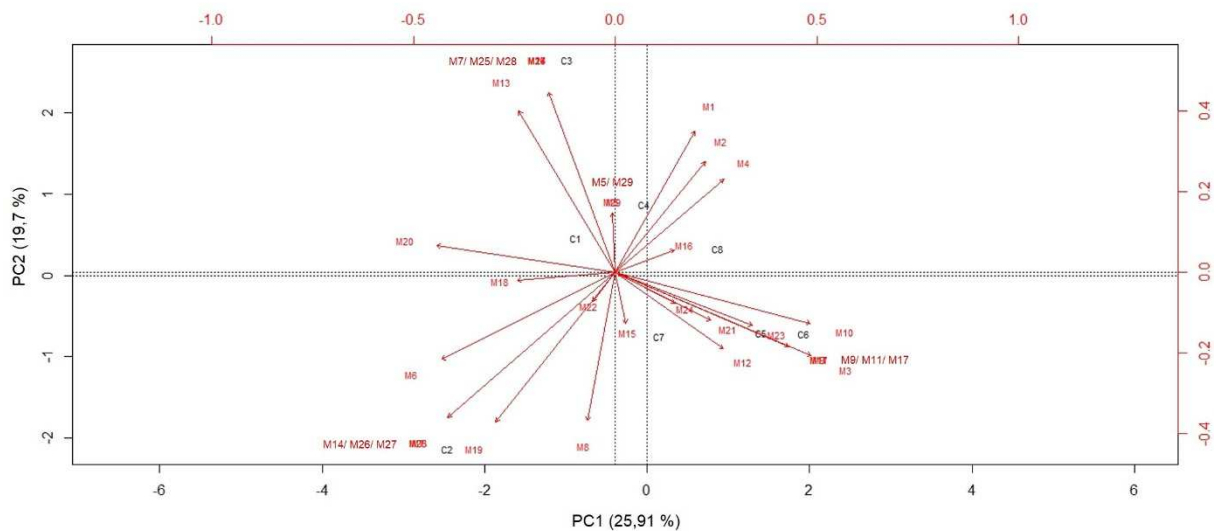
**Figura 7.** Representação *scree plot* dos dados da Análise de Componentes Principais (PCA) dos 29 morfotipos distribuídos em oito condições. C1 = amostra (planta) 1, variedade “RG 121”, colmos; C2 = amostra 1, variedade “RG 121”, folhas; C3 = amostra 1, variedade “RG 900”, colmos; C4 = amostra 1, variedade “RG 900”, folhas; C5 = amostra (planta) 2, variedade “RG 121”, colmos; C6 = amostra 2, variedade “RG 121”, folhas; C7 = amostra 2, variedade “RG 900”, colmos; C8 = amostra 2, variedade “RG 900”, folhas. Esse tipo de gráfico ilustra como a variabilidade dos dados (Eixo Y) está distribuída entre os eixos da ordenação (Eixo X), permitindo identificar o número de eixos mais significativos. *Scree plot* construído através do pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2013) do *software* R, versão 3.0.2 (2013).



Fonte: Elaborada pela autora.



**Figura 8.** Diagrama de ordenação para os primeiros dois eixos da Análise de Componentes Principais (PCA) para dados dos 29 morfotipos distribuídos em oito condições. C1 = amostra (planta) 1, variedade “RG 121”, colmos; C2 = amostra 1, variedade “RG 121”, folhas; C3 = amostra 1, variedade “RG 900”, colmos; C4 = amostra 1, variedade “RG 900”, folhas; C5 = amostra (planta) 2, variedade “RG 121”, colmos; C6 = amostra 2, variedade “RG 121”, folhas; C7 = amostra 2, variedade “RG 900”, colmos; C8 = amostra 2, variedade “RG 900”, folhas. PCA realizada por meio do pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2013) do *software* R, versão 3.0.2 (2013).



Fonte: Elaborada pela autora.

No que se refere ao peso das variáveis, ou seja, à importância de cada variável para o valor de variância de cada autovetor (Figura 8), os morfotipos 3, 10, 9, 11, 17 e 23 apresentaram correlação positiva forte tanto com o eixo 1, quanto entre si, enquanto os morfotipos 7, 25 e 28 estiveram forte e positivamente correlacionados entre si, mas apresentaram uma forte correlação negativa com o primeiro grupo de variáveis citado e, juntamente com os morfotipos 20 e 6, com o eixo 1. As variáveis mais forte e positivamente correlacionadas ao segundo eixo foram os morfotipos 14, 26, 27, 13 e 1, sendo 14, 26, 27 correlacionados forte e positivamente entre si, positivamente correlacionados ao morfotipo 13, porém forte e negativamente correlacionados ao morfotipo 1. Já os morfotipos 19, 8, 7, 25 e 28 estiveram negativa e fortemente correlacionados ao componente 2, sendo 7, 25 e 28 positivamente correlacionados aos morfotipos 19 e 8, além de forte e positivamente correlacionados entre si, conforme já citado. O morfotipo 19, por sua vez, exibiu uma forte correlação negativa com o morfotipo 1, sendo tanto ele, quanto o morfotipo 8, positivamente

correlacionados ao morfotipo 13. Além disso, como grande parte da variação no conjunto de dados não pôde ser explicada somente pelos dois primeiros componentes, cabe destacar que os morfotipos 2, 22 e 23 apresentaram forte correlação positiva com o eixo 3 (proporção de explicação igual a 15,57 %), os morfotipos 5 e 29 com o eixo 4 (proporção de explicação igual a 14,3 %) e o morfotipo 16 com o eixo 6 (proporção de explicação igual a 7,5 %). Por outro lado, o morfotipo 22 esteve forte e negativamente correlacionado ao eixo 4, enquanto o mesmo ocorreu para o morfotipo 18 com o eixo 5 (proporção de explicação igual a 10,99 %).

Considerando a dispersão das condições nos componentes 1 e 2 da PCA em função dos morfotipos (Figura 8), foi possível observar um gradiente da direita para a esquerda, começando com um grupo formado pelas condições 5 e 6, que apresentaram-se mais correlacionadas com os morfotipos 3, 10, 9, 11, 17 e 23, e menos correlacionadas com os morfotipos 7, 25 e 28. Um segundo grupo de condições semelhantes (1, 4, 7 e 8) mostrou correlação intermediária com quase todas as variáveis (morfotipos), de modo que não se distribuíram de acordo com a contribuição das variáveis para os eixos 1 e 2. Na parte superior esquerda, formou-se um terceiro grupo, dotado exclusivamente da condição 3, a qual apresentou forte correlação com os morfotipos 7, 25, 28 e 13 e, conseqüentemente, esteve menos correlacionada com os morfotipos 3, 10, 9, 11, 17 e 23. Já na porção inferior esquerda do gráfico, observou-se a maior correlação da condição 2 com os morfotipos 14, 26, 27, 6, 19 e 8, sendo ela menor com o morfotipo 1.

A Análise de Componentes Principais também permite verificar algumas tendências quanto à influência das variáveis (morfotipos) na distribuição dos pontos (condições): por exemplo no eixo 1, os pontos tiveram sua distribuição associada ao fator amostra (planta), ou seja, à direita do eixo estão as condições relativas à amostra 2 e, à medida que se caminha para o lado esquerdo, observa-se uma distribuição das condições relativas à amostra 1 (Figura 8).

O índice de Shannon-Weaver ( $H'$ ; SHANNON; WEAVER, 1949) é aplicado com sucesso para quantificar a diversidade, uma vez que sua formulação leva em consideração o número de componentes distintos do sistema (riqueza) e a proporção desses componentes (equitabilidade). Além disso, ele expressa a importância relativa de cada espécie e atribui um maior peso a espécies raras (ODUM, 1983, 1988; WIHLM, 1972).

O índice de Shannon também assume que os indivíduos são coletados aleatoriamente em uma população indefinidamente grande, e que todas as espécies estão representadas na amostra, sendo assim parcialmente independente do tamanho amostral (PIELOU, 1983).

No entanto, uma das críticas que se tem feito a esse índice consiste justamente no fato de que o cálculo da diversidade baseado na abundância relativa não fornece uma resposta ecológica plausível de análises posteriores (DIAS, 2004), já que a utilização de índices de diversidade muitas vezes torna-se restrita a situações comparativas, ou seja, poder inferir que a comunidade “A” é mais diversa do que a comunidade “B” (MELO, 2008).

Assim, se a diversidade tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice (URAMOTO; WALDER; ZUCCHI, 2005), é possível afirmar para o presente estudo que a condição 3, relativa aos colmos da amostra 1, variedade “RG 900”, juntamente com a condição 6, correspondente às folhas da amostra 2, variedade “RG 121”, foram as mais diversas. Em contrapartida, as condições menos diversas foram as de número 1 e 4: a primeira referente aos colmos da amostra 1, variedade “RG 121”, e a última às folhas da amostra 1, variedade “RG 900”. Esse resultado demonstra que a amostra 2 foi mais diversa em termos do número e proporção de morfotipos registrados para as condições relativas a essa planta. Valores intermediários, porém mais próximos dos valores mais altos, puderam ser observados nas condições 8 (folhas da amostra 2, variedade “RG 900”) e 2 (folhas da amostra 1, variedade “RG 121”); enquanto valores medianos mais próximos dos valores mais baixos foram registrados para C5 e C7, relativas aos colmos da amostra 2, variedade “RG 121”, e aos colmos da amostra 2, variedade “RG 900”, respectivamente. Ainda, em termos de análise comparativa, não foram detectadas diferenças mais evidentes nos valores de  $H'$  que pudessem estar relacionadas à variedade e/ou à estrutura vegetal (colmos e folhas; Tabela 4).

**Tabela 4.** Índice de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ; SHANNON; WEAVER, 1949) calculado em função do número de isolados obtidos por grupo fenotípico para cada condição analisada. C1 = amostra (planta) 1, variedade “RG 121”, colmos; C2 = amostra 1, variedade “RG 121”, folhas; C3 = amostra 1, variedade “RG 900”, colmos; C4 = amostra 1, variedade “RG 900”, folhas; C5 = amostra (planta) 2, variedade “RG 121”, colmos; C6 = amostra 2, variedade “RG 121”, folhas; C7 = amostra 2, variedade “RG 900”, colmos; C8 = amostra 2, variedade “RG 900”, folhas. Cálculos desenvolvidos através do pacote *vegan* (OKSANEN et al., 2013) do *software* R, versão 3.0.2 (2013).

Condição	$H'$
C1	1,149060
C2	2,011242
C3	2,339372
C4	1,468140
C5	1,788048
C6	2,257219
C7	1,828496
C8	2,136688

Fonte: Elaborada pela autora.

Contudo, Taylor (1978) refuta a aparente limitação dessa estimativa, em apenas ser útil como ferramenta comparativa, não passível de extrapolações, ao apontar que, quando o índice de Shannon é calculado para um determinado número de locais, os próprios índices irão se enquadrar numa distribuição normal. Tal propriedade torna possível o uso de métodos estatísticos paramétricos, como análises de variância, visando comparar locais para os quais a diversidade foi calculada. Recentemente, no entanto, a atenção tem se voltado para procedimentos de reamostragem, como *bootstrap* e *jackknife* (MAGURRAN, 2004).

Assim, os resultados dos métodos de *bootstrapping* e permutação aplicados par-a-par aos índices de diversidade de Shannon obtidos para as oito condições, de modo a avaliar possíveis diferenças significativas entre as mesmas, podem ser visualizados na Tabela 5. Primeiramente, “ $p(eq)$ ” refere-se à probabilidade de se ter diversidades iguais: quando maior do que 0,05, não há diferença significativa. Apesar dos dois métodos não fornecerem exatamente o mesmo valor para “ $p(eq)$ ”, são resultados aproximados, e que levam a uma interpretação semelhante. Do total de comparações testadas, seis foram significativas, ou seja, os valores de  $H'$  diferiram estatisticamente entre seis pares de condições avaliadas. A primeira combinação significativa foi entre as condições 1 e 2, colmos e folhas da amostra 1, respectivamente, variedade “RG 121”. Foi o único caso em que o método de *bootstrapping* forneceu um valor significativo [Boot  $p(eq)$ = 0,033], enquanto o método de permutação

forneceu um valor marginalmente significativo [Perm  $p(\text{eq})= 0,069$ ]. As condições 3 e 4, relativas, respectivamente, aos colmos e folhas da amostra 1, variedade “RG 900”, formaram a segunda combinação a exibir diferença significativa [Boot  $p(\text{eq})= 0,009$ ; Perm  $p(\text{eq})= 0,015$ ]. Em C5 (colmos da amostra 2, variedade “RG 121”) e C6 (folhas da mesma amostra e variedade) também foi possível constatar valores de H’ significativamente diferentes [Boot  $p(\text{eq})= 0,027$ ; Perm  $p(\text{eq})= 0,04$ ]. Os valores significativos de “p(q)” resultantes dessas três combinações indicam que as diferenças estiveram associadas à estrutura vegetal (colmos e folhas), pois a amostra (planta) e a variedade eram características comuns a ambas as condições comparadas. Uma outra combinação altamente significativa foi aquela entre as condições 1 e 3 [Boot  $p(\text{eq})= 0,001$ ; Perm  $p(\text{eq})= 0,002$ ], referentes aos colmos da amostra 1, porém de diferentes variedades: “RG 121” e “RG 900”, respectivamente. O que se pode concluir a partir desse dado é que a diferença significativa encontrada entre os valores de H’ pode estar relacionada à variedade, uma vez que as duas condições são relativas à amostra (planta) 1 e à mesma estrutura vegetal (colmos). O valor do índice de Shannon da condição 1 também diferiu significativamente dos valores calculados para as condições 6 [Boot  $p(\text{eq})= 0,03$ ; Perm  $p(\text{eq})= 0,033$ ] e 8 [Boot  $p(\text{eq})= 0,016$ ; Perm  $p(\text{eq})= 0,011$ ]. Nesse caso, a origem da diferença estatística observada pareceu estar ligada aos três fatores combinados: amostra (planta), estrutura vegetal (colmos e folhas) e variedade, pois a condição 1 é relativa aos colmos da amostra 1, variedade “RG 121”, e as condições 6 e 8 às folhas da amostra 2, variedade “RG 900”.

**Tabela 5.** Valores de “p(q)” resultantes dos métodos de *bootstrapping* e permutação aplicados par-a-par aos índices de diversidade de Shannon-Weaver (H'; SHANNON; WEAVER, 1949) obtidos para as oito condições, de modo a avaliar possíveis diferenças significativas entre as mesmas, utilizando o programa PAST, versão 2.17c (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001). C1 = amostra (planta) 1, variedade “RG 121”, colmos; C2 = amostra 1, variedade “RG 121”, folhas; C3 = amostra 1, variedade “RG 900”, colmos; C4 = amostra 1, variedade “RG 900”, folhas; C5 = amostra (planta) 2, variedade “RG 121”, colmos; C6 = amostra 2, variedade “RG 121”, folhas; C7 = amostra 2, variedade “RG 900”, colmos; C8 = amostra 2, variedade “RG 900”, folhas.

Combinação	Boot p(eq)	Perm p(eq)
C1xC2 *	0,033	0,069
C3xC4	0,009	0,015
C5xC6	0,027	0,04
C7xC8	0,104	0,123
C3xC7	0,123	0,178
C4xC8	0,096	0,101
C1xC3	0,001	0,002
C2xC4	0,156	0,229
C1xC6	0,03	0,033
C2xC5	0,446	0,486
C1xC8	0,016	0,011
C2xC7	0,495	0,54
C5xC8	0,115	0,15
C6xC7	0,078	0,107
C3xC5	0,142	0,206
C4xC6	0,079	0,117

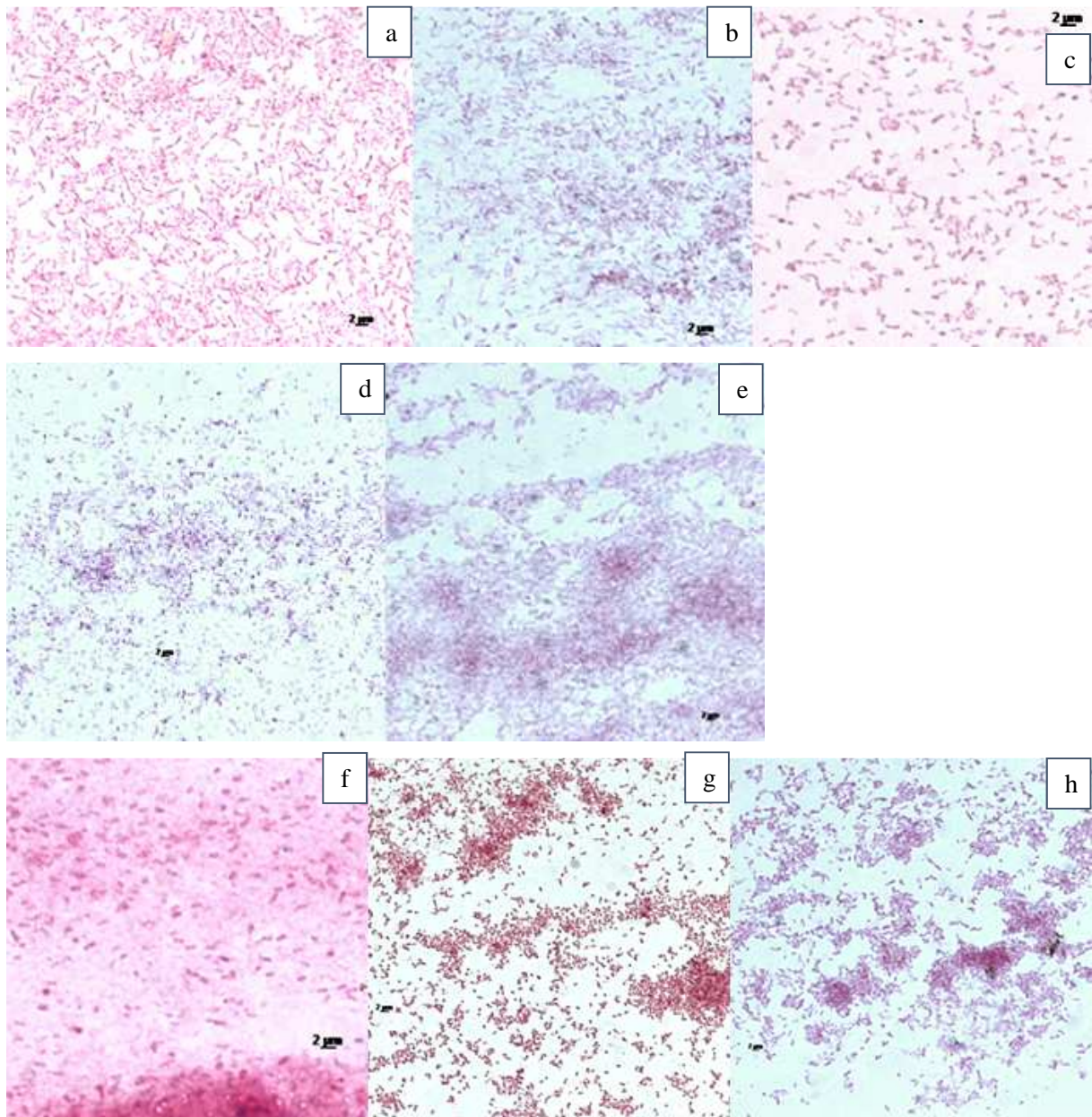
\* Combinações de valores muito semelhantes, que não resultariam em diferença estatística, não foram testadas. Em destaque, valores de  $p(q) \leq 0,05$ . Fonte: Elaborada pela autora.

O uso de morfotipos é uma abordagem comum em ecologia microbiana para seleção de clones a partir de ambientes complexos visando obter medidas de diversidade e/ou o isolamento de espécies dominantes de comunidades bacterianas cultiváveis. No entanto, a extensão da variabilidade intra-morfotipo é desconhecida e pode ser subestimada quando se trabalha com morfotipos muito comuns. Ainda assim, o uso de morfotipos que tenham características marcantes pode ser considerado uma estratégia ecologicamente relevante, além de relativamente rápida e de baixo custo, para obtenção de informação referente à distribuição espaço-temporal de algumas espécies importantes do ambiente (LEBARON et al., 1998). Isolados pertencentes ao mesmo biotipo (classificação baseada em testes bioquímicos, como a análise de FAME) podem ser agrupados em morfotipos, pois esse nível de similaridade é

utilizado para o cálculo da maior parte dos índices de diversidade (HALDEMAN; AMY, 1993). Deste modo, os resultados obtidos pelo presente estudo demonstraram que o uso da morfologia de colônias é um critério de seleção válido para o cálculo de índices ecológicos de diversidade para comunidades microbianas cultiváveis.

Quanto aos resultados do método de coloração diferencial de Gram (Figura 9), predominaram as células do tipo bastonete, e de coloração avermelhada, isto é, Gram-negativas, estando, portanto, de acordo com as descrições contidas em “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*” (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005) para os três gêneros de interesse deste estudo, bem como para grande parte dos gêneros bacterianos endofíticos conhecidos.

**Figura 9.** Citomorfologia de bactérias endofíticas coradas pelo método diferencial de Gram e observadas em microscopia de contraste interferencial de fase Zeiss. Bastonetes Gram-negativos (aumento de 1000 vezes) de colônias isoladas a partir dos meios (ANEXOS A-2, A-3 e A-4, respectivamente): (a) NFb, folhas, variedade “RG 121”, amostra 1; (b) NFb, colmos, variedade “RG 121”, amostra 2; (c) NFb, folhas, variedade “RG 900”, amostra 1; (d) JNFb, colmos, variedade “RG 121”, amostra 2; (e) JNFb, folhas, variedade “RG 900”, amostra 2; (f) LGI-P, colmos, variedade “RG 121”, amostra 1; (g) LGI-P, colmos, variedade “RG 900”, amostra 1; e (h) LGI-P, folhas, variedade “RG 900”, amostra 2.



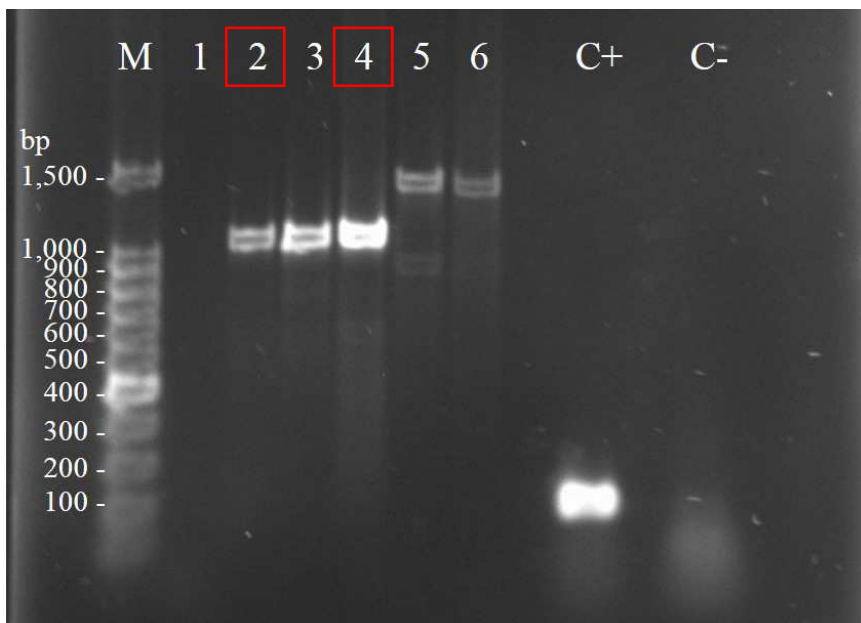
Fonte: Elaborada pela autora.



Quanto à caracterização genética, cinco amostras apresentaram bom perfil de amplificação, conforme demonstra a Figura 10. No entanto, após a etapa do sequenciamento, apenas duas tiveram qualidade suficiente para serem identificadas em nível de espécie. Foram elas as amostras 2 e 4, que corresponderam à mesma espécie: *Pantoea vagans*, enterobactéria Gram-negativa encontrada em uma vasta gama de plantas, comercialmente registrada para o controle biológico do “fogo bacteriano”, doença que ataca pereiras e macieiras e que tem como agente causal a bactéria *Erwinia amylovora* (SMITS et al., 2010).

É interessante notar que ambas as amostras foram provenientes do mesmo meio de cultivo, estrutura vegetal e amostra (planta): LGI-P, folhas, amostra (planta) 2, porém de variedades diferentes, sendo a amostra 2 da variedade “RG 121” e a amostra 4 da variedade “RG 900”.

**Figura 10.** Perfil eletroforético dos isolados endofíticos amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Gel de agarose 1 %; coloração com brometo de etídio. (M) Marcador molecular 100-bp DNA ladder (Promega); (1) JNFb, variedade “RG 121”, folhas, amostra 2; (2) LGI-P, variedade “RG 121”, folhas, amostra 2; (3) LGI-P, variedade “RG 121”, folhas, amostra 2, diluída 10 vezes; (4) LGI-P, variedade “RG 900”, folhas, amostra 2; (5) NFb, variedade “RG 121”, folhas, amostra 1; (6) JNFb, variedade “RG 121”, folhas, amostra 1; (C+) controle positivo: *Escherichia coli* T. Escherich; e (C-) controle negativo: água Milli-Q.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os meios de cultura NFb, JNFb e LGI-P são seletivos, porém, isso não significa que todos os isolados obtidos neste estudo tenham que ser, obrigatória e respectivamente, dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* (CARDOSO et al., 2010), uma vez que várias bactérias associativas e de vida livre podem ser isoladas a partir de meios semi-sólidos, livres de nitrogênio (KIRCHHOF et al., 1997). Portanto, quanto maior o número de atributos microbiológicos utilizados, maior a representatividade da classificação (SILVA; MELLONI, 2011), isto é, para confirmação das espécies, é importante que se avalie, concomitantemente, características fenotípicas, fisiológicas e genéticas dos isolados (CARDOSO et al., 2010).

O crescimento bacteriano em meios de cultura livres de nitrogênio, em condições microaerofílicas, infere a ocorrência da capacidade de fixação biológica de nitrogênio. Assim, novos estudos são necessários, visando avaliar o potencial do inóculo desses isolados de bactérias endofíticas em plantas de interesse ambiental e/ou agrícola (SILVA; MELLONI, 2011). Além disso, pode-se recomendar como continuidade desta pesquisa, em trabalhos futuros, uma análise da diversidade bacteriana endofítica não-cultivável das plantas de arroz, visto tratar-se de uma abordagem mais abrangente de ecologia microbiana (AMANN; LUDWIG, SCHLEIFER, 1995).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, Rudolf I.; LUDWIG, Wolfgang; SCHLEIFER, Karl-Heinz. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, 143-169, 1995.

ANDREOTE, Fernando Dini; AZEVEDO, João Lúcio; ARAÚJO, Welington Luiz. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 417-432, 2009.

AZEVEDO, João Lúcio et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

BACILIO-JIMÉNEZ, Macario et al. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 167-172, 2001.

BANDARA, W. M. M. S.; SENEVIRATNE, Gamini; KULASOORIYA, Sabharatna Ananda. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal of Biosciences**, v. 31, n. 5, p. 645-650, 2006.

BENEDUZI, Anelise et al. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 39, p. 311-320, 2008.

BERG, Gabriele; HALLMANN, Johannes. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. In: SCHULZ, Barbara J. E.; BOYLE, Christine J. C.; SIEBER, Thomas N. (Org.). **Microbial Root Endophytes**. Berlin: Springer-Verlag, 2006, p. 53-69.

BRENNER, Don J.; KRIEG, Noel R.; STALEY, James T. **Bergey's manual of systematic bacteriology**: volume two, the Proteobacteria, part C, the Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. USA: Springer, 2005.

CARDOSO, Isabel Cristina Mendonça et al. Ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em arroz irrigado no estado de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 9, n. 2, p. 178-186, 2010.

CHO, Hyun-Soo et al. Interference of quorum sensing and virulence of the rice pathogen *Burkholderia glumae* by an engineered endophytic bacterium. **Microbial Ecology**, v. 60, p. 14-23, 2007.

COTTYN, Bart et al. Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 885-897, 2009.

CURÁ, José Alfredo et al. Utilidad de las bacterias promotoras del crecimiento y fijadoras de nitrógeno en el cultivo del arroz durante las primeras etapas de desarrollo. **Revista Foro Arroceros Latinoamericano**, v. 21, p. 10-13, 2005.

DIAS, Sidclay Calaça. Planejando estudos de diversidade e riqueza: uma abordagem para estudantes de graduação. **Acta Scientiarum**, Biological Sciences, v. 26, n. 4, p. 373-379, 2004.

DÖBEREINER, Johanna; BALDANI, Vera Lúcia Divan; BALDANI, José Ivo. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995.

EFRON, Bradley. Bootstrap methods: another look at the jackknife. **The Annals of Statistics**, v. 7, n. 1, p. 1-26, 1979.

ELBELTAGY, Adel et al. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5285-5293, 2001.

EVERITT, Brian S. **Cluster analysis**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1993.

GOOGLE EARTH, versão 6.1.0.5001. [Estação Experimental do Arroz, do Instituto Rio Grandense do Arroz - EEA-IRGA, Cachoeirinha/RS]: 29° 56' 77", S; 51° 07' 95", W. Acesso em: 02 mai. 2013.

HALDEMAN, Dana L.; AMY, Penny S. Diversity within a colony morphotype: implications for ecological research. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 933-935, 1993.

HAMMER, Øyvind; HARPER, David A. T.; RYAN, Paul D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia Electronica**, v. 4, n. 1, 9p., 2001.

HOLT, John G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore, Maryland, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.

IKEDA, Seishi et al. Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: plant-bacterial interactions in soybean and rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 9, p. 1398-1410, 2010.

JIMENEZ-SALGADO, T. et al. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3676-3683, 1997.

JONGMAN, R. H. G.; TER BRAAK, C. J. F.; VAN TONGEREN, O. F. R. **Data analysis in community and landscape ecology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

JOSHI, Parvin; TYAGI, Vidit; BHATT, Ajay Ballabh. Characterization of rhizobacteria diversity isolated from *Oryza sativa* cultivated at different altitude in north Himalaya. **Advances in Applied Science Research**, v. 2, n. 4, p. 208-216, 2011.

KAGA, Hiroko et al. Rice seeds as sources of endophytic bacteria. **Microbes and Environments**, v. 24, n. 2, p. 154-162, 2009.

KERRY, Brian R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 38, p. 423-441, 2000.

KHAN, Zareen; DOTY, Sharon Lafferty. Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. **Plant and Soil**, v. 322, p. 197-207, 2009.

KIRCHHOF, G. et al. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 853-862, 1997.

KUSS, Anelise Vicentini. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. 2006. 109 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2006.

LEBARON, Philippe et al. Phenotypic and genetic diversity within a colony morphotype. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters**, v. 160, p. 137-143, 1998.

LEGENDRE, Pierre; LEGENDRE, Louis. **Numerical ecology: developments in environmental modelling**. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LEMONS, Leandro N. et al. Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, p. 42-51, 2011.

LI, Tai-Yuan et al. Construction of a stable expression vector for *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis* and its application in studying the effect of the bacterium as an endophytic bacterium in rice. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters**, v. 267, p. 176-183, 2007.

MAGURRAN, Anne E. **Measuring biological diversity**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004.

MANLY, Bryan F. J. **Multivariate statistical methods: A Primer**. London: Chapman & Hall, 1994.

MANO, Hironobu et al. Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes and Environments**, v. 22, p. 175-185, 2007.

MANO, Hironobu et al. Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. **Microbes and Environments**, v. 21, p. 86-100, 2006.

MANO, Hironobu; MORISAKI, Hisao. Endophytic bacteria in the rice plant. **Microbes and Environments**, v. 23, n. 2, p. 109-117, 2008.

MCCUNE, B.; MEFFORD, M. J. **PC-ORD: multivariate analysis of ecological data**, version 4. Gleneden Beach, Oregon, USA: MjM Software, 1999.

MELO, Adriano Sanches. O que ganhamos 'confundindo' riqueza de espécies e equabilidade em um índice de diversidade? **Biota Neotropica**, v. 8, n. 3, p. 21-27, 2008.

MELO, Itamar Soares; AZEVEDO, João Lúcio. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular biology**. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.

MUKHOPADHYAY, Kunal et al. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathologia**, v. 134, p. 151-159, 1996.

ODUM, Eugene P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1983.

\_\_\_\_\_. Populações em comunidades. In: ODUM, Eugene P. (Org.). **Ecologia**. São Paulo: Guanabara, 1988, p. 258-272.

OKSANEN, Jari et al. **vegan**: community ecology package. R package version 2.0-10, 2013. Disponível em: <<http://CRAN.R-project.org/package=vegan>>. Acesso em: 03 jan. 2014.

OKUNISHI, Suguru et al. Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). **Microbes and Environments**, v. 20, p. 168-177, 2005.

OVREAS, Lise et al. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

PEARSON, Karl. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. **Philosophical Magazine**, v. 2, p. 559-572, 1901.

PIELOU, Evelyn Chrystalla. **Population and community ecology**: principles and methods. New York: Gordon & Breach, 1983.

PING, Liyan; BOLAND, Wilhelm. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 263-269, 2004.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Viena, Áustria: R Foundation for Statistical Computing, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 03 jan. 2014.

RAMESH, R.; JOSHI, A. A.; GHANEKAR, M. P. Pseudomonads: major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 47-55, 2009.

Safra. **REVISTA LAVOURA ARROZEIRA**, v. 62, n. 461, 2014. Disponível em: <[http://issuu.com/lavouraarrozeira/docs/irga\\_-\\_revista\\_lavoura\\_arrozeira\\_n4](http://issuu.com/lavouraarrozeira/docs/irga_-_revista_lavoura_arrozeira_n4)>. Acesso em: 29 mar. 2014.



SHANNON, Claude Elwood; WEAVER, Warren. **The mathematical theory of communication**. Urbana, IL: University of Illinois Press, 1949.

SILVA, A. P. et al. Bacterial diversity under different tillage and crop rotation systems in an oxisol of Southern Brazil. **The Open Agriculture Journal**, v. 7, p. 40-47, 2013.

SILVA, Talita Filomena; MELLONI, Rogério. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas não simbióticas em solos da Reserva Biológica Serra dos Toledos, Itajubá/MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 2, p. 359-371, 2011.

SOARES, René A. et al. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. **Applied Soil Ecology**, v. 33, p. 221-234, 2006.

SPSS. **SPSS v. 17.0.0**. Chicago, 2008. 1 CD-ROM.

SMITS, Theo H. M. et al. Genome sequence of the biocontrol agent *Pantoea vagans* strain C9-1. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 24, p. 6486-6487, 2010.

STURTZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Review in Plant Sciences**, v. 19, p. 1-30, 2000.

TANTAWY, Eman A. Acquainting with salt tolerant endophytic bacteria isolated from rice plant grown in highly saline soil in Egypt. **Internacional Journal of Academic Research**, v. 1, n. 2, p. 72-79, 2009.

TAYLOR, L. R. Bates, Williams, Hutchinson - a variety of diversities. In: MOUND, Laurence Alfred; WALOFF, Nadia. (Org.). **Diversity of insect faunas**. Oxford, UK: Blackwell, 1978, p. 1-18.

TRIVEDI, Pankaj; SPANN, Timothy; WANG, Nian. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida. **Microbial Ecology**, v. 62, p. 324-336, 2011.

URAMOTO, Keiko; WALDER, Julio M. M.; ZUCCHI, Roberto A. Análise quantitativa e distribuição de populações de espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 33-39, 2005.

VIDEIRA, Sandy Sampaio; ARAÚJO, Jean Luiz Simões; BALDANI, Vera Lúcia Divan. Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. **Embrapa Agrobiologia, Documentos-234**, Seropédica, RJ, 74 p., 2007. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/629417>>. Acesso em: 17 abr. 2012.

WATRUD, Lidia S. et al. Comparison of taxonomic, colony morphotype and PCR-RFLP methods to characterize microfungal diversity. **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 384-392, 2006.

WIHLM, Jerry. Graphic and mathematical analyses of biotic communities in polluted streams. **Annual Review of Entomology**, v. 17, p. 223-252, 1972.

ZAKRIA, Muhammad et al. Colonization and nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp. strain B501 *gfp1* and assessment of its growth-promoting ability in cultivated rice. **Microbes and Environments**, v. 22, n. 3, p. 197-206, 2007.

**ANEXOS**

## ANEXO A - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

## A-1. Solução salina para diluição (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

3,4 g L <sup>-1</sup>	Fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
0,2 g L <sup>-1</sup>	Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)
0,1 g L <sup>-1</sup>	Cloreto de sódio (NaCl)
0,02 g L <sup>-1</sup>	Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O)
2 mL	Solução de micronutrientes
4 mL	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético de ferro (FeEDTA, solução 1,64 %)
4,5 g L <sup>-1</sup>	Hidróxido de potássio (KOH)
pH	7,0

## A-2. Meio de cultura NFb (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

5,0 g L <sup>-1</sup>	Ácido málico
0,5 g L <sup>-1</sup>	Fosfato de potássio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
0,2 g L <sup>-1</sup>	Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)
0,1 g L <sup>-1</sup>	Cloreto de sódio (NaCl)
0,02 g L <sup>-1</sup>	Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O)
2 mL	Solução de micronutrientes
2 mL	Azul de bromotimol (solução 0,5 % em 0,2 N de hidróxido de potássio, KOH)
4 mL	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético de ferro (FeEDTA, solução 1,64 %)
1 mL	Solução de vitaminas
4,5 g L <sup>-1</sup>	KOH
pH	6,5-6,8
1,75-1,8/15 g L <sup>-1</sup>	Ágar (para meio semi-sólido/sólido)

## A-3. Meio de cultura JNFb (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

5,0 g L <sup>-1</sup>	Ácido málico
-----------------------	--------------

0,6 g L <sup>-1</sup>	Fosfato de potássio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
1,8 g L <sup>-1</sup>	Fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
0,2 g L <sup>-1</sup>	Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)
0,1 g L <sup>-1</sup>	Cloreto de sódio (NaCl)
0,02 g L <sup>-1</sup>	Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O)
2 mL	Solução de micronutrientes
2 mL	Azul de bromotimol (solução 0,5 % em 0,2 N de hidróxido de potássio, KOH)
4 mL	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético de ferro (FeEDTA, solução 1,64 %)
1 mL	Solução de vitaminas
4,5 g L <sup>-1</sup>	KOH
pH	5,8
1,8/17 g L <sup>-1</sup>	Ágar (para meio semi-sólido/sólido)

#### A-4. Meio de cultura LGI-P (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

100 g L <sup>-1</sup>	Açúcar cristal ou sacarose
0,2 g L <sup>-1</sup>	Fosfato de potássio dibásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )
0,6 g L <sup>-1</sup>	Fosfato de potássio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )
0,2 g L <sup>-1</sup>	Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)
0,02 g L <sup>-1</sup>	Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O)
0,002 g L <sup>-1</sup>	Molibdato de sódio dihidratado (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O)
5 mL	Azul de bromotimol (solução 0,5 % em 0,2 N de hidróxido de potássio, KOH)
0,01 g L <sup>-1</sup>	Cloreto férrico hexahidratado (FeCl <sub>3</sub> . 6H <sub>2</sub> O)
pH	5,5
1,8/17 g L <sup>-1</sup>	Ágar (para meio semi-sólido/sólido)

#### A-5. Meio de cultura Batata sólido (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

200 g L <sup>-1</sup>	Batata
2,5 g L <sup>-1</sup>	Ácido málico
2,5 g L <sup>-1</sup>	Açúcar cristal

2 mL	Solução de micronutrientes
1 mL	Solução de vitaminas
pH	6,5-7,0
15 g L <sup>-1</sup>	Ágar

#### A-6. Meio de cultura Batata-P sólido (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

Preparado da mesma forma que o meio Batata sólido, porém o ácido málico é substituído por 100 g L<sup>-1</sup> de açúcar cristal.

#### A-7. Solução de micronutrientes (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

0,04 g L <sup>-1</sup>	Sulfato cúprico hidratado (CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O)
1,20 g L <sup>-1</sup>	Sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)
1,40 g L <sup>-1</sup>	Ácido bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )
1,0 g L <sup>-1</sup>	Molibdato de sódio dihidratado (Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O)
1,175 g L <sup>-1</sup>	Sulfato de manganês (MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O)

#### A-8. Solução de vitaminas (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995)

10 mg 100 mL <sup>-1</sup>	biotina
20 mg	piridoxol-HCl

#### A-9. Caldo Luria-Bertani (MILLER, 1972)

10 g L <sup>-1</sup>	Caseína enzimática hidrolisada
5 g L <sup>-1</sup>	Extrato de levedura
10 g L <sup>-1</sup>	Cloreto de sódio (NaCl)
pH	7,5 ± 0,2

#### A-10. Solução de lise I

0,32 M	Sacarose
10 mM	Tris(Hidroximetil) Aminometano Cloridrato (Tris-HCl) pH 7,5

5 mM	Cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ )
1 %	Triton X-100

#### A-11. Solução de lise II

10 mM	Tris(Hidroximetil) Aminometano Cloridrato (Tris-HCl) pH 8,2
400 mM	Cloreto de sódio (NaCl)
2 mM	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético dissódico ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )

ANEXO B - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA, PRODUÇÃO TÉCNICA E ATIVIDADES  
COMPLEMENTARES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO DA DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO

B-1. Produção bibliográfica

GARCIA, Taís Vargas; KNAAK, Neiva; FIUZA, Lidia Mariana. **Microrganismos endófitos como agentes de controle biológico na cultura do arroz.** Artigo de revisão bibliográfica submetido ao periódico científico “Arquivos do Instituto Biológico” - estrato Qualis: B3 (dezembro/2013).

B-2. Produção técnica

GARCIA, Taís Vargas; MACHADO, Vilmar; FIUZA, Lidia Mariana. **Aplicação de métodos dependentes e independentes de cultivo para estudo da biodiversidade de bactérias endofíticas em *Oryza sativa* L.** Apresentação de seminário relativo ao projeto de qualificação de mestrado, e discussão do mesmo com o grupo de pesquisa em Mesa-Redonda no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia - UNISINOS (agosto/2012).

GARCIA, Taís Vargas; MACHADO, Vilmar; FIUZA, Lidia Mariana. **Aplicação de métodos dependentes de cultivo para estudo da biodiversidade de bactérias endofíticas em *Oryza sativa* L.** Apresentação de seminário contendo os resultados parciais da dissertação de mestrado, e discussão dos mesmos com o grupo de pesquisa em Mesa-Redonda no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia - UNISINOS (maio/2013).

GARCIA, Taís Vargas; MACHADO, Vilmar; FIUZA, Lidia Mariana. **Bactérias endofíticas associadas às variedades “RG 121” e “RG 900” de *Oryza sativa* L.** Apresentação de seminário contendo os resultados parciais da dissertação de mestrado, e discussão dos mesmos com o grupo de pesquisa em Mesa-Redonda no Laboratório de Microbiologia e Toxicologia - UNISINOS (outubro/2013).

GARCIA, Taís Vargas; MACHADO, Vilmar; FIUZA, Lidia Mariana. **Bactérias endofíticas associadas às variedades “RG 121” e “RG 900” de *Oryza sativa* L.** Apresentação de seminário contendo os resultados parciais da dissertação de mestrado em reunião técnica de pesquisa da EEA-IRGA e do PPG-Biologia (outubro/2013).



### B-3. Atividades complementares

**Exame de proficiência** em língua inglesa (março/2012).

**Exame de qualificação** do projeto de dissertação de mestrado (julho/2012).

**Estágio de docência** na disciplina “Biologia Quantitativa”, ministrada pela professora Dra. Cristina Stenert - curso de graduação em Biologia, bacharelado (2012/2).