

**INSTITUTO FEDERAL DE MINAS GERAIS
CAMPUS SÃO JOÃO EVANGELISTA
FERNANDO RABELO GLÓRIA CAMPOS**

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS
DIAZOTRÓFICAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE PLANTAS DE EUCALIPTO**

**SÃO JOÃO EVANGELISTA
2019**

FERNANDO RABELO GLÓRIA CAMPOS

**IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS
DIAZOTRÓFICAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE PLANTAS DE EUCALIPTO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São
João Evangelista como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Me. Alisson José E. de Carvalho
Coorientador: Me. Caique Menezes de Abreu

**SÃO JOÃO EVANGELISTA
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

C198i Campos, Fernando Rabelo Glória.
2019

Identificação de potenciais bactérias endofíticas diazotróficas patogênicas isoladas de plantas de eucalipto. / Fernando Rabelo Glória Campos. – 2019. 46f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista, 2019.

Orientador: Me. Alisson José E. de Carvalho.

Coorientador: Me. Caique Menezes de Abreu

1. Bactérias 2. Endofíticas. 3. Diazotróficas. I. Campos, Fernando Rabelo Glória. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista. III. Título.

CDD 634.97342

Elaborada pela Biblioteca Professor Pedro Valério

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais
Campus São João Evangelista

Bibliotecária Responsável: Rejane Valéria Santos – CRB-6/2907

FERNANDO RABELO GLÓRIA CAMPOS

**IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS
DE PLANTAS DE EUCALIPTO COM POTENCIAL PATOGÊNICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Instituto Federal de Minas Gerais – Campus São
João Evangelista como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Aprovada em 29 / 03 / 2019

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Me. Alisson José Eufrásio de Carvalho
Instituto Federal de Minas Gerais- Campus São João Evangelista



Me Caique Menezes de Abreu
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri



Me Ari Medeiros Braga Neto
Instituto Federal de Minas Gerais- Campus São João Evangelista

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela presença constante em minha vida e amparo em todos os momentos.

Aos meus pais Francisco e Bernadete, pelo apoio e incentivo ao longo dos anos.

Aos meus irmãos Betânia, Beatriz, Belquiz e Francisco pela cumplicidade e irmandade.

A minha namorada Fernanda Ferreira Reis, que sempre esteve ao meu lado me ajudando.

Ao meu orientador Prof. Me. Alisson José Eufrásio de Carvalho, pelo voto de confiança, incentivo e orientações ao longo de minha formação acadêmica e na elaboração deste trabalho.

Ao meu coorientador Caique Menezes de Abreu por toda ajuda prestada ao longo da vida acadêmica e desse trabalho.

Aos meus professores, por me proporcionar o conhecimento nas diversas manifestações da educação no processo de formação profissional.

Ao Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* São João Evangelista, servidores e funcionários a qual fazem parte.

E a todos que acompanharam neste caminho, e contribuíram para o sucesso desta etapa de formação.

Muito obrigado!

RESUMO

O grande desafio para o século é a integração dos fatores biológicos nos sistemas de produção a fim de reduzir os impactos causados pelo sistema produtivo convencional, onde para se alcançar rendimentos máximos nos cultivos são necessárias grandes quantidades de fertilizantes e defensivos. Os micro-organismos endofíticos associativos são aqueles que vivem parte ou todo seu ciclo de vida no interior das plantas sem causar danos e não necessariamente formarem simbioses. Estes micro-organismos produzem substâncias promotoras de crescimento das plantas, promovem a indução sistêmica de resistência a pragas e doenças fitopatogênicas e a tolerância a condições adversas, e no caso de bactérias podem fazer a fixação biológica do N_2 . A contribuição de bactérias endofíticas associativas para a fixação biológica de nitrogênio é muito importante, pois a maior parte das áreas são cultivadas com plantas não leguminosas, como no setor florestal. O objetivo do presente trabalho é caracterizar e identificar potenciais micro-organismos diazotróficos patogênicos isolados de genótipos de eucalipto. Para isso, algumas estirpes bacterianas diazotróficas isoladas de folhas e raízes de eucalipto foi adquirida da coleção de bactérias diazotróficas do Laboratório de Microbiologia do solo da UFVJM, procedido à caracterização morfológica e bioquímica das células e das culturas. A capacidade das bactérias expressar a virulência foi avaliada pelo método de hipersensibilidade em plantas não alvo como o fumo, o tomate e pimentão. A diversidade microbiana nos nichos ecológicos, folhas e raízes, estão associados a planta hospedeira, podendo os grupos ser constituído por gêneros bacterianos distintos, mas com especificidade ao genótipo da planta hospedeira de origem. Houve formação de 13 grupos de similaridade entre os agentes diazotróficos. Todos os isolados poderão ser utilizados como fonte de inóculo para bioprospecção devido sua reação negativa para patogenicidade.

Palavras-chave: hipersensibilidade, endofíticos, diazotróficos, diversidade microbiana.

ABSTRACT

The major challenge for the century is the integration of biological factors into production systems in order to reduce the impacts caused by the conventional production system, where in order to achieve maximum crop yields large quantities of fertilizers and pesticides are required. Associative endophytic microorganisms are those that live part or all of their life cycle inside the plants without causing damage and do not necessarily form symbioses. These microorganisms produce plant growth promoting substances, promote systemic induction of resistance to pest and phytopathogenic diseases, and tolerance to adverse conditions, and in the case of bacteria can make the biological fixation of N₂. The contribution of associative endophytic bacteria to the biological nitrogen fixation is very important, since most of the areas are cultivated with non-leguminous plants, as in the forest sector. The objective of the present work is to characterize and identify potential pathogenic diazotrophic microorganisms isolated from eucalyptus genotypes. To this end, some diazotrophic bacterial strains isolated from eucalyptus leaves and roots were obtained from the diazotrophic bacteria collection of the UFVJM Soil Microbiology Laboratory, proceeding to the morphological and biochemical characterization of cells and cultures. The ability of bacteria to express virulence was assessed by the hypersensitivity method in non-target plants such as tobacco, tomato and pepper. The microbial diversity in the ecological niches, leaves and roots, are associated to the host plant, and the groups can be constituted by different bacterial genera, but with specificity to the genotype of the host plant of origin. There were 13 similarity groups among the diazotrophic agents. All isolates may be used as an inoculum source for bioprospecting because of their negative reaction to pathogenicity.

Key words: hypersensitivity, endophytic, diazotrophic, microbial diversity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Origem dos isolados microbianos encontrados em tecidos vegetais dependentes de meios de cultivo semi-específico.....	20
Tabela 2 - Parâmetros analisados na caracterização morfológica das colônias bacterianas, segundo YANO, 1993.	22
Tabela 3 - Características morfológicas microbiana e cultural de bactérias diazotróficas endofítica isolados de folhas e raízes de Eucalipto	31
Tabela 4 - Características bioquímicas de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de folhas e raízes de Eucalipto	34
Tabela 5 - Agrupamento dos acessos bacterianos diazotróficos isolados de folhas e raízes de eucalipto.	38
Tabela 6 - Resposta da Reação de hipersensibilidade em função da interação bactérias endofíticas diazotróficas em plantas não hospedeira.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto morfológico das culturas bacterianas em meio solido de batata malato....	32
Figura 2 - Atividade Enzimática da catalase produzida por bactérias endofíticas diazotróficas para hidrolise do Peroxido de Hidrogênio.....	35
Figura 3 - Atividade Enzimática da urease na hidrólise da uréia produzida por bactérias endofíticas diazotróficas.....	35
Figura 4 - Atividade Enzimática esterásica/lipídica na hidrolise da Tween-80 produzida por bactérias endofíticas diazotróficas.....	36
Figura 5 - Diversidade de isolados bacterianos endofíticos diazotróficos provenientes de órgãos foliares de genótipos de eucalipto.....	37
Figura 6 - Diversidade de isolados bacterianos endofíticos diazotróficos provenientes de órgãos radiculares de genótipos de eucalipto.	37
Figura 7 - Reação de hipersensibilidade exibida em folhas de Fumo (<i>Nicotiana tabacum</i> L.), Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>) e Pimentão (<i>Capsicum annuum</i> Mill) após infiltradas com suspensão de células de endofitos diazotróficos incompatíveis.....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 PERSPECTIVAS PARA UTILIZAÇÃO DE AGENTES ENDOFÍTICOS DIAZOTRÓFICOS COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS	11
2.2 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS	13
2.3. ASPECTOS ANATOMOMORFOLÓGICOS DA CÉLULA BACTERIANA E CULTURAL COMO FERRAMENTA DE IDENTIFICAÇÃO DE FITOPATÓGENOS.....	15
2.4. VARIABILIDADE GENÉTICA EM BACTERIAS ENDOFITICAS E FITOPATOGENICAS	17
2.5. IDENTIFICAÇÃO DE PROCARIOTOS FITOPATOGÊNICOS POR TESTES RÁPIDO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 LOCAL, ORIGEM E DESCRIÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO	20
3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CULTURAL	21
3.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	23
3.3.1 Coloração de Gram.....	23
3.3.2 Teste Enzimático	24
3.4 INDUÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE EM PLANTAS.....	25
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA	26
4.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	33
4.3 DIVERSIDADE MORFOLOGIA E BIOQUÍMICA.....	36
4.4 TESTE DE PATOGENICIDADE PELA INDUÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE	39
5. CONCLUSÃO.....	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

Os vegetais podem naturalmente interagir com um amplo número de microrganismos, colonizando tecidos internos como folhas, flores, sementes, caule, raízes e rizoplane, podendo estes ser prejudiciais ou benéficos ao seu hospedeiro (CARVALHO et al., 2016; MIGUEL et al., 2016).

Há indícios que a microbiota endofítica co-evoluiu dos organismos fitopatogênicos que por alguma razão perderam sua virulência e se associaram com a planta hospedeira trocando informações gênicas (HALLMANN et al., 1998; BORGES, 2006). Assim, definimo-las como organismo que durante ou parte de seu ciclo de vida, invadem tecidos de plantas vivas através de infecção não aparente e sem causar sintomas de doenças (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Em comum, os tipos de colonização associativa e endófitas podem derivar em resultados benéficos para a planta, levando à promoção do crescimento, com o aumento significativo da biomassa vegetal, produção de matéria seca e rendimento de grãos, emergência de brotos florais, bem como, o aumento da tolerância de sódio (Na) e contra os estresses biótico e abiótico (CARVALHO et al., 2016; PURI et al., 2015). Dentre os tipos de endófitos existe as bactérias diazotróficas, capazes de fixar nitrogênio atmosférico, posteriormente, utilizado pela planta hospedeira em processo auto regulável (DÖBEREINER, 1992).

As bactérias diazotróficas podem contribuir para o crescimento vegetal não só pelo fornecimento de nitrogênio (N), na forma prontamente disponível, mas também por outros mecanismos de ação como: produção de fitohormônios, solubilização de fosfatos, antagonismo a fitopatógeno, entre outros (MOREIRA et al., 2010; ANDRADE et al., 2014). Podendo promover benefícios econômicos e diminuição dos custos de fertilização, redução das emissões de gases de efeito estufa e lixiviação diminuída de NO_3^- em águas subterrâneas (ROESCH et al., 2010).

A contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) na nutrição vegetal vem ganhando destaque nas últimas décadas por possibilitar a manipulação biotecnológica dos endófitos no suprimento de teores de nutriente em plantas não leguminosas (DÖBEREINER, 1992; MOREIRA et al., 2010). Em ambientes com condições sub-ótimas a associação entre diazotrófico-planta disponibiliza parte das exigências do mineral nitrogenado, no entanto os estudos da diversidade e riqueza microbiana associativa ao eucalipto ainda é incipiente, bem

como, no entendimento das interações planta-microrganismo e como essas podem contribuir para a nutrição florestal (PURI et al., 2016).

No Brasil os plantios de eucalipto ocupam entorno de 5,7 milhões de hectares da área de árvores plantadas no país, o que representa 71,9% da área total, e estão localizados principalmente nos Estados de Minas Gerais (24%), São Paulo (17%) e Mato Grosso do Sul (15%) (IBA, 2017). O rápido crescimento das plantas de eucalipto exige uma alta disponibilidade de nutrientes, especificamente o nitrogênio, elemento este que pode ser obtido pela planta por meio das bactérias endofíticas e/ou de vida livre (MIGUEL et al., 2016).

O melhoramento florestal adotado no cultivo de eucalipto parte das seguintes características para seleção dos genótipos: incremento do crescimento e da produtividade; arquitetura da árvore; propriedades química e físicas da madeira; resistência a doenças; tolerância a estresses abióticos (geadas, seca, salinidade); capacidade fotossintética; caracteres fisiológicos; compostos de interesse farmacêutico; entre outros (GOLLE et al., 2009). Todavia neste processo não se têm levado em consideração a existência da influência da interação hospedeiro e organismos diazotróficos. Em um sentido mais restrito pode-se inferir que parte do desempenho do eucalipto nos diferentes ambientes em que são plantadas é devido à sua interação com microrganismos endofíticos (FONSECA et al., 2017).

Estudos da diversidade microbiana diazotrófica em folha, raízes e rizoplane de eucalipto realizada por Fonseca et al., (2017), Miguel et al., (2016) e Ferreira (2008) revelam a presença de três filiais bacterianas: Firmicutes, Proteobactéria e Actinobactéria, inferindo-se que a riqueza bacteriana de endófito varia entre espécies, bem como do órgão associado. Tal diversidade garante não só a resiliência dos processos que mediam em um determinado ecossistema, como também a ocorrência deste nos mais diferentes habitats terrestres (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; CARVALHO et al., 2016).

Partindo do pressuposto que o estabelecimento de uma interação benéfica com bactérias diazotróficas endófitas e associativas podem trazer várias respostas adaptativas para as plantas que culminarão em melhora no crescimento e desenvolvimento vegetativo, o presente trabalho visa caracterizar e identificar potenciais microrganismos diazotróficos patogênicos isolados de genótipos de eucalipto.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PERSPECTIVAS PARA UTILIZAÇÃO DE AGENTES ENDOFÍTICOS DIAZOTRÓFICOS COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Em regiões tropicais é frequente a limitação da produção agrícola por meio das baixas taxas em fertilização das áreas agricultáveis. O nitrogênio (N) é o elemento comumente encontrado em déficit em nossos solos, causando impacto direto na produção de alimentos, principalmente daqueles oriundos de plantas não leguminosas (NEVES & RUMJANEK, 1998; DÖBEREINER, 1992).

A utilização de microrganismos em aplicações biotecnológicas é pautada em seu potencial. A manipulação desses organismos em um determinado processo visa a obtenção de antibiótico, fertilização de áreas agricultáveis pela solubilização e fixação de elementos, produção de substâncias antitumorais, enzimáticas, entre outros (PURI et al., 2016; ROESCH et al., 2006;2010). As aplicações podem ser vistas em diferentes áreas como a farmacológica, industrial, bem como a agricultura.

As interações endófitos/plantas ainda não são muito bem compreendidos, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas interações simbióticas, os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens às plantas tais como: a diminuição da herbívora e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (RODRIGUES, 2009; MOREIRA et al., 2010).

Dentre as aplicações desses organismos na agricultura destaca-se o ganho de resistência em condições adversas, alterações nas condições fisiológicas; produção de fitohormônios, produção de enzimas e substâncias bioativas. No entanto, os estudos relacionados ao potencial das bactérias endofíticas no cenário agrícola tem visões focadas na fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos e controle biológico de doenças e insetos-praga, além da promoção de crescimento vegetal (FERREIRA, 2008; ANDRADE et al., 2014).

Os cultivos de plantas não leguminosas possuem área agricultável superior as das plantas leguminosas. As plantações de eucalipto oferecem uma fonte de matéria-prima econômica e renovável. Existe um interesse substancial em melhorar a produção florestal, especialmente através de estratégias sustentáveis, como o uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas (FONSECA et al., 2017).

Apesar da capacidade dos eucaliptos crescerem em solos de baixa fertilidade, há relatos que em plantações de eucalipto ocorre saldo N negativo. Nos anos iniciais de rotação a resposta da cultura ao uso de fertilizante nitrogenado são baixas, podendo inferir que as reservas orgânicas de N onde essas florestas se desenvolvem foram gradualmente esgotadas, comprometendo a sustentabilidade das florestas plantadas (FONSECA et al., 2017). Entretanto, relatos demonstram que as plantas de eucalipto podem ter estratégias não descritas para obtenção de nitrogênio.

A promoção de crescimento de plantas por meio da associação com bactérias diazotróficas envolve a liberação de substâncias bioativas de compostos secundários e fornecimento de elementos nutricionais e hormonais para o hospedeiro. A liberação destes compostos reflete na expansão do volume das raízes, melhoria na absorção de nutrientes e água, produção de biomassa e biorremediação da área bem como, na adaptabilidade do hospedeiro as condições adversas do ambiente e clima (PINTO, 2017). Portanto, o isolamento, a identificação e a aplicação biotecnológica destas bactérias permitem o estabelecimento das espécies hospedeiras e seu sucesso não só no âmbito agrícola, natural, mas também no restabelecimento de áreas degradadas e de preservação.

A produção agrícola brasileira, de uma maneira geral é suportada por um uso excessivo de insumos químicos. Diante disso, tem se buscado alternativas que, muito além de reduzir e/ou até substituir o uso de produtos químicos, possam garantir a qualidade e produtividade das culturas, reduzindo os custos de produção e preservando o meio ambiente. Neste cenário o desenvolvimento de novas classes de bioprodutos, dentre as quais destacamos os bioinoculantes, os biofertilizantes e os bioestimulantes são considerados estratégicos, não apenas sob o ponto de vista comercial, mas principalmente pelos aspectos sociais e ambientais associados a cadeia de produção agrícola (RODRIGUES, 2009; FONSECA 2017; DÖBEREINER et al., 1992).

A estruturação legal da produção comercial destes produtos no Brasil é incipiente, ainda em processo de discussão e legislação, carecendo de ajustes e análises exploratórias. Desta forma, as etapas de bioprospecção para o desenvolvimento de novos bioprodutos consiste em estratégia fundamental para garantir produtos com baixo impacto ambiental e otimizar produção sustentável.

2.2 BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

As bactérias diazotróficas utilizam como fonte de nitrogênio para seu metabolismo o reservatório de nitrogênio gasoso da atmosfera (N_2). O N_2 é pouco reativo e somente um grupo seleto de seres vivos, alguns procariotos, possui o complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformá-lo em amônia que é subsequentemente assimilada em aminoácidos e proteínas (NEVES & RUMJANEK, 1998).

A interação entre microrganismos diazotróficos e plantas superiores podem ocorrer de diferentes modalidades, as associações rizosférica, associações com infecção da planta hospedeira, associações com bactérias endofíticas facultativas e associações com bactérias endofíticas obrigatórias. Todas estas interações supracitadas se dão pela colonização da rizosfera, onde, eventos simultâneos como a quimiotaxia, reconhecimento, adesão e fornecimento de nutrientes irá determinar qual interação ocorrerá entre uma bactéria e planta hospedeira (NEVES & RUMJANEK, 1998).

A associação com plantas não leguminosas diverge da associação por rizóbio, uma vez que as bactérias não residem intracelularmente em células vegetais e sua colonização não induz a formação de qualquer estrutura diferenciada visível na planta. Vale salientar que as taxas de fixação biológica de nitrogênio com bactérias diazotróficas associativas e endofíticas, leva a redução no uso de fertilizantes nitrogenados e ganho de rendimento da planta (CARVALHO et al., 2016; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; HUNGRIA & ARAUJO, 1994).

Os métodos de isolamento de microrganismos fixadores de nitrogênio em meio semi-sólido como o NFb, JNFb, LGI e JMV (DÖBEREINER et al., 1995), vem sendo utilizado há décadas, permitindo entender a variabilidade da associação entre estirpes bacterianas a genótipos de plantas e especular sua relação com as condições edafoclimáticas e posicionamento nos órgãos vegetais (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007).

Tradicionalmente, o estudo de endofíticos foi baseado em técnicas de isolamento em meios de cultura. Entretanto, nos últimos anos, com o avanço das técnicas moleculares, tem sido possível investigar aqueles que não são cultiváveis ou de natureza fastidiosa, possibilitando o estudo do material genético a partir de amostras coletadas no ambiente (ASSUMPÇÃO, 2009).

Relatos mostram que em áreas perturbadas ou sub-ótimas a FBN pode ser estimulada, beneficiando os processos de revegetação e reabilitação destas áreas, além de contribuir para o crescimento e estabelecimento das culturas e consequente aumento de produção visando

minimizar gastos tanto quanto em recuperação de áreas degradadas e também ambientes naturais (MOREIRA, 2010).

A absorção do nitrogênio pelos animais e plantas é obtida por meio da dieta no caso dos animais e absorção por meio de pelos radiculares no caso dos vegetais. Entretanto para ser absorvido o gás nitrogênio é fixado no solo pelas descargas elétricas ou pela fixação biológica de nitrogênio através das bactérias de vida livre ou simbióticas, hora, também pode ser disponível através de um processo industrial na produção de fertilizantes nitrogenados (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; SILVA et al., 2014).

A maioria das plantas absorvem nitrato, uma exceção é a planta *Oryza sativa*, L. que se adaptou a absorver amônio. Apesar da absorção de nitrato, as plantas não conseguem assimilar este composto e produzir biomassa a partir dele, sendo necessário sua redução a amônia. Para tal as plantas desenvolveram um complexo metabólico enzimático que consegue reduzir nitrato a amônio, pelos processos de redução de nitrato a nitrito ou nitrito a amônio com ação da enzima nitrato redutase, acontecendo no citosol e no cloroplasto, respectivamente (TAIZ & ZIEGER 2009). Embora estes processos ocorram na planta, não podemos descartar a possibilidade de ação destes microrganismos agindo em associação com a planta nestas organelas.

2.2.PECULIARIDADES DAS BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

A grande maioria das bactérias fitopatogênicas são parasitas facultativos, possuindo mecanismos versáteis de sobrevivência fora da planta hospedeira. As bactérias, enquanto procariotos, são organismos muito pequenos cuja existência passou a ser conhecida há pouco mais de 200 anos (ROMEIRO, 2001).

As doenças bacterianas de plantas são problemas fitopatogênicos e agrônômicos sérios em qualquer parte do mundo e, especialmente, em países tropicais, por razões técnicas, climáticas, históricas, políticas e econômicas (ROMEIRO, 2005).

Atualmente as técnicas de controle de doenças de origem bacteriana são quase que exclusivamente, de exclusão e erradicação. Essas dificuldades se dão pela falta de absorção e translocação de antibióticos na planta, facilmente perdidos no ambiente, podendo estes perturbar o equilíbrio das comunidades do ecossistema (AMARAL, 2012).

As condições climáticas brasileiras, notoriamente um país tropical, com chuvas constantes acompanhadas com ventos, favorece a disseminação de inóculo de bacterioses em

condições de campo. O fato de as bactérias serem muito versáteis em sua fisiologia e metabolismo é um agravante para pouca evolução das pesquisas na área fitossanitária, quando se trata de doenças bacterianas (ROMEIRO, 2005).

As buscas por substâncias bactericidas e bacteriostáticos que possam ser aplicadas e agir de forma sistêmica na planta poderia proporcionar uma proteção generalizada, embora não exista ainda um produto com tais características, no entanto, estudos estão sendo desenvolvidos (ROMEIRO, 2005; DELEITO et al., 2005).

2.3. ASPECTOS ANATOMOMORFOLÓGICOS DA CÉLULA BACTERIANA E CULTURAL COMO FERRAMENTA DE IDENTIFICAÇÃO DE FITOPATÓGENOS.

Todos os procariotos têm membrana celulares, ribossomos citoplasmáticos 70S e uma região nuclear não limitada por membrana. No entanto, os fitopatógenos tem uma característica peculiar de colonizar, viver e multiplicar dentro de tecidos das plantas, embora os endofíticos compartilham da mesma habilidade (AGRIOS, 2005; TRIGIANO, WINDHAM; WINDHAN, 2010).

Os procariotos fitopatogênicos compreendem um grupo diverso superando mais de 30 gêneros, com formas e características diversas. As bactérias que incitam enfermidades em plantas geralmente possuem forma de bastonete reto, com dimensões aproximadas de 1 μm de largura e 3 μm de comprimento, não formam esporos ou qualquer estrutura de resistência ou de repouso, podendo estas apresentar pleomorfismo (ROMEIRO, 2001; 2005; TRIGIANO, WINDHAM; WINDHAN, 2010).

Os tipos mais comuns de forma e arranjo de células encontrados entre as bactérias são: bastonetes retos, estreptobacilo, estafilobacilo, monococos, diplococos, sarcina, estreptococos, estafilococos, bastonete curvo e espiroquetas. As estruturas presentes em células bacterianas auxiliam na sua caracterização e identificação. Algumas destas características podem ser inferidas utilizando procedimentos bioquímicos e moleculares (ROMEIRO, 2001; 2005).

A cápsula composta por polissacarídeos e polímeros nitrogenados, facilita a aderência da célula a superfície do hospedeiro. Já as estruturas apêndicas são de origem proteica que confere mobilidade à célula, recombinação e adesão à superfície, denominados como flagelos, pilus e fímbrias, esses estão presente na maioria das bactérias e são estruturas que estão intimamente ligadas à recombinação bacteriana e reconhecimento com o hospedeiro. Ambas

as estruturas estão correlacionados com o potencial de virulência do isolado bacteriano (TRIGIANO, WINDHAM; WINDHAN, 2010; ROMEIRO, 2001; 2005).

A junção de características morfológicas e bioquímicas auxiliam na identificação do organismo em estudo, podendo ser um potencial agente danoso as culturas ou um promotor de crescimento vegetativo. Células bacterianas podem ser visualizadas como máquinas químicas que realizam reações graças a enzimas e complexos enzimáticos por elas mesmas sintetizados. A produção de determinado metabolito é regida pela geração de energia e as condições em que está inserido (ROMERO, 2005).

As células utilizam do metabolismo primário e secundário para sua replicação e crescimento. O metabolismo primário caracteriza-se pela geração de energia para as células. O metabólito secundário inclui a síntese de compostos que não são essenciais ao crescimento celular microbiano, sintetizados ao final do crescimento ou durante a fase estacionária (RODRIGUES, 2009; NEVES & RUMJANEK, 1998). A maioria dos metabólitos secundários são moléculas orgânicas complexas que requerem um grande número de reações enzimáticas para a sua síntese.

Enzimas são proteínas catalisadoras que atuam sobre substratos orgânicos e inorgânicos. Amplamente utilizadas nas diversas áreas das indústrias, suas propriedades hidrolíticas como proteases, amilases e lipases podem favorecer o desenvolvimento das tecnologias de produção de combustíveis líquidos, solventes, plásticos biodegradáveis, corantes, defensivos agrícolas, sabores, fragrâncias e produtos farmacêuticos para uso humano e veterinário, a partir de matérias primas renováveis, processos menos agressivos, economicamente viáveis e ecologicamente aceitáveis (RODRIGUES, 2009; FACCHIN, 2013).

As amilases são responsáveis pela degradação da molécula de amido e estão amplamente distribuídas na natureza. Apresentam grande importância biotecnológica, como aplicações nas indústrias têxteis, papel e celulose, de couro, detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (OLIVEIRA, 2007; RODRIGUES, 2009).

As lipases e as esterases são enzimas associadas ao metabolismo e à hidrólise dos lipídios. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos animais e vegetais e, também em células de microrganismos (RODRIGUES, 2009). Atuam como catalisadoras da quebra e formação da ligação éster, e reações de hidrólise e esterificação, transesterificação e lactonização com potencial aplicação, nas áreas da agricultura, de

alimentos e da indústria farmacêutica (PANDA & GOWRISHANKAR 2005; RODRIGUES, 2009)

A urease é uma enzima extracelular produzida por procariotos e eucariotos. A atividade hidrolítica da uréase dependerá da disponibilidade da fonte energética para os microrganismos. A amônia é o principal produto da hidrólise da uréase, pode ter vários destinos, ser imobilizado pelos microrganismos, absorvido pelos vegetais superiores, adsorvido pelos minerais de argila, além de ser oxidado a nitrato, iniciando assim o processo de nitrificação (LANNA et al., 2010).

Os métodos para análises morfológica, bioquímica e fisiológica dos organismos procariotos não fastidiosos são realizados pelo uso de meios de cultivo sintéticos, semissintéticos e de composição indeterminada (ROMEIRO, 2001). Alguns organismos possuem pleomorfismo, variando algumas características morfológicas e bioquímica de acordo com o meio em que foi inserido. Dessa maneira, deve-se ter conhecimento prévio dos organismos a ser trabalhado bem como o tempo de crescimento e sua manipulação em ambiente laboratorial.

2.4. VARIABILIDADE GENÉTICA EM BACTERIAS ENDOFITICAS E FITOPATOGENICAS

As bactérias que vivem no interior dos vegetais podem ser classificadas em endofíticas e fitopatogênicas, com base na relação com o hospedeiro e condições ambientais. Embora seja um consenso que toda bactéria endofítica seja capaz de residir parte do seu ciclo de vida podendo promover o crescimento da planta sem causar sintomas de doenças (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), dependendo das pressões e distúrbio do equilíbrio populacional, pode ocorrer reativação de um gene de virulência tornando-se um fitopatógeno (RODRIGUES, 2009; CARVALHO et al., 2016).

A colonização bacteriana é controlada pelas condições da planta e do solo, em que as bactérias podem influenciar diretamente as respostas das plantas em determinada condição do solo melhorando o seu desempenho. O dinamismo durante o ciclo de vida da bactéria é ajustado, dependendo do espécime, de sua fisiologia e necessidades (HALLMANN et al., 1998; CARVALHO et al., 2016)

Após a colonização de tecidos e órgãos vegetais pelos microrganismos fitopatogênicos houve um processo de evolução, tornando-se compatíveis com as respostas de defesa da planta, sem causar nenhum sintoma de sua presença, co-evolui de forma a promover o

crescimento vegetal de seu hospedeiro (BALDANI et al., 1997; BORGES, 2006). Entretanto, a expressão de defesa da planta contra um organismo pode variar em relação à espécie vegetal, sendo expressado um mecanismo de defesa específico ou uma resposta hipersensível.

As plantas por meio do sistema imune inato reconhecem os organismos invasores, por meio da percepção de moléculas não-autoconhecidas como padrões moleculares associados a micróbios ou patógenos. A flagelina é a principal proteína estrutural elicitador de respostas de defesa encontrada no flagelo bacterianos reconhecidas como padrões moleculares associados a micróbios ou patógenos tanto para bactérias benéficas como patogênicas, necessária para que ocorra a associação entre os envolvidos (CARVALHO et al., 2016; BUSCHART et al., 2012).

De acordo com o modelo de vias de sinalização putativas envolvidas no reconhecimento de plantas e bactérias diazotróficas descrito por Carvalho et al., (2016), o primeiro contato das bactérias endofíticas com as plantas utiliza os mecanismos similares aos padrões moleculares associados a patógenos. Após a ativação, as bactérias benéficas são reconhecidas como um potencial patogênico, ativando as vias de defesa das plantas. Paralelamente, alguns receptores com capacidade de reconhecer especificamente os sinais de uma bactéria benéfica desencadeariam os mecanismos que facilita a colonização bacteriana.

Possivelmente, os sinais de desenvolvimento, bióticos e abióticos podem atuar em conjunto, regulando as respostas desencadeadas pelos receptores da parede celular da planta para permitir a associação com bactérias benéficas que finalmente culminarão em adaptações de plantas para otimizar suas taxas de crescimento (CHOW; RAHMAN; TING, 2018).

De forma geral as bactérias endofíticas ocupam o mesmo nicho que os fitopatógenos e podem produzir metabólitos indutores de resistência sistêmica no hospedeiro e crescimento de plantas (BALDANI et al., 1997). Variáveis do ambiente e genótipos de plantas determinam a comunidade endofítica estrutural e composição podendo estas divergir em sua relação ao hospedeiro (LILIOTTI et al., 2017).

Até o momento, foram descritas apenas quatro espécies de bactérias diazotróficas fitopatogênicas. Das quatro, apenas *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi estudada em mais profundidade quanto a sua interação com a planta. Os demais citam apenas alguns isolados como fitopatógenos, não havendo estudos de inoculação em plantas, sintomatologia ou infecção. Daí a grande dificuldade de se conhecer a interação destes microrganismos com as plantas (BALDANI et al., 1997; DÖBEREINER et al., 1992).

2.5. IDENTIFICAÇÃO DE PROCARIOTOS FITOPATOGÊNICOS POR TESTES RÁPIDO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE

A reação de hipersensibilidade - HR em plantas é considerada como um dos principais eventos da resposta de defesa da planta contra o ataque de fitopatógenos (ROMEIRO, 2001).

O rápido e localizado colapso do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção do patógeno, e a manifestação dos genes de defesa da planta, causa a liberação de compostos tóxicos, os quais também atuam, em alguns casos, diretamente sobre o patógeno, ocasionando sua morte (AGRIOS, 2005).

A alteração provocada pela HR institui o estabelecimento de interações com a planta hospedeira, podendo estas ser compatíveis ou incompatíveis. Dentre as principais alterações existe a indução da produção de peroxidases, quitinases e β -1,3-glucanases, relacionadas com a patogenicidade. Outras respostas paralelas à infecção são o aumento da expressão de fenilalanina amônia liase (PAL) e deposição de lignina e aumento dos níveis de ácido salicílico (VERBENE et al., 2000).

A utilização do teste de hipersensibilidade em casos de patógenos hemibiotróficos ou necrotróficos ainda não estão totalmente elucidados, pois o organismo bacteriano pode obter fontes nutricionais oriundas de células vegetais mortas. No entanto, as interações com patógenos biotróficos obrigatórios, gera a morte celular no sítio de infecção, impedindo que estes tenham acesso a nutrientes, o que os levaria à morte (FERNANDES et al., 2009).

Em sentido específico o HR é a inoculação de bactérias fitopatogênicas em plantas ou órgãos vegetais destacados (ROMEIRO, 2001). O processo baseia-se na bioprospecção de uma suspensão bacteriana em folhas de uma planta não-hospedeira, fumo, tomate, pimentão, feijão, entre outras. Em casos em que há reação positiva a resposta da planta desenvolverá morte celular no local de infiltração em tempo aproximado de até 24 horas (SANTOS, 2011; ROMEIRO, 2001; AMARAL, 2012)

Com os avanços na genética molecular a manipulação do genoma para identificação de espécies fitopatogênicas se tornou mais rápida e apurada. As técnicas moleculares baseiam na amplificação de uma parte específica do DNA do genoma da bactéria de interesse, no entanto ainda é muito utilizado técnicas com o desenvolvimento de sondas fluorescentes e métodos sorológicos (BARROCAS et al., 2009). Entre as técnicas supracitadas a escolha da técnica deve se adequar ao patossistema analisado e às condições disponíveis para a execução dos trabalhos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL, ORIGEM E DESCRIÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia do Instituto Federal de Minas Geras – *Campus* São João Evangelista, situado no município de São João Evangelista e no laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, localizada no município de Diamantina, Minas Gerais. Foram realizadas análises bioquímicas e morfológica de caracterização do material genético microbiano e sua resposta a reação induzida de hipersensibilidade.

Os acessos microbianos foram isolados a partir de folhas e raízes de *E. cloesiana*, *E. urophilla* x *E. grandis* e *Corymbia citriodora*, de indivíduos saudáveis e isentos de sintomas visíveis de doenças e deficiência nutricional crescidos no banco de germoplasma da APERAM, em Itamarandiba, Minas Gerais, situado 1097 m de altitude entre as coordenadas geográficas 17°85'S de latitude e 42°85'W de longitude, no Alto Vale do Jequitinhonha (SIMÕES et al., 2015).

O material foi formado por 24 bactérias diazotróficas obtidas no processo de isolamento em meio de cultura semi-específico para os gêneros fixadores de nitrogênio biológico: *Azospirillum* spp, *Herbaspirillum* spp, *Burkholderia* spp e *Sphingomonas* spp. Para realização das caracterizações foram adquiridos 12 acessos de cada órgão vegetal, folhas e raízes (tabela 01).

Tabela 1 - Origem dos isolados microbianos encontrados em tecidos vegetais dependentes de meios de cultivo semi-específico.

Código de Acesso	Espécie	M. Cultura	Bactéria/ Gênero
			Folha
UFVJM-01	<i>E. cloeziana</i>	NFb	<i>Azospirillum</i> spp
UFVJM -05	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophilla</i>	NFb	<i>Azospirillum</i> spp
UFVJM -12	<i>C. citriodora</i>	NFb	<i>Azospirillum</i> spp
UFVJM -33	<i>E. cloeziana</i>	JNFb	<i>Herbaspirillum</i> spp e <i>Sphingomonas</i> spp
UFVJM -34	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophilla</i>	JNFb	<i>Herbaspirillum</i> spp e <i>Sphingomonas</i> spp
UFVJM -42	<i>C. citriodora</i>	JNFb	<i>Herbaspirillum</i> spp e <i>Sphingomonas</i> spp

Continua...

Código de Acesso	Espécie	M. Cultura	Bactéria/ Gênero
			Folha
UFVJM -68	<i>E. cloeziana</i>	JMV	<i>Burkholderia</i> spp
UFVJM -71	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophilla</i>	JMV	<i>Burkholderia</i> spp
UFVJM -74	<i>C. citriodora</i>	JMV	<i>Burkholderia</i> spp
UFVJM -101	<i>E. cloeziana</i>	LGI	<i>Burkholderia</i> spp, <i>Azospirillum</i> spp e <i>Sphingomonas</i> spp
UFVJM -108	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophilla</i>	LGI	<i>Burkholderia</i> spp, <i>Azospirillum</i> spp e <i>Sphingomonas</i> spp
UFVJM -109	<i>C. citriodora</i>	LGI	<i>Burkholderia</i> spp, <i>Azospirillum</i> spp e <i>Sphingomonas</i> spp
Raízes			
UFVJM -15	<i>E. cloeziana</i>	NFb	<i>Azospirillum</i> spp
UFVJM -17	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophilla</i>	NFb	<i>Azospirillum</i> spp
UFVJM -20	<i>C. citriodora</i>	NFb	<i>Azospirillum</i> spp
UFVJM -46	<i>E. cloeziana</i>	JNFb	<i>Herbaspirillum</i> spp e <i>Sphingomonas</i> spp
UFVJM -50	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophilla</i>	JNFb	<i>Herbaspirillum</i> spp e <i>Sphingomonas</i> spp
UFVJM -53	<i>C. citriodora</i>	JNFb	<i>Herbaspirillum</i> spp e <i>Sphingomonas</i> spp
UFVJM -75	<i>E. cloeziana</i>	JMV	<i>Burkholderia</i> spp
UFVJM -78	<i>E. grandis</i> x <i>E. urophilla</i>	JMV	<i>Burkholderia</i> spp
UFVJM -81	<i>C. citriodora</i>	JMV	<i>Burkholderia</i> spp
UFVJM -110	<i>E. cloeziana</i>	LGI	<i>Burkholderia</i> spp, <i>Azospirillum</i> spp e <i>Sphingomonas</i> spp
UFVJM -112	<i>E. grandis</i> x <i>E. Urophilla</i>	LGI	<i>Burkholderia</i> spp, <i>Azospirillum</i> spp e <i>Sphingomonas</i> spp
UFVJM -115	<i>C. citriodora</i>	LGI	<i>Burkholderia</i> spp, <i>Azospirillum</i> spp e <i>Sphingomonas</i> spp

NFb; JNFb; LGI (DÖBEREINER et al., 1995); JMV (BALDANI et al., 1986; 1996).

NFb; JNFb; LGI (DÖBEREINER et al., 1995); JMV (BALDANI et al., 1986; 1996).

3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E CULTURAL

Para caracterização morfológica celular e cultural os acessos foram crescidos em meio sólido Batata Malato (200 g.L⁻¹ de batata; 2,5 g.L⁻¹ açúcar cristal; 2,5 g.L⁻¹ ácido málico; 2,5 g.L⁻¹ KOH; 1 mL.L⁻¹ de solução de vitaminas; 2 mL.L⁻¹ de solução de micronutrientes; 2 gotas L⁻¹ de solução de azul de bromotimol a 0,5% (v/v), 15 g.L⁻¹ ágar, ajustando o pH em 7,0 com H₂SO₄ 5% (v/v)) (DÖBEREINER et al., 1995) e analisadas quanto a características fenotípicas para subsidiar o agrupamento e classificação microbiana através de dendrograma por meio da formação da matriz de distância binária entre isolados.

As características culturais utilizadas foram: forma da colônia (circular ou irregular), elevação (plana, lente, convexa, pulvinada, umbonada ou umbilicada), consistência (seca,

rugosa, gomosa), tamanho (pequena ≤ 1 mm, média $> 1 < 2$ mm e grande > 2 mm), coloração, borda (ondulada, lobada, denteada, filamentosa ou inteira), superfície (lisa, rugosa ou papilada) detalhe ótico (transparente, translúcido, brilhante, opaco) (YANO et al., 1993; HUNGRIA & ARAUJO, 1994) e gomosidade/consistência (pouco muco, muito muco ou seca; DÖBEREINER et al., 1995).

Tabela 2 - Parâmetros analisados na caracterização morfológica das colônias bacterianas, segundo YANO, 1993.

Características Avaliadas	
Tamanho: Anotar dimensão;	
Forma: circular ou irregular;	
Cor da colônia e centro: Anotar a coloração da pigmentação;	
Detalhe Óptico: Transparente, Translúcida, Opaca e Brilhante	
Elevação:	
	Plana
	Lente
	Convexa
	Pulvinada
	Umbonada
	Umbilicada
Borda:	
	Ondulada
	Lobada
	Denteada
	Filamentosa
	Inteira
Superfície:	
	Lisa
	Enrugada
	Papilada
	Rugosa

Para obtenção das células isoladas utilizou-se o método de estriamento composto, com incubações até 7 dias em câmara tipo B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (DÖBEREINER et al., 1995; BALDANI et al., 1986; 1996; DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999).

Para confirmação da capacidade de fixação biológica de nitrogênio os isolados foram cultivados em meio semi-específico isento de nitrogênio: 1 - Meio NFb para crescimento de *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* ($5,0\text{ g.L}^{-1}$ de ácido málico; $0,5\text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 ; $0,2\text{ g.L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,1\text{ g.L}^{-1}$ de NaCl ; $0,01\text{ g.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,002\text{ g.L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,00235\text{ g.L}^{-1}$ de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $0,0028\text{ g.L}^{-1}$ de H_3BO_3 ; $8,0 \times 10^{-5}\text{ g.L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 2 mL da solução 0,5% de azul de bromotimol em NaOH 0,2 M; 4 mL da solução de 1,64% de FeEDTA e pH ajustado para 6,5); 2 - meio LGI para crescimento de *Azospirillum amazonense*, *Burkholderia* spp e *Sphingomonas* spp ($5,0\text{ g.L}^{-1}$ de sacarose; $0,2\text{ g.L}^{-1}$ de K_2HPO_4 ; $0,6\text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 ; $0,2\text{ g.L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $0,02\text{ g.L}^{-1}$ de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,002\text{ g.L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $4,5\text{ g.L}^{-1}$ de KOH ; 2 mL da solução 0,5% de azul de

bromotimol em NaOH 0,2 M; 4 mL da solução de 1,64% de FeEDTA a pH 6,5, $1,0 \times 10^{-4}$ g.L⁻¹ de biotina e $2,0 \times 10^{-4}$ g.L⁻¹ de HCl-piridoxina e pH ajustado para 6,0 a 6,2); 3 - JNFb para crescimento de *Herbaspirillum* spp e *Sphingomonas* spp ($5,0$ g.L⁻¹ de ácido málico; $0,6$ g.L⁻¹ de K₂HPO₄; $1,8$ g.L⁻¹ de KH₂PO₄; $0,2$ g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; $0,1$ g.L⁻¹ de NaCl; $4,5$ g.L⁻¹ de KOH; $0,02$ g.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O; $0,002$ g.L⁻¹ de Na₂MoO₄.2H₂O; $0,00235$ g.L⁻¹ de MnSO₄.H₂O; $0,0028$ g.L⁻¹ de H₃BO₃; $8,0 \times 10^{-5}$ g.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O; $0,002$ g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O; 2 mL da solução 0,5% de azul de bromotimol em NaOH 0,2 M; 4 mL da solução de 1,64% de FeEDTA a pH 6,5, $1,0 \times 10^{-4}$ g.L⁻¹ de biotina e $2,0 \times 10^{-4}$ g.L⁻¹ de HCl-piridoxina e pH ajustado para 5,8); e 4 - JMV para crescimento de *Burkholderia* spp ($5,0$ g.L⁻¹ de manitol; $0,6$ g.L⁻¹ de K₂HPO₄; $1,8$ g.L⁻¹ de KH₂PO₄; $0,2$ g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; $0,1$ g.L⁻¹ de NaCl; $0,02$ g.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O; $0,002$ g.L⁻¹ de Na₂MoO₄.2H₂O; $0,00235$ g.L⁻¹ de MnSO₄.H₂O; $0,0028$ g.L⁻¹ de H₃BO₃; $8,0 \times 10^{-5}$ g.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O; $0,002$ g.L⁻¹ de ZnSO₄.7H₂O; 2 mL da solução 0,5% de azul de bromotimol em NaOH 0,2 M; 4 mL da solução de 1,64% de FeEDTA a pH 6,5, $1,0 \times 10^{-4}$ g.L⁻¹ de biotina e $2,0 \times 10^{-4}$ g.L⁻¹ de HCl-piridoxina e pH ajustado para 5,4). Os inóculos foram incubados por 5 dias a 30 °C e observados diariamente quanto a presença de película de coloração esbranquiçado, estas foram consideradas positivas para a presença de bactérias diazotróficas.

3.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Para caracterização bioquímica e fisiológica foram utilizadas a coloração de Gram e as enzimas catalase; oxidase, esterase, amilase, urease.

3.3.1 Coloração de Gram

Para diferenciação bacteriana de acordo com a composição da parede celular foi realizada a análise de coloração de Gram, segundo a metodologia descrita por Souza (2011) e Romeiro (2001), na qual as células de coloração violeta foram consideradas Gram-positivas e as de cor avermelhada Gram-negativas. Em paralelo utilizou o método alternativo de solubilidade da parede celular em solução de KOH a 3% (v/v), onde a presença de viscosidade indica dissolução da parede celular das bactérias gram-negativas e em contraposição a amostra permanecesse aquosa, evidenciando as bactérias gram-positivas.

3.3.2 Teste Enzimático

Os testes enzimáticos como oxidase, catalase, esterase, amilase e urease foi executada com base na metodologia descrita por Videira, Araújo e Baldani, 2007, Araújo et al., 2002 e Santos, 2015.

A análise da produção de enzima catalase é usada para distinção das bactérias, onde, decompõem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007; ARAÚJO et al., 2002). Para avaliação da presença da catalase uma gota de H_2O_2 3% foi depositada sob a cultura bacteriana a se testar, crescidas em placa de Petri por 48 horas. O resultado positivo foi caracterizado pelo desprendimento de gás imediatamente ou após, no máximo, cinco minutos.

Para avaliação da oxidase utilizou a solução de TEMED 1% (N-N-dimetil-p-fenilenediamino) sobre um papel de filtro impregnado com 2-3 gotas, onde foi depositado uma alçada de cada colônia bacteriana. O resultado positivo foi confirmado pelo aparecimento de coloração violeta sobre o papel após até 10 segundos (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007).

Para avaliação da atividade esterásica os isolados foram submetido a hidrólise de Tween-80, foram crescidos em 15 mL do meio sólido Sierra (1957) (10 g.L^{-1} de peptona, 5 g.L^{-1} de NaCl, $0,1\text{ g L}^{-1}$ de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 18 g.L^{-1} de ágar-ágar, pH ajustado para 7,4 e adicionado de 1% de Tween 80 (v/v) após esterilização do meio) por 96 horas a $28\text{ }^\circ\text{C}$. O resultado positivo foi caracterizado por um halo incolor ao redor da colônia bacteriana (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007).

Para avaliação da amilase os isolados foram incubados em 15 mL do meio de caseína glicerol sólido (10 g.L^{-1} de amido, 2 g.L^{-1} de KNO_3 , $0,3\text{ g.L}^{-1}$ de caseína, 2 g.L^{-1} de NaCl, 2 g.L^{-1} de K_2HPO_4 , $0,05\text{ g.L}^{-1}$ de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $0,002\text{ g.L}^{-1}$ de $CaCO_3$, $0,001\text{ g.L}^{-1}$ de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 15 g.L^{-1} de ágar, pH 7,0 – 7,5) e incubadas a $28\text{ }^\circ\text{C}$ por 72 horas. Após o crescimento as colônias foram cobertas com 10 mL de solução de lugol (100 g.L^{-1} de iodo, 60 g.L^{-1} de iodeto de potássio, 200 mL de água destilada e o volume completa para 1000 mL com etanol 95%). O resultado positivo foi caracterizado por um halo incolor ao redor da colônia bacteriana (ARAÚJO et al., 2002).

Para avaliação da atividade da urease um crescimento cultural bacteriano foi realizado em meio liquido LB (1 g.L^{-1} de Triptona, $0,5\text{ g.L}^{-1}$ estrato de levedura, 1 g.L^{-1} de NaCl, ajustando o pH a 7,0, NaOH 5N) por 12 horas a 28°C , $100\text{ }\mu\text{L}$ de suspensão contendo 10^8 UFC mL^{-1} (DO590 = 0,13) de cada bactéria foram adicionados 6 mL do meio de cultura

descrito por Dye (1962) (5 g.L⁻¹ de NaCl, 2 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 1 g.L⁻¹ de D-glucose, 15 g.L⁻¹ de ágar, vermelho fenol (0,0016%) e água, pH 6,8 – 7,0) com e sem adição de solução aquosa de ureia 20%, previamente esterilizada (concentração final de 2%) e incubado por 5 dias. O resultado positivo da hidrólise da ureia foi caracterizado pela alteração da coloração laranja para rosa purpura (SANTOS, 2015).

3.4 INDUÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE EM PLANTAS

A indução da reação de hipersensibilidade é utilizada como teste rápido de patogenicidade.

O teste de verificação da patogenicidade dos acessos bacterianos diazotróficos foi realizado em plantas não hospedeiras da bactéria. Utilizou-se o pimentão (*Capsicum annuum* group), fumo (*Nicotiana tabacum* L.) e o tomate (*Solanum lycopersicum*) como planta-teste. A produção das plantas foi realizada em casa de vegetação, sob sistema de irrigação de acordo com a capacidade de campo até atingir número superior a 10 folhas.

Os acessos foram multiplicados em meio sólido batata malato por 18-24 horas, na fase exponencial de crescimento. Após esse período, foram adicionados 1/3 da altura do tubo de solução salina a 0,85% de NaCl estéril e, com o auxílio de uma alça de repicagem raspou-se as colônias obtendo a suspensão das células nitidamente turva. As suspensões foram filtradas em gaze dupla, transferidas para tubos de ensaio e ajustadas para 0,1 de absorbância (D.O. 550) em espectrofotômetro que corresponde, aproximadamente, a 10⁸ células/mL. Em seguida as suspensões bacterianas foram infiltradas na face dorsal das folhas com auxílio de seringas descartáveis utilizadas para aplicação de insulina, sempre tangenciando as nervuras até que o local mude de coloração. Foram três inoculações de cada isolado por cada espécie de planta (pimentão, tomate e fumo). Após 24, 48 e 72 horas da inoculação, em ambiente com temperatura inferior ou igual a 30°C foi avaliado o aparecimento de possíveis reações de hipersensibilidade nas folhas das plantas não hospedeiras (ROMEIRO, 2001). A reação de hipersensibilidade quando positiva foi caracterizada por uma mudança no aspecto das folhas, com o colapso do tecido vegetal ao redor do sítio de infecção. Nos pontos de infiltração ocorre necrose das células (SANTOS, 2011).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O presente trabalho obteve resultados de cunho qualitativo, sendo trabalhado por meio do software GENES (CRUZ, 2013). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições. Os dados foram analisados em conjunto não paramétricos. Foram utilizados gráficos de dendrograma por meio da formação de matriz de distância binária entre isolados para descrever a população de microrganismos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização microbiana é indispensável para detecção de potenciais bactérias diazotróficas que permitam o desenvolvimento biotecnológico da agricultura e mercado industrial. A caracterização morfológica e bioquímica dos 24 acessos bacterianos associada ao teste de hipersensibilidade permitiu determinar/eliminar possíveis isolados virulentos a cultura de eucalipto.

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Ao avaliar o crescimento celular bacteriano em meio semi-sólido NFb, JNFb, LGI e JMV verificou-se que todos os isolados obtidos no banco de germoplasma obteve crescimento em microaerofilia, ou seja, os organismos são diazotróficos, com formação de película translúcida no meio em concentração de O_2 relativamente baixa. A fixação de N_2 só ocorre quando há uma redução de oxigênio em torno das colônias, podendo estas migrar de região onde a taxa de difusão de oxigênio é menor ou igual a taxa de respiração das bactérias (DOBËREINER, 1977).

Em meio de cultura sólido batata malato – BM os isolados provenientes de órgãos foliares e segmentos radiculares são majoritariamente de forma celular cocos, com 66,7% dos isolados, seguido da forma de bacilo com 25% e cocobacilo com 8,3% (Tabela 03). O arranjo celular é do tipo diplococos e diplobacilo, exceto os isolados UFVJM 05 com arranjo celular estreptobacilo.

A maioria dos isolados possuem características pleomórficas, ou seja, o aspecto morfológico cultural das bactérias altera de acordo com a fonte de carboidrato utilizado e as condições em que são submetidos. Em meio BM os isolados inicialmente possuem coloração esbranquiçada, podendo estas modificar a coloração gradualmente para diferentes tons, como creme, laranja, amarelo, amarelo claro, esverdeado e roxo (Figura 01).

Tabela 3 - Características morfológicas microbiana e cultural de bactérias diazotróficas endofítica isolados de folhas e raízes de Eucalipto

Isolado	Tamanho ¹	Forma	Coloração	Elevação	Borda	Superfície	Det. Ótico ²	Consistência ³	Forma Celular	Arranjo Celular
Órgão foliar										
UFVJM-01	P	Irregular	Esverdeado	Lente	Ondulada	Lisa	B. Transp	P. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-05	P	Irregular	Amarelo Claro	Lente	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Bacilo	Estreptobacilo
UFVJM-12	M	Irregular	Amarelo Claro	Pulvinada	Inteira	Lisa	B. Translu	M. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-68	P	Irregular	Creme	Convexa	Ondulada	Enrugada	B. Translu	P. Muco	Bacilo	Diplobacilo
UFVJM-71	P	Circular	Amarelo	Lente	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-74	P	Irregular	Creme	Lente	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Bacilo	Diplobacilo
UFVJM-33	P	Irregular	Creme	Lente	Ondulada	Lisa	B. Translu	P. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-34	M	Irregular	Amarelo Claro	Lente	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-42	G	Irregular	Amarelo Claro	Pulvinada	Inteira	Lisa	B. Translu	M. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-101	P	Irregular	Creme	Lente	Ondulada	Lisa	B. Translu	P. Muco	Bacilo	Diplobacilo
UFVJM-108	P	Irregular	Creme	Plana	Inteira	Lisa	B. Transp	Seca	Cocobacilo	Indefinido
UFVJM-109	P	Irregular	Branco	Lente	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Cocos	Diplococos
Órgão Radicular										
UFVJM-15	M	Irregular	Creme	Lente	Inteira	Lisa	B. Transp	P. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-17	M	Circular	Amarela Claro	Convexa	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-20	M	Irregular	Laranja Claro	Convexa	Ondulada	Lisa	B. Translu	P. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-46	G	Circular	Roxa	Pulvinada	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-50	M	Circular	Creme	Convexa	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-53	P	Circular	Creme	Lente	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Bacilo	Diplobacilo
UFVJM-75	P	Irregular	Amarelo Claro	Lente	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Cocobacilo	Indefinido
UFVJM-78	P	Irregular	Creme	Plana	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-81	G	Irregular	Creme	Pulvinada	Inteira	Lisa	B. Translu	M. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-110	P	Irregular	Amarelo Claro	Lente	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Bacilo	Diplobacilo
UFVJM-112	P	Irregular	Creme	Pulvinada	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Cocos	Diplococos
UFVJM-115	P	Circular	Branca	Lente	Inteira	Lisa	B. Translu	P. Muco	Cocos	Diplococos

¹ Tamanho: P - pequena ≤ 1 mm, M - média $> 1 < 2$ mm e G - grande > 2 mm; ² Detalhe ótico: Brilhante transparente (B. Transp), Brilhante Translucido (B. Translu); Consistência: pouco muco (P. muco), muito muco (M. muco). **Fonte:** o autor.

Figura 1 - Aspecto morfológico das culturas bacterianas em meio solido de batata malato.

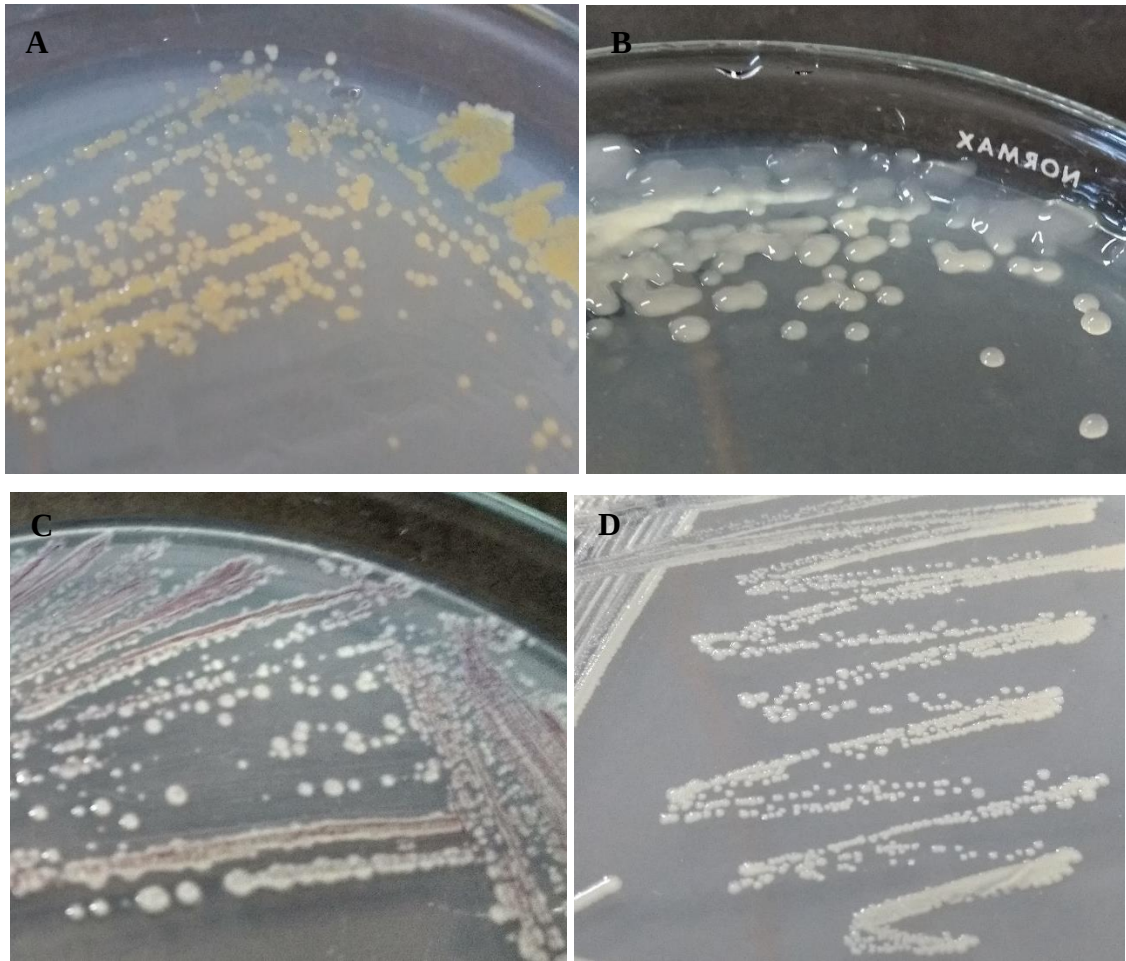


Figura A: colônia com coloração amarelada, pequena, < 1 mm de espessura, com formação irregular, elevação tipo lente e borda inteira. Superfície lisa com produção de pouco muco e detalhe ótico brilhante translúcida (Isolado UFVJM - 05).

Figura B: colônia com coloração amarelo claro, grande, ≥ 2 mm de espessura, com formação irregular, elevação tipo pulvinada e borda inteira. Superfície lisa com produção de muito muco e detalhe ótico brilhante translúcida (Isolado UFVJM - 42).

Figura C: colônia com coloração branca com mudança gradual á roxa, grande, ≥ 2 mm de espessura, com formação circular, elevação tipo pulvinada e borda inteira. Superfície lisa com produção de pouco muco e detalhe ótico brilhante translúcida (Isolado UFVJM - 46).

Figura D: colônia com coloração creme, média, $>1 < 2$ mm de espessura, com formação circular, elevação tipo convexa e borda inteira. Superfície lisa com produção de pouco muco e detalhe ótico brilhante translúcida (Isolado UFVJM - 50).

A caracterização morfológica das culturas possui similaridade quando comparado os isolados que possui o órgão de extração em comum. As colônias bacterianas apresentam 75% forma irregular, 79% borda inteira, 96% superfície lisa, 83,3% consistência com produção reduzida de muco, 54% com elevação lente e 25% pulvinada e 87,5% com brilho e translúcidas.

Embora o aspecto morfológico cultural e celular permita distinguir os isolados, há pouca precisão no momento da inferência da diversidade genética, sendo necessário a complementariedade com os aspectos fisiológicos e bioquímicos (ARAUJO, 2002; VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007).

Microrganismos diazotróficos do gênero *Azospirillum* spp e *Herbaspirillum* spp apresentam em sua maioria colônias úmidas e pequenas, com coloração inicialmente brancas, modificando sua pigmentação ao longo da incubação com presença de odor amoníaco após 48 horas (DOBEREINER; BALDANI E BALDANI, 1995). Os gêneros *Burkholderia* spp. e *Sphingomonas* spp. possuem grande variabilidade morfológica sendo difícil uma padronização da formação das colônias (RODRIGUES et al., 2006).

A morfologia das colônias é percebida até o sétimo dia, podendo variar a taxa de crescimento de acordo com o organismo cultivado e o meio em que foi submetido (VIDEIRA; ARAÚJO; BALDANI, 2007). Os isolados aqui analisados obtiveram crescimento rápido, entorno de 12 – 48 horas em meio de batata malato.

4.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

As características bioquímicas incluem informações de cultivo e adaptabilidade de crescimento em condições sub ótimas. Muito dessas atividades podem ser utilizadas em processos biotecnológicos (VIDEIRA, ARAUJO E BALDANI, 2007).

Os isolados quando analisados microscopicamente a constituição da parede celular por meio da coloração de Gram, apresentou características gram-negativa em 54,2% e gram-positiva 45,8% (Tabela 04).

Em diferentes estudos (SANTOS, 2011; GERMIDA et al., 1998; LIMA et al., 2011) da caracterização e isolamento de bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas identificou-se uma variabilidade na porcentagem de organismos classificados como gram-positivo ou seu oposto. Podendo essa característica está associada a espécie hospedeira e ou o veículo de isolamento destes organismos (IKEDA, 2010; KOBAYASHI E PALUMBO, 2000; SOUZA, 2011).

Tabela 4 - Características bioquímicas de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de folhas e raízes de Eucalipto

Isolado	PC ¹	Esterase ²	Amilase ²	Catalase ²	Oxidase ²	Urease ²
Órgão foliar						
UFVJM-01	-	+	-	+	-	+
UFVJM-05	-	-	-	+	-	+
UFVJM-12	-	-	-	+	-	-
UFVJM-68	+	-	-	+	-	+
UFVJM-71	-	-	-	+	-	-
UFVJM-74	-	-	-	+	-	+
UFVJM-33	+	+	-	+	-	+
UFVJM-34	+	-	-	-	-	+
UFVJM-42	+	-	-	+	-	+
UFVJM-101	-	-	-	+	-	-
UFVJM-108	+	-	-	+	-	+
UFVJM-109	-	-	-	+	-	-
Órgão Radicular						
UFVJM-15	-	-	-	+	-	-
UFVJM-17	+	+	-	+	-	+
UFVJM-20	-	-	-	+	-	-
UFVJM-46	-	+	-	-	-	+
UFVJM-50	+	+	-	+	-	+
UFVJM-53	+	-	-	+	-	+
UFVJM-75	-	-	-	+	-	-
UFVJM-78	-	-	-	+	-	-
UFVJM-81	+	-	-	+	-	+
UFVJM-110	+	-	-	+	-	-
UFVJM-112	+	+	-	-	-	-
UFVJM-115	-	+	-	+	-	+

¹ Constituição da Parede Celular; ²(-) reação negativa; (+) reação positiva. **Fonte:** o autor.

De acordo com Francis et al., (2010) as bactérias gram-positivas possuem diversas interações benéficas que as distingue de seus homólogos gram-negativo, no entanto, são organismos de difícil isolamento, visto que possuem peculiaridades quanto a constituição de meios de cultura utilizados hoje na pesquisa sobre endofitos.

A realização do teste de produção de oxidase verificou-se que nenhum dos isolados exibiu mudança de coloração do esfregaço que continha alíquota da suspensão bacteriana e solução aquosa de N-N-dimetil-p-denilenediamino. Desta maneira 100% dos isolados não possuem a capacidade de agir comoceptor final de elétrons.

A produção de amilase não foi detectada em nenhum dos isolados bacterianos. Em contrapartida 87,5% dos isolados possuem atividade da catalase positiva, ou seja, capaz de decompor a forma tóxica do peróxido de hidrogênio formando o oxigênio molecular, o qual

há uma dissociação da água com o oxigênio (Figura 02). Podendo estas agir em complexo enzimático semelhante como a peróxido-desmutase (ROMEIRO, 2005).

Figura 2 - Atividade Enzimática da catalase produzida por bactérias endofíticas diazotróficas para hidrólise do Peróxido de Hidrogênio.



Resultado negativo para atividade da catalase (imagem à esquerda) e catalase-positiva para o isolado a direita. O resultado positivo é caracterizado formação de oxigênio molecular liberado na reação da catalase com o peróxido de hidrogênio. **Fonte:** o autor.

Quando analisado a produção de uréase 58% dos isolados foram positivos, resultando na hidrólise da uréia, consequentemente na transformação da amônia. Justifica-se pelo aumento do pH do meio de cultura por meio da alteração da coloração de laranja para o rosa-púrpura (SANTOS, 2015) que pode ser observada na Figura 03.

O fornecimento de nitrogênio no solo é em sua maioria na forma de uréia. Para assimilação na planta o elemento sofrerá um processo de catalise pela urease, podendo esta ser de origem microbiana ou vegetal, ocorrendo a hidrólise da uréia com liberação de dióxido de carbono - CO_2 e amônia - NH_3 (MADUREIRA et al., 2014; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Figura 3 - Atividade Enzimática da urease na hidrólise da uréia produzida por bactérias endofíticas diazotróficas.

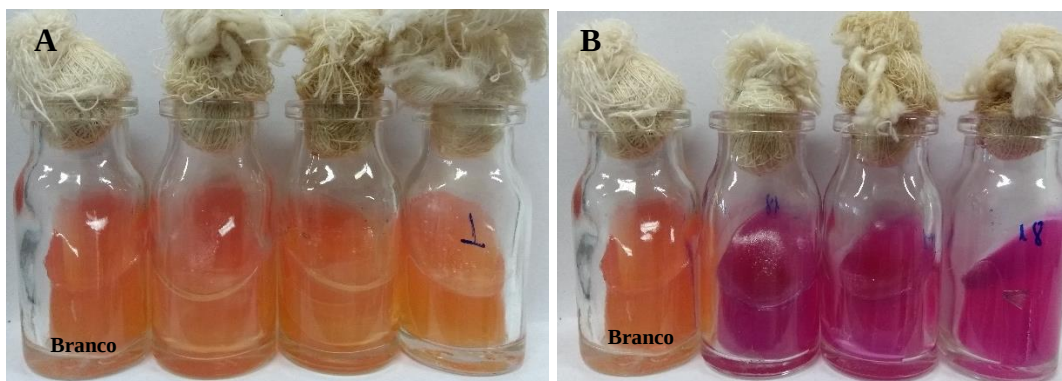


Figura A: resultado negativo para a hidrólise da uréia caracterizado pela inalterada coloração laranja para rosa púrpura (Isolado UFVJM-12).

Figura B: resultado positivo para a da hidrólise da uréia caracterizado pela alteração da coloração laranja para rosa púrpura (Isolado UFVJM-17). **Fonte:** o autor.

A atividade esterásica e lipídica foi verificada em 29,2%, dos quais 71,4% são de origem rizosférica (Tabela 04; Figura 04). Diante disso, os acessos UFVJM – 1; 33; 17; 46; 50; 112 e 115 são promissores isolados capaz de hidrolisar triacigliceróis, gerando como produto final de sua catálise, ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, digliceróis e glicerol.

Há diversas aplicações industriais para estes isolados, no entanto, estes isolado assim como os obtidos por Vieira et al., (2016) devem ser melhor estudados quanto aos parâmetros cinéticos para possível utilização em processos biotecnológicos.

Figura 4 - Atividade Enzimática esterásica/lipídica na hidrolise da Tween-80 produzida por bactérias endofíticas diazotróficas.

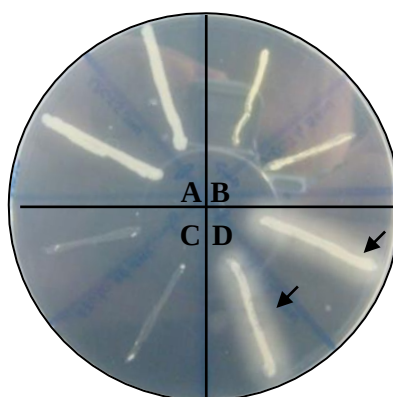


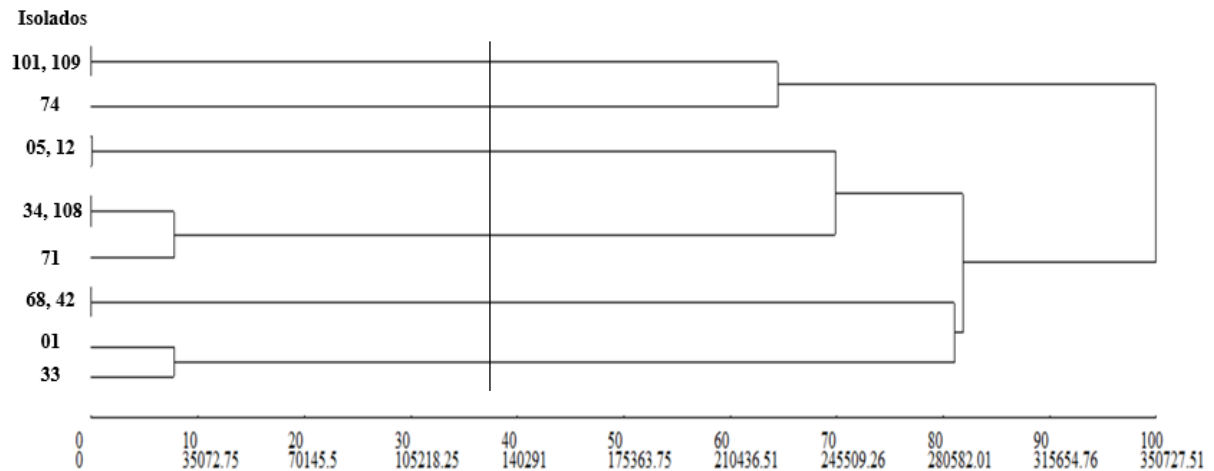
Figura A, B e C: Resultado negativo da hidrolise de Tween – 80 caracterizado pela inexistência da formação de halo ao redor das colônias.

Figura D: resultado positivo da hidrolise de Tween – 80 caracterizado pela formação de halo esbranquiçado ao redor da colônia bacteriana. Evidenciado por setas. **Fonte:** o autor.

4.3 DIVERSIDADE MORFOLOGIA E BIOQUÍMICA

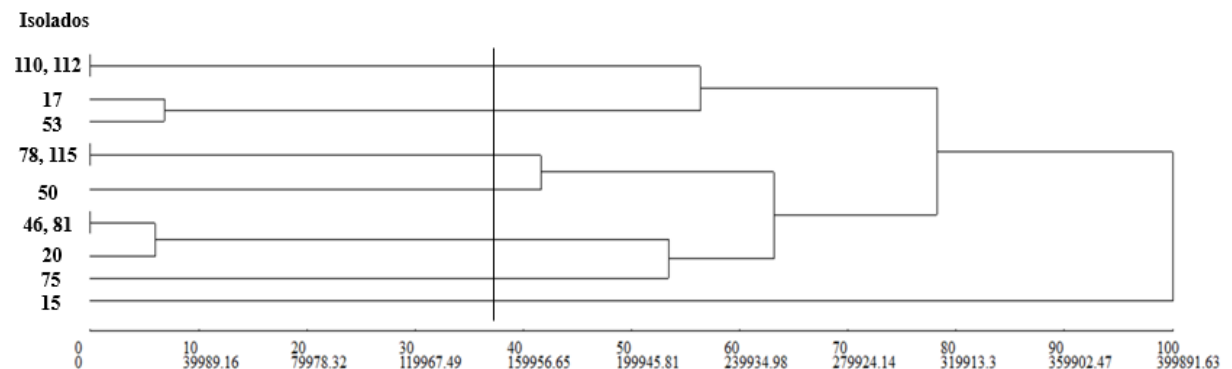
Para analisar a diversidade do banco de isolados utilizou os dois conjuntos de variáveis qualitativas, os caracteres morfológicos e bioquímicos descritos anteriormente (Tabela 03 e 04). Com base na distância entre os indivíduos dentro do grupo via método de UPGMA (Unweighed pair-group method using arithmetic averages) foram obtidos dois dendrogramas (Figura 05 e 06). Visto que a posição dos nichos ecológicos consiste em um indicativo de diferença microbiana, existe uma predisposição destes organismos na colonização por órgãos foliares ou radicular.

Figura 5 - Diversidade de isolados bacterianos endofíticos diazotróficos provenientes de órgãos foliares de genótipos de eucalipto.



Dendrograma obtido pelo método de UPGMA (Unweighed pair-group method using arithmetic averages) a partir das medidas de dissimilaridade entre 12 acessos bacterianos isolados de órgãos foliares de genótipos de eucalipto. O critério de corte foi a priori pela média aritmética da distância global entre os acessos

Figura 6 - Diversidade de isolados bacterianos endofíticos diazotróficos provenientes de órgãos radiculares de genótipos de eucalipto.



Dendrograma obtido pelo método de UPGMA (Unweighed pair-group method using arithmetic averages) a partir das medidas de dissimilaridade entre 12 acessos bacterianos isolados de órgãos radiculares de genótipos de eucalipto. O critério de corte foi a priori pela média aritmética da distância global entre os acessos.

A diversidade microbiana de endofitos encontrada em órgãos foliares gerou seis grupos distintos, em contrapartida nos órgãos radiculares obteve-se sete grupos (Figura 5 e 6; Tabela 05).

O agrupamento dos isolados extraídos de órgãos foliares demonstram o grau de similaridade dentro do grupo, ou seja, o isolado UFVJM – 74 que compõem o grupo II não compartilha muitas características compatíveis com os demais isolados, enquanto o grupo IV apresenta 3 acessos (UFVJM 34, UFVJM 108 e UFVJM 71) bacterianos similares.

Tabela 5 - Agrupamento dos acessos bacterianos diazotróficos isolados de folhas e raízes de eucalipto.

Grupo	Isolado Bacteriano	
	Órgãos Foliares	Órgãos Radiculares
I	UFVJM 101 e UFVJM 109	UFVJM 110 e UFVJM 112
II	UFVJM 74	UFVJM 17 e UFVJM 53
III	UFVJM 05 e UFVJM 12	UFVJM 78 e UFVJM 115
IV	UFVJM 34, UFVJM 108 e UFVJM 71	UFVJM 50
V	UFVJM 68 e UFVJM 42	UFVJM 46, UFVJM 81 e UFVJM 20
VI	UFVJM 01 e 33	UFVJM 75
VII	-	UFVJM 15

Fonte: o autor.

De acordo com o meio semi-seletivo de isolamento podemos supor quais gêneros estes acessos fazem parte (Tabela 1). Verifica-se que o grupo IV é formado por possíveis isolados dos gêneros *Herbaspirillum* spp. *Azospirillum* spp. e *Burkholderia* spp. indicando que diferentes gêneros possuem características morfológicas e bioquímicas similares. Vale ressaltar que essas características podem estar associadas ao tipo de interação com planta hospedeira, híbrido *E. grandis* x *E. urophila*. e qual foi material genético de extração.

Os demais grupos possuem isolados de plantas matrizes de genótipo distinto como: grupo I e V – *E. cloezina* e *C. citriodora*; grupo VI ambos os isolados são de origem de *E. cloezina*.

Resultados análogos foram observados no agrupamento dos isolados originados dos órgãos radiculares, formando no total de 13 grupos de organismos com conjunto de características diferentes ligado a um complexo genético. Os isolados 15, 50, 74 e 75 possuem maior distância de dissimilaridade, podendo estes apresentar codificação genéticas distintas dos demais.

A escolha de um determinado microrganismo para o programa de melhoramento será com base nas potencialidades apresentadas juntamente com o tipo de interação com a planta alvo. O agrupamento dos isolados com base na diversidade genética auxilia neste processo de identificação dos acessos, para continuidade dos testes de interação.

4.4 TESTE DE PATOGENICIDADE PELA INDUÇÃO DA REAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE

Os resultados negativos notados na reação de hipersensibilidade dos 24 isolados bacterianos no intervalo de tempo 24, 48 e 72 horas em plantas não alvo, indica ausência de bactérias fitopatogênicas (Tabela 6). Diante da diversidade e o número de acessos bacterianos, não há indícios que leve a eliminação de nenhuma estirpe por se tratar de um agente patogênico. Contudo, o teste de hipersensibilidade não pode ser utilizado como único parâmetro na detecção de patogenicidade, quando se deseja comprovar a virulência dos isolados para bioprospecção na planta de alvo (ROMEIRO, 2001).

Tabela 6 - Resposta da Reação de hipersensibilidade em função da interação bactérias endofíticas diazotróficas em plantas não hospedeira.

Isolado	Plantas não alvo		
	<i>Capsicum annuum group</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> L	<i>Solanum lycopersicum</i>
Órgão foliar			
UFVJM-01	-	-	-
UFVJM -05	-	-	-
UFVJM -12	-	-	-
UFVJM -33	-	-	-
UFVJM -34	-	-	-
UFVJM -42	-	-	-
UFVJM -68	-	-	-
UFVJM -71	-	-	-
UFVJM -74	-	-	-
UFVJM -101	-	-	-
UFVJM -108	-	-	-
UFVJM -109	-	-	-
Órgão Radicular			
UFVJM -15	-	-	-
UFVJM -17	-	-	-
UFVJM -20	-	-	-
UFVJM -46	-	-	-
UFVJM -50	-	-	-
UFVJM -53	-	-	-
UFVJM -75	-	-	-
UFVJM -78	-	-	-
UFVJM -81	-	-	-
UFVJM -110	-	-	-
UFVJM -112	-	-	-
UFVJM -115	-	-	-
Controle Positivo 1¹	+	+	+
Controle Positivo 2¹	+	+	+

¹Xantomonas spp. isolado patogênico de plantas de *Eucalyptus* spp.; (-) reação negativa; (+) reação positiva.

Fonte: o autor.

Algumas fitobactérias como a espécie *Agrobacterium tumefaciens* pode ser identificada como endofítica ao longo do estágio de desenvolvimento e quando submetida a diferentes pressões podem desencadear alterações na resposta de defesa da planta hospedeira

alterando o estado de associação de endofítico para patogênico. (ANDREOTE et al., 2008; KOGEL et al., 2006).

A utilização das plantas *Capsicum annuum* group (pimentão), *Nicotiana tabacum* L (fumo) e *Solanum lycopersicum* (tomate) se deve pela capacidade das bactérias fitopatogênicas induzirem a HR em plantas não alvo pelos genes de hrp, também responsável pelo crescimento bacteriano em plantas hospedeiras sem causar resposta a HR (Figura 7). Assim, os 24 isolados podem ser continuamente analisados para detecção de suas potencialidades biotecnológicas. Posteriormente os mesmos isolados poderão ser caracterizados geneticamente e infiltrados na planta alvo para observação da interação e sintomatologia entre o endofito-planta.

Figura 7 - Reação de hipersensibilidade exibida em folhas de Fumo (*Nicotiana tabacum* L.), Tomate (*Solanum lycopersicum*) e Pimentão (*Capsicum annuum* Mill) após infiltradas com suspensão de células de endófitos diazotróficos incompatíveis.



Figura A, B e C: resposta positiva para reação de hipersensibilidade das estirpes de fitobactérias *Xantomonas* sp. incompatíveis para as plantas de fumo, pimentão, tomate e susceptível para cultura do eucalipto. Evidenciando com setas os sintomas de clorose e morte celular seguida de necrose.

Figura D, E e F: resposta negativa para reação de hipersensibilidade das estirpes UFVJM 06; 35 e 16 para as plantas não alvo após a infiltração da suspensão bacteriana.

Fonte: o autor.

5. CONCLUSÃO

A diversidade microbiana dos nichos ecológicos, folhas e raízes, estão associados à planta hospedeira, podendo os grupos ser constituídos por gêneros bacterianos distintos, mas com especificidade ao genótipo da planta hospedeira de origem.

Todos os isolados bacterianos diazotróficos poderão ser utilizados em teste de bioprospecção devido a sua ação negativa para patogenicidade pelo teste de HR. No entanto, a exclusão total do efeito de patogenicidade se dará após testes de interatividade entre o organismo e a planta alvo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 5th ed., Academic Press, 2005.

AMARAL, L. S. **Avaliação de meios semi-seletivo e técnicas moleculares para detecção de *Xantomonas campestris* pv. *campestris***. 2012. 37f. Dissertação (mestrado em Fitopatologia) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2012.

ANDRADE, L. F.; SOUZA, G. L. O. D.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. A.; COSTA M. R.; CARDOSO, A. M. S.; PEREIRA, M. C. T.; PEREIRA, D. F. G. S. Analysis of the Abilities of Endophytic Bacteria Associated with Banana Tree Roots to Promote Plant Growth. **Journal of Microbiology**. v. 52. n. 1. p. 27-34. 2014.

ANDREOTE, F. D. et al., Transgenic tobacco revealing altered bacterial diversity in rizosphere during early plant development. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 93, p. 415-424, 2008.

ARAUJO, W. L.; LIMA, A. O. S; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUKLINSKY SOBRAL, J.; LACAVA P. T. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba, p. 86. 2002.

ARAUJO, W. L; MACCHERONI, J. R. W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I; BARROSO, P. A.V, SARIDAKIS H. O.; AZEVEDO J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**. vol. 47, p. 229–236. 2001.

BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; KIMURA, O.; DÖBEREINER, E J. **Bactérias fitopatogênicas fixadoras de N₂ em associação com plantas**. Seropédica- RJ, p. 1-26.1997.

BARROCAS, E. N.; MACHADO, J. C.; FIGUEIRA, A. R.; SOUZA, R. M.; ISHIDA, A. K. N.; ZACARONI, A. B.; ROCHA, H. S. Uso de técnicas moleculares para diagnose de patógenos em sementes. **Informe Agropecuário**. v. 30, n. 253, p. 24 – 32. 2009.

BORGES, L. E. **Caracterização estrutural da associação epifítica e endofítica entre microrganismos e plantas em um ambiente agrícola tropical**. 2006. 104f. Dissertação (Mestrado em Biociência e Biotecnologia). Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro Campos dos Goytacazes, Rio Janeiro. 2006.

BUSCHART, A.; SACHS, S.; CHEN, X. et al., Flagella mediate endophytic competence rather than act as MAMPS in rice-Azoarcus sp. strain BH72 interactions. **Mol Plant Microbe Interact**. v. 25. p.191–199. 2012.

CARVALHO, T. L. G.; BALLESTEROS, H. G. F.; THIEBAUT, F.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-leguminous plants. **Plant Molecular Biology**. p. 1-14. 2016. DOI 10.1007/s11103-016-0435-1.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v.35, n.3, p.271-276, 2013.

CHOW, Y. Y.; RAHMAN, S.; TING, A. S. Y. Interaction dynamics between endophytic biocontrol agents and pathogen in the host plant studied via quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) approach. **Biological Control**. V. 125, p. 44 -49. 2018.

DELEITO, C.S.R.; CARMO, M.G.F.; FERNANDES, M.C.A.; ABOUD, A.C.S. Ação bacteriostática do biofertilizante Agrobio in vitro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.23, n.2, p.281-284. 2005.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência & Cultura**. v. 44, p. 310- 313. 1992.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. (Embrapa Agrobiologia). Brasília. p. 60. 1995.

DÖBEREINER, J; ANDRADE, V.O.; BALDANI, V.L.D. Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia. (Embrapa Agrobiologia, Documentos, 110) Seropédica. p. 38. 1999.

FACCHIN, S. **Isolamento de microrganismos e seleção de enzimas microbianas com aplicações biotecnológicas no tratamento de esgoto**. 2013. 87f. Dissertação (doutorado em Genética) Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2013.

FERREIRA A. **Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplasma com *Eucalyptus***. 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP. 2008.

FONSECA, E. S.; PEIXOTO, R. S.; ROSADO A. S.; BALIEIRO, F. C.; TIEDJE, J. M.; RACHID C. T. C. C. The Microbiome of Eucalyptus Roots under Different Management Conditions and Its Potential for Biological Nitrogen Fixation. **Microbial Ecology**. v. 75. n 1. 183-191. 2017.

FRANCIS, I.; HOLSTERS, M.; VEREECKE, D. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.12, p. 1-12, 2010. GERMIDA, J. J. *et al.* Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 26, p. 43-50, 1998.

GOLLE, D. P.; REINIGER. L. R. S.; CURTI. A. R.; BEVILACQUA. C. B. Melhoramento florestal: ênfase na aplicação da biotecnologia. **Ciência Rural**. v.39, n.5. 2009.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOPPER, J. W. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 30, p. 925 – 937. 1998.

HUNGRIA, M; ARAUJO, R.S. Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola. (Embrapa Agrobiologia, Documento 46). Brasília, p. 542. 1994.

IBÁ - Indústria Brasileira de Árvores. Relatório Ibá 2017. p. 80. Disponível em < www.iba.org> Acesso em outubro de 2018.

IKEDA, A. C. **Caracterização morfofisiológica e genética de bactérias endofíticas isoladas de raízes de diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. 2010. 100f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

KOBAYASHI, D.; PALUMBO, J. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. **Microbial endophytes**, New York, v. 2, p. 199, 2000.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite what decides?. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p. 358–363, 2006.

LANNA, A. C.; SILVEIRA, P. M.; SILVA, M. B.; FERRARESI, T. M.; KLIEMANN, H. J. Atividade de uréase no solo com feijoeiro influenciada pela cobertura vegetal e sistemas de plantio. **R. Bras. Ci. Solo**. V. 34. p. 1933-1939. 2010.

LIOTTI, R. G.; FIGUEIREDO, M. I. S.; SILVA, G. F.; MENDONÇA, E. A. F.; SOARES, M. A. Diversity of cultivable bacterial endophytes in *Paullinia cupana* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. **Microbiological Research**. v. 207. p. 8-18. 2017.

LIMA, R. C.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; ANDREANI JUNIOR, R.; FONSECA, L. Caracterização Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Isoladas de Cana de Açúcar. **Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín**. v. 64, n.1, p. 5803-5813. 2011.

MADUREIRA, L. M.; RIBEIRO, R. C. F.; SOUZA, G. L. O. D.; XAVIER, A. A.; SILVA, F. J.; SILVA, C. M.; GOMES, I. C. P. **Avaliação da Produção de Uréase por Rizobactérias Isoladas de Raízes de Bananeira**. 2014

MIGUEL, P. S. B.; OLIVEIRA, M. N. V.; DELVAUX, J. C.; JESUS, G. L.; BORGES, A. C.; TÓTOLA, M. R.; NEVES, J. C. L.; COSTA, M. D. Diversity and distribution of the endophytic bacterial community at different stages of *E. growth*. **Antonie van Leeuwenhoek**. p. 1-17. 2016. DOI 10.1007/s10482-016-0676-7.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2º ed. Lavras. ed. UFLA. p. 729. 2006.

NEVES, M. C. P. & RUMJANEK, N. G. Ecologia das bactérias diazotróficas nos solos tropicais In Melo. I. S. & Azevedo. J. L. Ecologia Microbiana. ed. Embrapa -CNPMA, cap. 1. p. 15-60. 1998.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K; NÓBREGA, R.S.A; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**. v. 1 n. 2. p. 74-99. 2010.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A. F. Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. Campinas. v. 27 n.1. p. 61-66. 2007.

PANDA, T. & GOWRISHANKAR, B. S. Production and applications of esterases. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v. 67, p. 160-169. 2005.

PINTO J. V. E. **Caracterização e identificação de bactérias diazotróficas associativas oriundas de área de mineração de ferro.** 2017. 59f. Dissertação (mestrado em microbiologia e Processos bioquímicos do solo) Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras. 2017.

PURI, A. PADDA K. P., CHANWAY C. P. Evidence of nitrogen fixation and growth promotion in canola (*Brassica napus* L.) by an endophytic diazotroph *Paenibacillus polymyxa* P2b-2R. **Biology and Fertility of Soils.** v. 52. n 1. p.119-125. 2016.

ROESCH, L.F.W; OLIVARES, F.L; PASSAGLIA, L.M.P; SELBACH, P.A; SÁ, ELS; OLIVEIRA F.A. de. Camarg Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology & Biotechnology.** v. 22. n 9. p. 967 – 974. 2006.

ROESCH, L.F.W; FULTHORPE, R.R; JACCQUES, R.J.S; BENTO, F.M; CAMARGO, F.A.O. Biogeography of diazotrophic bacteria in soils. **World Journal of Microbiology & Biotechnology.** v. 26. p. 1503 – 1508. 2010.

RODRIGUES, L. S.; BALDANI, V. L.D.; REIS, V. M. R.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 41, n.2, p. 275-284. 2006.

RODRIGUES, A. A. **Atividade antimicrobiana e produção de enzimas de interesse biotecnológico de bactérias isoladas de diferentes habitats.** 2009. 68f. Dissertação (mestrado em microbiologia) Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Goiânia. 2009.

ROMEIRO, R. S. Reação de hipersensibilidade induzida por bactérias fitopatogênicas. **Revista Seiva**, Viçosa-MG, v. 33, p.13-40, 1973.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas.** ed. UFV. Viçosa. p. 279. 2001.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas.** ed. UFV. Viçosa. p. 417. 2005.

SANTOS, L. L. **Caracterização bioquímica, genética e patogênica de *Burkholderia andropogonis* e reavaliação taxonômica da espécie.** 2015. 101f. Dissertação (). Campinas SP. 2015.

SANTOS, S. A. **diversidade de bactérias endofíticas em bananeira ‘prata-anã’.** 2011. 116f. Dissertação (mestrado em Produção Vegetal). Janaúba- MG. 2011.

SILVA et. al., Nitrogen-Fixing Bacteria in Eucalyptus globulus Plantations. **PLoS ONE.** v. 9, n. 10, p. 1 - 12 . 2014

TAIZ, L. & ZIEGER, E. **Fisiologia Vegetal.** ed 4, p. 848. 2009

TRIGIANO, R. M.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. **Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório.** Porto Alegre. p. 576. 2010.

VIDEIRA, S. S.; ARAUJO, J. L. S.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas.** (EMBRAPA Agrobiologia, Documento 234). Seropédica, p.74. 2007.

WARD, D. M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a naturam community. **Nature**, London, v.345, p.63- 65, 1990.

YANO, D. M. Y; FARRIS, M. G.; UMINO, C. Y.; COUTINHO, H. L. C.; CANHOS, V. P. **Técnicas para cultivo, identificação e preservação de bactérias**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”. p. 64, 1993.

VERBERNE, M. C.; VERPOORTE, R.; BOL, J. F.; MERCADO-BLANCO, J. & LINTHORST, H. J. N. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. **Nature Biotechnology**. v. 18, p. 779–783. 2000.