

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

TESE

**Estudo da Comunidade de Bactérias Diazotróficas
do Gênero *Burkholderia* em Associação com Cana-
de-açúcar e Descrição de *Burkholderia silvatlantica***

Liamara Perin

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**ESTUDO DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO
GÊNERO *Burkholderia* EM ASSOCIAÇÃO COM CANA-DE-AÇÚCAR E
DESCRIÇÃO DE *Burkholderia silvatlantica***

LIAMARA PERIN

Sob a Orientação da pesquisadora
Veronica Massena Reis

e Co-orientação dos pesquisadores
Jean Luis Simões Araújo e
José Ivo Baldani

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutora em Ciências, no curso de
Pós Graduação em Agronomia,
Área de Concentração em Ciência
do Solo

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2007

633.61

P445e

T

Perin, Liamara, 1978

Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica* / Liamara Perin. – 2007
103 f.: il.

Orientador: Veronica Massena Reis.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 69-83.

1. Cana-de-açúcar – Nitrogênio – Fixação – Teses. 2. Cana-de-açúcar – Nutrição – Teses. 3. *Acetobacter diazotrophicus* – Teses. 4. Bactérias nitrificantes – Teses. I. Reis, Veronica Massena, 1961 - II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia.
III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO

LIAMARA PERIN

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/02/2007

Veronica Massena Reis. Dr. Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Eliana Gertrudes de Macedo Lemos. Dr. UNESP

Marcia Soares Vidal. Dr. Embrapa Agrobiologia

Fábio Bueno dos Reis Junior. Dr. Embrapa Cerrados

Eduardo Lima. Dr. UFRRJ

AGRADECIMENTOS

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao CPGA-CS, Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, pela oportunidade concedida.

À Embrapa Agrobiologia pelas condições oferecidas para o desenvolvimento desta tese.

À Dra. Verônica Massena Reis pela orientação, estímulo e oportunidades.

Aos Dr. Jean Luís Simões Araújo e José Ivo Baldani pela colaboração nesta tese.

Às Dra. Rosa Maria Pitard e Rosangela Stralotto pela colaboração nesta tese.

À Coordenação do curso de Agronomia – Ciência do Solo.

À Helma Ventura Guedes, grande companheira de inúmeras colaborações.

À Gabriela Cavalcanti Alves pelas inúmeras conversas e troca de experiências.

À grande mineira Silvia Maria de Oliveira, pela ajuda nesta tese, pelas longas conversas e pela oportunidade de ensinar.

Aos amigos para toda a vida, Luciana, Marivaine, Salomão, Joilson, Marinete, Danielle, Ricardo, Edílson, Elisete e Sandy.

Aos funcionários da Embrapa Agrobiologia, Antonio Lúcio, Wilson, Luis Carlos, Jorge, Marildo, Lívia, Aline, Telmo, Adriana, Fernando, Deise, Claudinho, Naldo, Luis e o grande Geraldo.

Aos colegas de curso do Departamento de Solos e da Embrapa Agrobiologia pela troca de conhecimentos e pelos momentos divertidos.

A todos dos Laboratórios de Gramíneas e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia, pelo auxílio e pela agradável convivência.

À minha família pelo apoio durante todos esses anos de estudo.

Ao Michel, o grande amor da minha vida.

BIOGRAFIA

A autora nasceu na Linha Para Pedro, comunidade do município de Quilombo, Estado de Santa Catarina, no dia 09 de outubro de 1978. Concluiu o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Professora Jurema Savi Milanez, em Quilombo. Em 1997, ingressou no curso de Ciências Agrícolas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, concluindo-o em fevereiro de 2001. Neste período, foi bolsista de Iniciação Científica na Embrapa Agrobiologia. Em março de 2001, ingressou no curso de Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e em fevereiro de 2003 defendeu a dissertação intitulada “Ecologia e diversidade de isolados do gênero *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar”. Nesta mesma Universidade, em março de 2003, iniciou o curso de Doutorado, concluindo na presente data o seu trabalho de Tese.

RESUMO GERAL

PERIN, Liamara. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 2007. 88f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2007.

A cultura da cana-de-açúcar no Brasil ocupa mais de seis milhões de hectares sendo importante economicamente pela geração de empregos e bastante promissora para a produção de energia. Dentre as *Poaceas* (gramíneas), é a cultura que mais recebe contribuições da fixação biológica de nitrogênio, porém ainda não se sabe ou não se conhece qual ou quais organismos são responsáveis pelos melhores resultados observados. Inúmeros gêneros de bactérias diazotróficas foram encontrados em associação com cana-de-açúcar, dentre eles o gênero *Burkholderia*, até o momento pouco estudado em associação com esta cultura. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrever uma nova espécie de bactéria diazotrófica do gênero *Burkholderia*. Para tal, foram coletadas amostras de plantas em canaviais de quatro estados brasileiros para contagem e isolamento da comunidade de bactérias utilizando os meios de cultura LGI e JMV. Os isolados foram caracterizados fisiologicamente, morfolologicamente e molecularmente. Foram obtidos 64 isolados diazotróficos do gênero *Burkholderia*, que apresentaram metabolismo versátil e diferiram dos padrões das espécies analisadas. Apenas cinco isolados foram identificados pela técnica de ARDRA, dois pertenceram a espécie *B. tropica* e três a *B. unamae*. Um grande grupo, com 32 isolados, apresentou mesmo perfil de restrição pela técnica de ARDRA e diferiu das espécies analisadas. O sequenciamento da região 16S rDNA de dois destes isolados mostrou que eles não pertencem às espécies já descritas. Este grupo obtido de plantas de cana-de-açúcar, juntamente com isolados similares, obtidos de milho e abacaxi, foi descrito como uma nova espécie de nome *B. silvatlantica*. A nova espécie de *Burkholderia* foi confirmada pelos experimentos de hibridização DNA:DNA, com apenas 30% de similaridade com a espécie mais próxima. *B. silvatlantica* fixou nitrogênio em condições microaerófilas, não apresentou capacidade de solubilização de fosfato inorgânico, não produziu hormônios vegetais e não apresentou capacidade de nodulação em leguminosas. Estes resultados confirmaram que o gênero *Burkholderia* é rico em espécies diazotróficas e estão presentes em diferentes habitats.

Palavras – chave: Fixação Biológica de Nitrogênio. *Poacea*. Caracterização de bactérias.

GENERAL ABSTRACT

PERIN, Liamara. **Community study of the of *Burkholderia* diazotrophic bacteria in association with sugarcane and description of *Burkholderia silvatlantica***. 2007. 88p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2007

The sugarcane crop in Brazil occupies almost six million hectares and it is economically important for the generation of jobs and energy production. Among the *Poaceas* species, it is the crop that receives more contributions from the biological nitrogen fixation, however until this moment it is unknown what organisms are responsible for the best results observed. Innumerable genres of diazotrophic bacteria were found in association with sugarcane, among them the genus *Burkholderia*. However little is known about this genus in association with sugarcane. The objective of this study was to isolate and to characterize diazotrophic *Burkholderia* bacteria in association with sugarcane, and to describe a new species of diazotrophic *Burkholderia* bacteria. For that, samples of plants were collected in four crop areas, in different Brazilian states, for counting and isolating the bacteria community using the culture medias LGI and JMV. The isolates were characterized physiological, morphologically and molecularly. Sixty-four *Burkholderia* diazotrophic isolates were gotten that presented versatile metabolism, and the majority differing from the analyzed species patterns. Only five isolates were identified by the ARDRA technique, two belonging to *B. tropica* species and three to *B. unamae*. A big group, with 32 isolates, presented the same restriction profile by the ARDRA technique and differed from the analyzed species. The sequencing of the 16S rDNA region of two of these isolates showed that they don't belong to the already described species. This group, from sugarcane plants together with similar maize and pineapple isolates, was described as a new species named *B. silvatlantica*. The characterization of this new *Burkholderia* specie was confirmed by the hybridization DNA: DNA technique, presenting only 30% of similarity with the closest species, and the sequencing of the 16S rDNA region. *B. Silvatlantica* fixed nitrogen in microaerophilic conditions, and it had no capacity of inorganic phosphate solubilization, it did not produce vegetal hormones and had no nodulation capacity in leguminous. These results confirmed that *Burkholderia* is a rich genus in diazotrophics species and colonize different habitats.

Key words : Biological Nitrogen Fixation. *Poacea*. Bacteria characterization.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características químicas dos solos onde as variedades de cana-de-açúcar foram mantidas.....	13
Tabela 2: Iniciadores utilizados para sequenciamento do gene 16S rDNA.....	18
Tabela 3: Número de células ($\times 10^4$) por grama de peso fresco de bactérias diazotróficas associadas à variedades de cana-de-açúcar coletadas no estado do Rio de Janeiro.....	20
Tabela 4: Padrão de restrição e dados ecológicos dos isolados diazotróficos do gênero <i>Burkholderia</i> obtidos de plantas de cana-de-açúcar. (Continua).....	32
Tabela 4: Continuação.....	33
Tabela 5: Número de células de bactérias diazotróficas por grama de peso fresco de amostras ($\times 10^4$) associadas ao milho híbrido Aventis A2345, cultivado em Seropédica-RJ.....	55
Tabela 6: Dados ecológicos e padrão de restrição da região 16S rDNA dos isolados diazotróficos do gênero <i>Burkholderia</i> spp. obtidos da rizosfera de plantas de milho, híbrido Aventis A2345, coletado em Seropédica-RJ, comparando com padrões do gênero.....	56
Tabela 7: Porcentagem de hibridização entre “ <i>B. silvatlantica</i> ” e espécies mais próximas pelo sequenciamento da região 16S rDNA.....	57
Tabela 8: Diferenças na utilização de fontes de carbono pela estirpe padrão de <i>B. silvatlantica</i> e espécies diazotróficas. Os dados foram obtidos utilizando o Kit BIOLOG. 1) Estirpe padrão de <i>B. silvatlantica</i> BR1911 ^T ; 2) BR 1366 (<i>B. tropica</i>); 3) BR11340 (<i>B. brasilensis</i>); 4) KP23 (<i>B. kururiensis</i>); 5) TVV75 (<i>B. vietnamiensis</i>); 6) ATCC25416 (<i>B. cepacia</i> , Gen. I); 7) MTI641 (<i>B. unamae</i>); 8) IPT101 (<i>B. sacchari</i>); 9) STM678 (<i>B. tuberum</i>); 10) STM815 (<i>B. phymatum</i>).....	60
Tabela 9: Dados ecológicos dos isolados da espécie <i>B. silvatlantica</i>	61
Tabela 10: Capacidade de crescimento em meio de cultura semi-sólido por estirpes diazotróficas de diferentes gêneros.....	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Número de isolados tipo *Burkholderia* spp. obtidos de variedades de cana-de-açúcar através dos meios de cultura JMV e LGI. RB72-454a: planta coletada em Seropédica, RJ; RB72-454b: planta coletada em Paranavaí, PR.....22
- Figura 2:** Dendrograma de similaridade de isolados do gênero *Burkholderia* spp., provenientes de variedades de cana-de-açúcar e das estirpes padrões de *B. vietnamiensis* (TVV75), *B. kururiensis* (KP23), *B. tropica* (BR11366), *B. cepacia* (ATCC25416), *B. unamae* (MTI641), *B. phymatum* (STM815) e *B. tuberum* (STM678) e espécie proposta *B. brasiliensis* (BR11340). Este dendrograma foi gerado no programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir da utilização de fontes de carbono pelo sistema BIOLOG.....24
- Figura 3:** Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação das regiões 16S flanqueada pelos iniciadores específicos para o gênero *Burkholderia*, Burk3 e BurkR. Legenda: (M) Marcador de peso molecular, 1 kb; (1) BR11366, controle positivo da reação, padrão da espécie *B. tropica*; (2 a 14) isolados e (15) água como controle negativo da reação.....25
- Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação do gene *nifH* de isolados do gênero *Burkholderia* obtidos de cana-de-açúcar. Legenda: (M) Marcador de peso molecular, 1 kb; (1) BR11366, controle positivo da reação, padrão da espécie *B. tropica*; (2 a 8) isolados e (9) água como controle negativo da reação.....26
- Figura 5:** Quantificação da FBN utilizando a técnica de ARA em isolados de *Burkholderia* spp. provenientes de cultivares de cana-de-açúcar e estirpes padrões. Estirpe BR11340 (*B. brasiliensis*), TVV75 (*B. vietnamiensis*), KP23 (*B. kururiensis*), BR11366 (*B. tropica*), ATCC25416 (*B. cepacia*), MTI641 (*B. unamae*), STM815 (*B. phymatum*) e STM678 (*B. tuberum*). Valores referentes a média de três repetições.....27
- Figura 6:** Morfologia de colônias em meio de cultura JMV de isolados do gênero *Burkholderia* spp. obtidos de plantas de cana-de-açúcar. A: isolado BR12132; B: isolado BR12133; C: isolado BR12116.....28
- Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação das regiões 16S flanqueada pelos iniciadores específicos Y1 e Y3. Legenda: (M) Marcador de peso molecular; (1) água como controle negativo da reação; (2) BR11366, controle positivo da reação, (3 a 14) isolados.....29
- Figura 8:** Perfil eletroforético gerado pela digestão com enzimas de restrição da região 16S rDNA dos isolados e estirpes padrões de *Burkholderia* com as enzima *MspI* (Figuras A, B e C). Legenda: M: marcador de 100 pb; A: isolado BR12164; G: isolado BR12131; F: isolado BR12215; E: isolado BR12219; H: isolado BR12171; D: estirpe BR 12134; I: isolado BR12207; C: isolado BR12125; B: isolado BR12211; O: isolado BR12132; J: isolado BR12133; R: estirpe TVV75 (*B. vietnamiensis*); Q:estirpe IPT101 (*B. sacchari*); S:estirpe STM815 (*B. phymatum*); T:estirpe STM678 (*B. tuberum*).....29

Figura 9: Perfil eletroforético gerado pela digestão com enzimas de restrição da região 16S rDNA dos isolados e estirpes padrões de *Burkholderia* com as enzima *AluI* (Figuras A e B). Legenda: M: marcador de 100 pb; F: isolado BR12164; G: isolado BR12131; B: isolado BR12132; D: isolado BR12119; I: isolado BR12214; A: isolado BR 12121; R: isolado BR12212; N: isolado BR P: isolado BR12130; Q: isolado BR12211; L: isolado BR11916.....30

Figura 10: Perfil eletroforético gerado pela digestão com enzimas de restrição da região 16S rDNA dos isolados e estirpes padrões de *Burkholderia* com as enzima *HhaI* (Figuras A e B). Legenda: M: marcador de 100 pb; C: isolados BR12164, BR12116, BR12165, A: isolado BR12119; G: isolados BR12131; H: isolado BR12171; I: isolados BR12121, BR11916 e estirpe BR11340 (*B. brasilensis*); D: isolado BR 12211; E: isolado BR12214; B: isolado BR12212; P: isolado BR12118.....30

Figura 11: Perfil eletroforético gerado pela digestão com enzimas de restrição da região 16S rDNA dos isolados e estirpes padrões de *Burkholderia* com as enzima *HinfI* (Figuras A e B). Legenda: M: marcador de 100 pb; G: isolados BR12164, BR12116, BR12166, BR12165, BR12129, BR12155, BR12177, BR12156, BR12120, BR12208, BR12169, BR11920, BR11921, BR11922 e BR11924; C: isolados BR12131 e BR12133; D: isolado BR12132; B: isolado BR11916 e estirpes BR11340 (*B. brasilensis*), TVV75 (*B. vietnamiensis*) e KP23 (*B. kururiensis*), E: isolados BR12179, BR12207 e BR12212; H: isolado BR 12211; J: isolado BR12209; F: isolado BR12218.....31

Figura 12: Perfil eletroforético gerado pela digestão com enzimas de restrição da região 16S rDNA dos isolados e estirpes padrões de *Burkholderia* com as enzima *DdeI* (Figuras A, B e C). Legenda: M: marcador de 100 pb; K: isolado BR12164; G: isolado BR12130; H: isolado BR12131; E: isolado BR12133; C: isolado BR11916; A: estirpe BR 11340 (*B. brasilensis*); D: estirpe KP23 (*B. kururiensis*).....31

Figura 13: Dendrograma de similaridade de isolados do gênero *Burkholderia* spp., provenientes de variedades de cana-de-açúcar e das estirpes padrões *B. vietnamiensis* (TVV75), *B. kururiensis* (KP23), *B. tropica* (BR11366), *B. cepacia* (ATCC25416), *B. unamae* (MTI641), *B. phymatum* (STM815) e *B. tuberum* (STM678) e espécie proposta *B. brasilensis* (BR11340). Este dendrograma foi gerado no programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir da digestão com enzimas de restrição da região 16S rDNA amplificada por PCR.....35

Figura 14: Análise filogenética da sequência do gene 16S rDNA dos isolados diazotróficos BR11920 e BR12116, obtidos de cana-de-açúcar, comparados às espécies de *Burkholderia* presentes no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). As seqüências foram alinhadas no programa CLUSTALW, e agrupadas pelo método Neighbour-joining no programa MEGA com 1000 repetições. O número de acesso dos isolados ao banco de dados se encontra entre parênteses.....37

Figura 15: Análise filogenética da sequencia do gene 16S rDNA de isolados diazotróficos do gênero *Burkholderia* comparados às espécies de *Burkholderia* presentes no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). As seqüências foram alinhadas no programa CLUSTALW, e agrupadas pelo método Neighbour-joining no

programa MEGA com 1000 repetições. O número de acesso dos isolados ao banco de dados se encontra entre parênteses. Isolados BR11920 e BR12116, de cana-de-açúcar, isolados BR11907 e BR11911 de milho e BR11563 de abacaxi.....58

Figura 16: Fotomicrografia de uma célula de *B. silvatlantica* (BR11911) apresentando flagelos polares, obtida em microscópio eletrônico de transmissão em aumento de 12000 vezes.....59

Figura 17: Dendrograma de similaridade de isolados da nova espécie *B. silvatlantica* (BR11563 e BR11680 de abacaxi; BR12155, BR12173, BR12116, BR12156, BR12169, BR12120 e BR12154 de cana-de-açúcar; BR11905 e BR11911^T de milho) e estirpe padrão de *B. vietnamiensis* (TVV75), *B. kururiensis* (KP23), *B. tropica* (BR11366), *B. cepacia* gen I (ATCC25416), *B. unamae* (MTI641), *B. phymatum* (STM815), *B. tuberum* (STM678), *B. sacchari* (IPT101) isolados da espécie proposta *B. brasiliensis* (BR11340) e *Burkholderia* spp. (M159, M171, M209, M149, BR3407, BR3429 e BR3469). Dados obtidos pelo padrão de AFLP usando os primers específicos *EcoRI* + A e *MseI* + C. O dendrograma foi gerado pelo programa GelCompar, utilizando o algoritmo UPGMA e índice Jaccard.....64

LISTA DE ABREVIações

NMP	Número Mais Provável
ARA	Atividade da Redução de Acetileno
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ATP	Adenosina trifosfato
rDNA	DNA ribossomal
<i>nif</i>	Gene que codifica a nitrogenase
<i>nifH</i>	Gene que codifica para Fe-proteína ou componente II da nitrogenase.
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
TAE	Tris, Acetato, EDTA
TBE	Tris, Burato, EDTA
TE	Tampão Tris, EDTA
ARDRA	Análise de Restrição da Região 16S rDNA Amplificada
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
AFLP	Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos Amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism)
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I	3
ESTUDO DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO GÊNERO <i>Burkholderia</i> EM ASSOCIAÇÃO COM CANA-DE-AÇÚCAR	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO	6
1.1 A cultura da Cana-de-açúcar	6
1.2 Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico (FBN).....	7
1.3 Bactérias Diazotróficas em Cana-de-açúcar.....	7
1.3.1 Gênero <i>Herbaspirillum</i>	8
1.3.2 Gênero <i>Gluconacetobacter</i>	9
1.3.3 Gênero <i>Burkholderia</i>	9
1.4 FBN em Cana-de-açúcar.....	10
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 Coleta de Amostras	12
2.2 Contagem e Isolamento	13
2.3 Oxidação de Fontes de Carbono (BIOLOG)	14
2.4 Identificação do Gênero <i>Burkholderia</i>	15
2.5 Detecção do Gene <i>nifH</i> e Determinação da Atividade da Nitrogenase	15
2.5.1 Amplificação da região do gene <i>nifH</i> da nitrogenase	15
2.5.2 Atividade da nitrogenase	16
2.6 Caracterização Morfológica dos Isolados.....	17
2.7 Amplificação da Região 16S rDNA e Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado	17
2.8 Sequenciamento da Região 16S rDNA.....	18
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1 Contagem e Isolamento	19
3.2 Oxidação de Fontes de Carbono (BIOLOG).....	22
3.3 Identificação do Gênero <i>Burkholderia</i>	25
3.4 Determinação da Atividade da Nitrogenase	25
3.5 Caracterização Morfológica de Colônias.....	28
3.6 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificados (ARDRA)	28
3.7 Sequenciamento da Região 16S rDNA.....	36
4 CONCLUSÕES	38
CAPÍTULO II	39
DESCRIÇÃO DE <i>Burkholderia silvatlantica</i> , UMA NOVA ESPÉCIE DE BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA.....	39
RESUMO	40
ABSTRACT	41
1 INTRODUÇÃO	42
1.1 Descrição do Gênero <i>Burkholderia</i>	42

1.2 Distribuição e Diversidade	42
1.3 Patógenos em Humanos e Animais	44
1.4 Patógenos em Plantas	44
1.5 Promoção de Crescimento em Plantas.....	45
1.6 Espécies Diazotróficas em Leguminosas.....	46
1.7 Espécies Diazotróficas em Plantas Não Leguminosas	46
2 MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 Isolamento em Plantas de Milho.....	48
2.2 Hibridização DNA : DNA	48
2.3 Temperatura e pH Ideal de Crescimento	48
2.4 Tamanho e Forma da Célula	49
2.5 Observação de Cápsulas	49
2.6 Oxidação de Fontes de Carbono	49
2.7 Produção de Hormônio de Crescimento (AIA – ácido indol acético)	49
2.8 Avaliação da Capacidade de Solubilização de Fosfatos	50
2.9 AFLP (Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos Amplificados) ...	50
2.9.1 Digestão com enzimas de restrição e ligação dos adaptadores....	50
2.9.2 Reação de pré-amplificação.....	51
2.9.3 Reação de amplificação seletiva	51
2.9.4 Marcação radioativa dos iniciadores específicos.....	51
2.9.5 Confeção do gel	51
2.9.6 Migração das amostras	52
2.9.7 Avaliação dos resultados	52
2.10 Capacidade de Nodulação e Promoção de Crescimento.....	52
2.10.1 Isolados bacterianos testados	52
2.10.2 Preparo dos inóculos	53
2.10.3 Preparo das sementes	53
2.10.4 Montagem e condução dos experimentos	53
2.10.5 Parâmetros analisados.....	53
2.11 Cultivo em Meio de Cultura Semi-sólido	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1 Isolamento em Plantas de Milho.....	55
3.2 Hibridização DNA:DNA	56
3.3 Descrição de <i>Burkholderia silvatlantica</i>	57
3.4 Produção de Hormônio de Crescimento (AIA – ácido indol acético)	62
3.5 Avaliação da Capacidade de Solubilização de Fosfatos	62
3.6 AFLP (Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos Amplificados) ...	62
3.7 Capacidade de Nodulação e Promoção de Crescimento.....	64
3.8 Cultivo em Meio de Cultura Semi-sólido	65
4 CONCLUSÕES	67
CONCLUSÕES GERAIS.....	68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
ANEXO	84

INTRODUÇÃO GERAL

Historicamente a cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, sendo cultivada desde a época da colonização. Possui múltipla utilização, podendo ser empregada na forma de forragem para alimentação animal e como matéria prima para fabricação de cachaça, açúcar e álcool. Ainda seus resíduos podem ser usados como fertilizante e o bagaço, que representa 30% da cana moída, possui potencial para produção de energia.

O cultivo da cana-de-açúcar no Brasil foi estimulado por programas energéticos. Em 1975, com a criação do Proálcool, o maior programa de utilização de biomassa para produção de energia do mundo, houve um aumento da área plantada. Posteriormente, em meados da década de 80, com as quedas dos preços do petróleo, o álcool tornou-se pouco competitivo. Atualmente, com as crescentes elevações dos preços internacionais do petróleo, o cultivo de cana-de-açúcar torna-se novamente promissor. Apoiado também pela crescente preocupação ambiental, tendo no álcool um combustível que reduz emissão de monóxido de carbono, hidrocarbonetos e óxidos de nitrogênio, se comparado com carros a gasolina, e ainda mais devido ao reconhecimento pela comunidade internacional, do uso da cultura da cana-de-açúcar para seqüestrar carbono atmosférico.

Trinta anos depois do início do Proálcool, o Brasil vive agora uma nova expansão dos canaviais com o objetivo de oferecer em grande escala, um combustível alternativo e com a possibilidade de obter créditos de carbono. O plantio avança além das áreas tradicionais, do interior paulista e do Nordeste, e espalha-se pelos estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás. Em 2006, a área plantada cresceu para mais de seis milhões de hectares e estimativas apontam para aumento na produção e área plantada para os próximos anos. Porém, este crescimento exacerbado, levou alguns municípios a limitarem a área de cultivo de cana-de-açúcar.

Apesar das vantagens ambientais, algumas práticas de manejo do cultivo de cana-de-açúcar contribuem para a degradação ambiental. Cultivada em larga escala, provoca perda de biodiversidade, e a utilização da queima para despalha dos colmos, contribui para poluição ambiental pela emissão de CO₂, perda de biodiversidade e elementos minerais como N, S e C, afetando a estrutura física e química do solo. Iniciativas para minimizar o impacto ambiental estão sendo adotadas, como a Lei nº 11.241 de 19 de setembro de 2002, para o estado de São Paulo, que prevê a eliminação gradual da queima da cana, e sua erradicação até o ano de 2021 para áreas mecanizáveis e até 2031 para áreas não mecanizáveis.

Visando contribuir para a redução do impacto ambiental do cultivo da cana, estão sendo desenvolvidos estudos com Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) na cultura. O nitrogênio é o segundo nutriente mais exigido em seu ciclo de produção. Além do alto custo econômico, é facilmente perdido por volatilização e lixiviação. Atualmente, sabe-se que esta planta se associa com bactérias diazotróficas, que podem suprir com até 70% do nitrogênio necessário para seu desenvolvimento, no entanto, a eficiência da FBN sofre influência do genótipo da planta e manejo da cultura.

Inúmeras espécies de bactérias diazotróficas se associam com plantas de cana-de-açúcar, porém até o momento, não se sabe qual ou quais são as responsáveis pela elevada contribuição observada em alguns casos. Visando contribuir com os estudos de FBN na cultura, este trabalho propôs estudar a comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*. Este gênero possui metabolismo muito versátil e é um importante componente da comunidade microbiana estando presente em inúmeros ambientes.

O trabalho foi conduzido sob a hipótese de que bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* se associam com plantas de cana-de-açúcar e sendo uma bactéria versátil, isolada dos mais diversos ambientes, a sua diversidade possa ser elevada também em amostras de tecidos e solo da rizosfera desta cultura. Os objetivos da pesquisa foram: contar, isolar, caracterizar e avaliar a diversidade da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar. Os resultados serão mostrados em 2 capítulos, contendo no primeiro os resultados obtidos na contagem da população de bactérias, seguido de isolamento, caracterizações fisiológicas, morfológicas e moleculares e análise da diversidade dos isolados obtidos. Do total de isolados, um grupo se diferenciou dos demais e foi proposto como nova espécie, de nome *Burkholderia silvatlantica*, descrita no capítulo 2.

A descrição de *B. silvatlantica* contribuirá para o inventário da biodiversidade brasileira. O Brasil é reconhecido como um dos países que apresenta elevados índices de biodiversidade animal e vegetal. E como microrganismos vivem geralmente associados às plantas e animais, é esperado que o Brasil possua também elevada diversidade microbiana, ainda pouco explorada. Apresentam alto potencial biotecnológico, e constantemente são lançados produtos à base de microrganismos, como fármacos, cosméticos, enzimas, alimentos, corantes, aromáticos, bioinseticidas, promotores de crescimento vegetal, solubilizadores de fosfatos, entre outros. A descoberta de novos microrganismos bem como sua classificação é importante para o conhecimento desta biodiversidade e sua adequada exploração.

Espera-se que este estudo possa ampliar o conhecimento sobre FBN na cultura da cana-de-açúcar, principalmente sua interação com bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*. Ainda, contribuir como base para novos estudos com a espécie proposta, que pela sua constante presença e ampla distribuição em cana-de-açúcar e outras plantas como milho e abacaxi, possa ser promissora na promoção de crescimento pela FBN e possuir outros atributos biotecnológicos importantes. Espera-se também que este estudo, juntamente com outros que pretendam diminuir o impacto da ação humana sobre o meio ambiente, contribua para “Satisfazer as necessidades da atual geração, sem comprometer as possibilidades das gerações futuras satisfazerem suas necessidades”.

CAPÍTULO I

ESTUDO DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO GÊNERO *Burkholderia* EM ASSOCIAÇÃO COM CANA-DE-AÇÚCAR

RESUMO

O gênero *Burkholderia* é um importante componente da comunidade microbiana do solo e possui alto potencial agrícola e biotecnológico, podendo ser usado em controle biológico, promoção de crescimento de plantas e fixação biológica de nitrogênio. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar a população de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*, associadas às plantas de cana-de-açúcar. Para o isolamento, foram coletadas plantas de cana-de-açúcar em canaviais localizados em Paranavaí-PR, Campos dos Goytacazes-RJ, Seropédica-RJ, Timbaúba-PE e Piracicaba-SP. Os isolados obtidos foram caracterizados fisiologicamente, morfolologicamente e molecularmente. O Número Mais Provável de células de bactérias diazotróficas, variou de não detectada a 4500×10^4 células por grama de amostra, sendo maior nas raízes e rizosfera. Foram obtidos 81 isolados tipo *Burkholderia* spp., 43 em meio de cultura JMV e 38 em LGI de 12 das 16 variedades analisadas. Deste total, 64 foram identificados como pertencentes ao gênero *Burkholderia*, com variação expressiva quanto às fontes de carbono utilizadas e na atividade de redução de acetileno. A espécie de apenas 5 isolados foi identificada pela técnica de ARDRA, dois como *B. tropica* e três isolados como *B. unamae* e mais quatro isolados possuem alta similaridade com a espécie *B. unamae*. Esta análise revelou a existência de um grande grupo de isolados com mesmo perfil de restrição e diferente dos padrões das espécies analisadas. O sequenciamento da região 16S rDNA confirmou o afastamento deste grupo com as espécies já descritas e foi sugerido como uma nova espécie. Estes resultados mostraram que bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* colonizam plantas de cana-de-açúcar e apresentam metabolismo versátil. A maioria dos isolados foi diferente dos padrões testados e uma nova espécie será descrita, confirmando a grande diversidade e adaptabilidade deste gênero a diferentes ambientes.

Palavras – chave: Fixação Biológica de Nitrogênio. *Poacea*. Caracterização de bactérias.

ABSTRACT

The *Burkholderia* genus is an important component of microbiological soil community with high agricultural and biotechnological potential. It can be used in biological control and plant growth promotion by the biological nitrogen fixation. The objective of this work was isolate and to characterize the population of diazotrophic bacteria of the *Burkholderia* genus, associated sugarcane plants and the rizosferic soil. For the isolation, sugarcane plants were collected in crops located in Paranaíba-PR, Campos dos Goytacazes and Seropédica-RJ, Timbaúba-PE and Piracicaba-SP. The population varied from not detected up to 4500×10^4 cells per gram of dry weight sample, being higher in the roots and rizosphere and culture media JMV. Eighty-one *Burkholderia* spp. isolates were gotten, 43 in culture media JMV, 38 in LGI from 12 among 16 analyzed varieties. Of this total, 64 were identified as belonging to the *Burkholderia* genus, with high variation as the oxidated carbon sources and in the acetylene reduction activity. By the ARDRA technique, only five isolates were identified, two as *B. tropica*, three as *B. unamae* and four isolates showed high similarity with *B. unamae* species. This analysis showed the existence of a big group of isolates with the same restriction profile and different from the patterns of the analyzed species. The sequencing of the 16S rDNA region confirmed the removal of this group from the already described species and was suggested as a new one. These results showed that diazotrophic bacteria from the *Burkholderia* genus colonized sugarcane plants, presented versatile metabolism, the majority differed from the patterns and a new species will be described, confirming the great diversity and adaptability of this genus to the different environments.

Key words : Biological Nitrogen Fixation. *Poacea*. Bacteria characterization.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cultura da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é cultivada em mais de 130 países, sendo Índia, Cuba e Brasil os maiores produtores mundiais de cana e seus derivados. Foi a primeira atividade agrícola no Brasil, e atualmente é cultivada em quase todos os estados. Ocupa área de mais de 6 milhões de hectares com uma produção anual estimada para safra de 2006/07 de 471,17 milhões de toneladas de cana (CONAB, 2006), e é uma importante cultura para a economia do Brasil, pelo complexo industrial que gira em torno do seu cultivo. O cultivo desta planta gera muitos empregos e é promissora para a produção de energia e sequestro de carbono.

Segundo os sistemas de classificação botânica, a cana-de-açúcar pertence à divisão *Angiospermae*, classe *Monocotyledonea*, família *Poaceae*, tribo *Andropogonea*, subtribo *Saccharinae*. A subtribo *Saccharinae* possui 10 gêneros, destes *Erianthus*, *Miscanthus*, *Sclerostachya*, *Norenga*, *Ripidium* e *Saccharum*, formam um grupo de inter cruzamento muito próximo denominado “Complexo *Saccharum*” (ROACH e DANIELS, 1987), constituindo os recursos genéticos básicos da cana-de-açúcar. O gênero *Saccharum* é a base genética das principais variedades cultivadas comercialmente no mundo, e compreende seis espécies, *Saccharum officinarum*, *S. robustum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*.

A criação do Programa Brasileiro do Alcool Combustível em 1975 (Proálcool) deu grande impulso à cultura canavieira no Brasil. Tinha como pressuposto a possibilidade de aumentar a produção de álcool para atender às novas necessidades de combustível, sem prejuízo na fabricação de açúcar. Na base desses resultados estão os esforços desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento da Copersucar (Cooperativa de Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo), fundado em 1979, e pelo próprio Governo Federal, com a criação do Programa Nacional do Melhoramento da Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR), criado em 1981 para o desenvolvimento de processos e métodos ligados à cultura da cana e à produção de açúcar e álcool.

Estas instituições desenvolveram e substituíram as variedades antigas pelas designadas CB (Campos, Brasil); PB (Pernambuco, Brasil); IAC (Instituto Agrônomo de Campinas). Cada vez mais adaptadas ao clima, tipo de solo, sistema de corte (manual ou mecanizado), resistência a pragas e com maior concentração de sacarose. O cruzamento de algumas das melhores variedades desenvolvidas deu origem as variedades da série SP.

Atualmente no Brasil, o principal órgão envolvido na manutenção e continuidade da pesquisa relacionada ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (PMGCA), é a RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento Sucroalcooleiro), constituído por 7 universidades (UFRPE, UFAL, UFGO, UFV, UFRRJ, UFSCar, UFPR), localizadas onde a cultura da cana-de-açúcar apresenta maior expressão. Em 14 anos de atuação, a rede já liberou 13 variedades para a região Norte e Nordeste e 17 variedades para as outras regiões.

A cultura da cana-de-açúcar é altamente extratora em nitrogênio (N). Acumula aproximadamente 200 kg de N em cana planta e entre 120 e 180 kg de N em cana soca, por hectare, para atingir produtividade de 100 Mg (ORLANDO FILHO et al., 1980). A maior parte do N é retirada do sistema, aproximadamente 70% é levado nos colmos no momento da colheita, e o restante é queimado no preparo do canavial para a colheita (OLIVEIRA et al., 1994). Esta exportação e queima de quase tudo o que é produzido e a baixa adição de fertilizantes em canaviais brasileiros, deveriam levar a um rápido esgotamento do potencial produtivo dos solos. Porém, em áreas após 16 anos de cultivo, foi observado que em geral não

há redução do nível de N no solo, mesmo quando não foi adicionado N fertilizante ao sistema (RESENDE, 2003).

Um importante estudo (AZEREDO et al., 1986), que contribuiu para a hipótese de reposição natural do N exportado, foi a análise de resultados de 135 experimentos de aplicação de N em cana planta. Nestes experimentos, apenas 19% tiveram aumentos significativos na produção de colmos com adição de N mineral. E em estudo recente também foi confirmado significativo ingresso de nitrogênio no sistema solo-planta após oito e 13 anos de cultivo, proveniente da atmosfera (XAVIER, 2006).

1.2 Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico (FBN)

Os 4 elementos essenciais mais abundantes nos organismos vivos são o carbono, hidrogênio, oxigênio e o nitrogênio, sendo que os três primeiros são obtidos do ar e de doadores de elétrons. Já, 99,96% do nitrogênio estão na forma de N_2 presentes na atmosfera, não disponível a todos os eucariotos e a maioria dos procariotos, e apenas 0,04% encontram-se nas formas disponíveis orgânicas ou inorgânicas (ROSWALL, 1979). O N_2 que compõe 78% dos gases da atmosfera pode ser fixado ou transformado em NH_3 através de descargas elétricas, processos industriais ou biológicos. A contribuição da fixação de nitrogênio por descargas elétricas é relativamente baixa. Já os processos industriais, onde a tripla ligação que une os dois átomos de N é rompida com alta temperatura ($> 400\text{ }^{\circ}\text{C}$) e elevada pressão ($> 10^7$ Pascal), são bem significativos, porém encarecem a produção, além de sua baixa eficiência e alta mobilidade, podendo poluir o solo, água e atmosfera.

O processo de Fixação Biológica de Nitrogênio atmosférico (FBN) é um dos dois maiores processos que regulam a vida no planeta, juntamente com a decomposição da matéria orgânica e perdendo apenas pela fixação biológica de carbono (Fotossíntese). A FBN talvez seja o processo microbiano relacionado à agricultura mais bem estudado e explorado tecnologicamente, sendo o processo mais importante para fixar o N_2 atmosférico e a chave para o ciclo do N. É realizada por muitos grupos de bactérias e alguns organismos do grupo *Archae* que possuem a enzima nitrogenase, dito diazotróficos, capazes de quebrar a tripla ligação existente na molécula de N_2 , tornando-o disponível em solos, oceanos, interior de tecidos de plantas, insetos e rúmem, sendo responsável por 65% do nitrogênio fixado anualmente.

Existem três tipos de organismos diazotróficos: os de vida livre, aqueles que vivem associados com outros organismos e aqueles que vivem em simbiose com outros organismos. A mais eficiente relação desenvolvida foi a simbiose de certas bactérias com plantas da família leguminosa. Neste processo são formadas estruturas especializadas, os nódulos, onde as bactérias possuem condições para expressar sua máxima eficiência. Posteriormente, descobriu-se que bactérias diazotróficas vivem em associação na rizosfera ou tecidos de plantas não leguminosas, contribuindo para o desenvolvimento das plantas. Grandes esforços têm sido empenhados no entendimento e melhor exploração desse sistema, visto que plantas beneficiadas, como milho, trigo e arroz são a base da alimentação humana e cana-de-açúcar uma ótima fonte de energia.

1.3 Bactérias Diazotróficas em Cana-de-açúcar

Em cana-de-açúcar foram encontradas bactérias diazotróficas na rizosfera e colonizando tecidos internos das plantas. Ao longo dos anos de estudo foram isolados ou descritos inúmeros gêneros e espécies de bactérias diazotróficas. Também foi gerado conhecimento sobre a ecologia, fisiologia, genética, e inúmeros experimentos foram conduzidos para avaliar a contribuição destes organismos.

Análise de amostras de solos de canaviais de diferentes regiões do Brasil levou ao isolamento do gênero *Beijerinckia* e descrição de uma nova espécie, *B. fluminensis* (DOBEREINER & RUSCHEL, 1958). Esta espécie ocorreu predominantemente em solos cultivados com cana-de-açúcar (DOBEREINER, 1959), parecendo ter clara influência da planta no desenvolvimento da bactéria. Estudos posteriores isolaram, na rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, outras bactérias como *B. indica* (SOUTO & DOBEREINER, 1967), *Klebsiela* (GRACIOLLI et al., 1983), *Enterobacter* (LADHA et al., 1983), *Bacillus azotofixans* (SELDIN et al., 1984), reclassificado para *Paenibacillus azotofixans* (ASH et al., 1993) e *A. amazonense* (BALDANI et al., 1997).

As bactérias diazotróficas de vida livre e rizosféricas perderam importância quando se descobriu que o interior das plantas abrigava um grande número de bactérias diazotróficas, e estudos mostraram que estes organismos possuem maior capacidade de contribuição que as bactérias rizosféricas. Foram denominados endofíticos e despertou bastante interesse mundial. O termo endofítico refere-se à colonização de plantas por microrganismos que não causam danos ao hospedeiro e vivem a maior parte de sua vida dentro dos tecidos da planta sem emitir nenhum sintoma de patogenicidade (BALDANI et al., 1997).

A capacidade de colonizar o interior das plantas pode conferir vantagem ecológica sobre as bactérias rizosféricas. A capacidade de colonizar nichos específicos no interior dos tecidos das plantas permite que estas bactérias estejam protegidas das altas taxas de oxigênio, que inibem a enzima nitrogenase, e tenham acesso facilitado e com menor competição a fontes de carbono. Além de serem beneficiadas, as bactérias podem contribuir pela fixação do nitrogênio atmosférico diretamente nos tecidos das plantas.

Na cultura da cana-de-açúcar, encontram-se frequentemente bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia*.

1.3.1 Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* possui nove espécies descritas, e duas propostas como novas espécies. Foi descrito juntamente com a primeira espécie, *H. seropedicae* (BALDANI et al., 1986), uma bactéria fixadora de nitrogênio associadas a inúmeras plantas da família *Poacea*. Atualmente das 11 espécies descritas e propostas, apenas *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. frisingense* fixam nitrogênio em associação com plantas não leguminosas. A mais nova espécie diazotrófica descrita, *H. lusitanum*, foi isolada de nódulos de raízes de feijão coletados em Portugal (VALVERDE et al., 2003).

H. seropedicae foi a primeira espécie descrita do gênero, isolada da rizosfera, rizoplane e raízes desinfestadas de arroz, milho e sorgo (BALDANI et al., 1986). Foi também isolada de raízes, folhas e colmos de cana de açúcar cultivada no Brasil (BALDANI et al., 1996) e na Austrália (BODDEY et al., 1998).

H. rubrisubalbicans pertencia ao gênero *Pseudomonas* (GILLIS et al., 1991), e foi reclassificada por BALDANI et al. (1986). Tem sido encontrada em associação com cana-de-açúcar e raiz da planta *Digitaria insularis*, crescida no interior da plantação de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1996). Foi detectada também em capim elefante (REIS et al., 2000), abacaxizeiros e bananeiras (CRUZ et al., 2001). Tem ocorrência mais restrita, se comparada à espécie *H. seropedicae* e pode causar a doença chamada "estria mosqueada" na variedade de cana-de-açúcar B3462 (OLIVARES et al., 1993).

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

1.3.2 Gênero *Gluconacetobacter*

Das 13 espécies do gênero, apenas *G. diazotrophicus*, *G. azotocaptans* e *G. johannae* são capazes de fixar nitrogênio atmosférico. *G. azotocaptans* e *G. johannae* foram isoladas de rizosfera e rizoplane de plantas de café cultivadas no México (FUENTES-RAMÍREZ et al., 2001) e possivelmente de amostras de rizosfera de café cultivados no Brasil (SANTOS et al., 2006).

Das espécies diazotróficas, *G. diazotrophicus* é a bactéria mais estudada em associação com cana-de-açúcar. Foi isolada de raízes e parte aérea de cana-de-açúcar cultivada nos estados de Alagoas, Pernambuco e Minas Gerais (CAVALCANTE et al., 1988) e ao longo dos anos de estudo, foi encontrada em altos números e isolada de raízes, colmos, palhço, solo da rizosfera e seiva xilemática de cana-de-açúcar (REIS, 1991; PERIN, 2003), e inúmeros outros países. Apresenta distribuição ampla e além de fixar nitrogênio, produz hormônios de crescimento como AIA e giberelina (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; BASTIÁN et al., 1998) e atua em controle biológico (PIÑON et al., 2001).

É uma bactéria endofítica e possui baixa sobrevivência no solo (REIS, 1994). Em experimento de inoculação em solo natural e estéril, esta bactéria não foi reisolada 48 horas após sua introdução (CARUSO et al., 1995). O uso da técnica de imunocaptura em amostras de solo de canaviais e cafezal possibilitou isolamento de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* de amostras de solo coletadas a 50 cm das plantas de café, mas não de amostras de solo de canaviais (SANTOS et al., 2006). Trabalhos mostraram a detecção, mas não isolamento desta bactéria em rizosfera de cana-de-açúcar pela técnica de ELISA indireta (LI & MACRAE, 1992).

Também apresenta limitada diversidade genética e sua população é considerada um clone (CABALLERO-MELLADO et al., 1994 e 1995). A baixa diversidade genética desta população pode estar associada ao ambiente restrito que é o interior da planta de cana-de-açúcar, sofrendo desta maneira forte pressão seletiva, ou devido a produção de bacteriocinas, detectadas em condições de cultura pura, por dois grupos de bactérias sobre outros grupos da mesma espécie e das espécies *G. johannae*, *G. azotocaptans* e *G. liquefaciens* (MUÑOZ et al., 2005).

A população natural ou inoculada de *G. diazotrophicus* presente em plantas de cana-de-açúcar, diminui drasticamente com o avançar da idade da planta (PERIN, 2003; MUÑOZ-ROJAS et al., 2003) e foi relatado também que a suplementação de nitrogênio afetou severamente *G. diazotrophicus*, provocando redução do número populacional em variedades de cana-de-açúcar cultivadas no México e Índia (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993 e 1999; MUTHUKUMARASAMY, 1999).

1.3.3 Gênero *Burkholderia*

Criado em 1992, este gênero conta atualmente com de 37 espécies descritas. Colonizam diversos nichos ecológicos, desde plantas, solos contaminados e seres humanos, sendo um importante componente da comunidade microbiana do solo. *B. cepacia* foi a primeira espécie descrita, causadora de podridão em casca de cebola (YABUCHI et al., 1992). Algumas espécies provocam doenças em plantas e animais, porém a maioria delas não são patógenas e podem promover o crescimento em plantas pela fixação biológica de nitrogênio e produção de fitormônios.

Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* apresentam ampla distribuição, se associam com plantas não leguminosas e formam nódulos em leguminosas. As espécies *B. tuberum* e *B. phymatum* (VANDAMME et al., 2002a), foram as primeiras isoladas de nódulos das plantas *Aspalathus carnosa*, coletada na África do Sul e *Machaerium lunatum*, coletada

na Guiana Francesa. Recentemente inúmeros trabalhos mostraram o isolamento de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em nódulos, especificamente de plantas da subfamília *Mimosoidea*.

Estas bactérias se associam com inúmeras plantas. Em cana-de-açúcar, duas espécies foram recentemente descritas. *B. unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004), isolada de cana-de-açúcar, café e milho de diferentes lugares do México e *B. tropica* (REIS et al., 2004), isolada de plantas de cana-de-açúcar no Brasil e África do Sul, solo nos EUA e milho no México. E inúmeros isolados das espécies *B. tropica*, *B. kururiensis* e *B. caribensis* foram isolados de amostras de canas-de-açúcar brasileiras e australianas (BODDEY, 2002). Porém pouco se sabe sobre a ecologia e diversidade destas espécies.

1.4 FBN em Cana-de-açúcar

Cana-de-açúcar é a gramínea que mais se beneficia da FBN. Os primeiros experimentos para detectar a FBN em cana-de-açúcar, foram conduzidos no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA, Piracicaba, SP), onde detectaram contribuições significativas (RUSCHEL et al., 1978). Mais tarde, dois estudos clássicos, usando a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , foram importantes para confirmar a contribuição da FBN à cultura. Os primeiros estudos de quantificação da FBN foram conduzidos ao ar livre, em potes contendo solo enriquecido com ^{15}N (LIMA et al., 1987). Neste ensaio foram testadas quatro variedades e apenas duas apresentaram resultados positivos, na mais promissora, CB47-89, 60% do nitrogênio necessário para a cultura veio da FBN. Em tanque de concreto, também com solo marcado com ^{15}N e *Brachiaria* como controle negativo, foi avaliado a FBN em mais 10 variedades de cana-de-açúcar por três anos. Novamente foi observada variação de resposta, e a variedade SP70-1143 foi a mais promissora, recebendo da FBN, 70% do nitrogênio presente em seus tecidos, e como no caso anterior, decresceu ao longo dos anos (URQUIAGA et al., 1992).

Estudos recentes indicaram que a FBN pode contribuir em até 60% de todo o N acumulado pelas plantas (BODDEY et al., 2001; XAVIER, 2002). Confirmado também em levantamentos feitos em áreas de produção nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Pernambuco (POLIDORO, 2001), onde inúmeras variedades foram analisadas pela técnica de abundância natural de ^{15}N e foi observada contribuição da FBN em torno de 30%, com variação de 0 a 60%, tendo as variedades RB72-454 e SP80-1842, apresentado os melhores resultados.

Experimentos de inoculação em casa de vegetação e campo também foram conduzidos. Em experimento em vasos com solo, o nitrogênio derivado da FBN variou de oito a 52% dependendo da planta usada como testemunha, e bactérias do gênero *Herbaspirillum* promoveram maior desenvolvimento das plantas se comparado à *G. diazotrophicus* (CANUTO, 2003). Também em vasos com solo, após 400 dias de inoculação das espécies *G. diazotrophicus*, *A. amazonense*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *B. tropica*, sozinhas e com diferentes combinações, na variedade micropropagada SP70-1143, foi observado um melhor desenvolvimento com a inoculação conjunta de todas as espécies, e a FBN neste caso, contribuiu com 30% do nitrogênio da planta (OLIVEIRA et al., 2002). Esta mesma mistura de bactérias foi inoculada nas variedades SP70-1143 e SP81-2350, em condições de campo e avaliadas 16 meses após a inoculação. Foi observado que a FBN variou de - 4,5 a 31,4%, e foi maior em solo de baixa fertilidade (OLIVEIRA et al., 2003).

Também a inoculação de *H. seropedicae* estirpe HRC54 e *G. diazotrophicus* estirpe PAL5, na variedade RB 72-454, estimulou a atividade da H^+ ATPase, provocou mudanças morfológicas radiculares e incremento de nutrientes na fase inicial do estabelecimento, e *H. seropedicae* contribuiu para o incremento da biomassa radicular, área foliar, conteúdo de

clorofila e conteúdo de nutrientes (OLIVARES et al., 2002). Também a inoculação destas duas espécies na variedade CO86032, na Índia, elevou a quantidade de biomassa e N superior às plantas adubadas com 140 kg de N por ha (MUTHUKUMARASAMY et al., 2006).

O uso de fertilizante nitrogenado pode afetar negativamente o potencial da FBN. Altos níveis de N mineral causaram significativo decréscimo na atividade da nitrogenase e levou a diminuição das populações de *G. diazotrophicus* no México (FUENTEZ-RAMÍREZ et al., 1993) e Índia (MUTHUKUMARASAMY, 1999). No Brasil, MEDEIROS (et al., 2006) mostraram que as variedades SP70-1143 e SP79-2312 diferem na fonte preferencial de N mineral e altas doses de nitrogênio inibem a população de *G. diazotrophicus* e atividade de redução de acetileno pelas plantas. Isso pode ocorrer porque altas doses de N mineral inibem a síntese de sacarose (PELLAEZ ABELLAN et al., 1994) e podem aumentar a quantidade de aminoácidos na seiva do apoplasto (TEJERA et al., 2006).

Estudos recentes mostraram que as plantas influenciam ativamente na associação com bactérias diazotróficas. O sequenciamento parcial de genes expressos (EST-Etiquetas de Sequências Expressas) da variedade SP70-1143 inoculada com *G. diazotrophicus* e *H. seropedicae* revelou que diversos genes da planta são induzidos na presença das bactérias (NOGUEIRA et al., 2001). Alguns destes genes possuem função de sinalização (VARGAS et al., 2003) e muitos possuem função ainda desconhecida (VINAGRE et al., 2006). Foi verificado também que um gene, denominado SHR5, que participa na ativação de resposta de defesa em plantas, foi reprimido em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas e mais reprimido na variedade SP70-1143, que recebe maiores contribuições da FBN (VINAGRE, 2001). Outra contribuição para explicar diferenças nas quantidades de N obtido via FBN pode ser a presença de genes da família glutamina sintetase, que estão associados a mecanismos mais eficientes de assimilação de N e têm sua expressão aumentada na variedade SP70-1143 (NOGUEIRA et al., 2005).

Estima-se que a FBN associada ao cultivo da cana-de-açúcar no Brasil, gera economia de N-fertilizante equivalente a US\$ 200 milhões, contribuindo para a conservação do meio ambiente (URQUIAGA et al., 2005), porém vários fatores podem interferir neste processo, tais como: tipo de solo, manejo, genótipo da bactéria e genótipo da planta. Visando contribuir para o entendimento desta associação, foi proposto conhecer a população de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com esta planta, por ser um gênero com grande adaptabilidade em diferentes ambientes e inúmeros potenciais biotecnológicos. O objetivo deste capítulo foi isolar, caracterizar e avaliar a diversidade da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de Amostras

Foram coletadas amostras de diferentes variedades de cana-de-açúcar utilizadas para o isolamento de bactérias diazotróficas pertencentes ao gênero *Burkholderia*, em quatro estados brasileiros.

No Estado do Rio de Janeiro foram coletadas amostras de plantas adultas das variedades Chunne (*Saccharum barberi*), Krakatau (*S. spontaneum*) e dos híbridos SP70-1143, SP72-454 e CB47-89, em novembro de 2002. As plantas foram cultivadas na área experimental da Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, em experimento foi instalado em novembro de 1989 em um Argissolo de textura média, renovado em 1998, quando recebeu 100 kg de P_2O_5 , 80 kg de K_2O e 50 kg de FTE BR12 por hectare e anualmente recebeu 80 kg de K_2O por hectare. As plantas foram coletadas na segunda soca e com 10 meses de idade. A outra área de coleta foi na fazenda de um plantador de cana-de-açúcar localizado no município de Campos dos Goytacazes, situado ao norte do Estado do Rio de Janeiro. Neste local foram feitas coletas de quatro variedades de cana-de-açúcar em novembro de 2003. No mesmo município, numa localidade chamada de Cambaíba, foi feita outra coleta da variedade CB 45-3 com 5 meses de idade e no terceiro corte. Esta área era mantida há 20 anos com cana-de-açúcar sem adição de fertilizantes minerais ou orgânicos e sofreu queimadas periódicas. As variedades Caiana Roxa, Caiana Amarela e AKBAR, foram coletadas no Campus Dr. Leonel Miranda da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As duas primeiras, em fase adulta, eram mantidas em canteiros sem adição de fertilizantes minerais ou orgânicos. Já a variedade AKBAR era mantida no Banco de Germoplasma, depois de sofrido oito cortes e com três meses de idade.

Em setembro de 2003, foram coletadas amostras de plantas de cana-de-açúcar das variedades RB85-5113 e RB72-454, no campo experimental da Universidade Federal do Paraná, em Paranavaí, Estado do Paraná.

As variedades SP87-432, SP80-1842 e SP80-3280, cultivadas no campo experimental da COPERSUCAR (Cooperativa de Produtores de Cana-de-açúcar, Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo), foram coletadas em abril de 2004. Foram plantadas em junho de 2003 em um Latossolo Vermelho Amarelo, tipo 2, sem aplicação de agrotóxicos e que recebeu no plantio 50 kg da fórmula 4-20-20 por hectare.

Na Usina Cruangi, município de Timbaúba, Pernambuco, foram coletadas amostras das variedades SP78-4764, SP79-1011 e SP87-344, em maio de 2004.

Amostras de solo próximo às plantas foram coletadas para análise química (Embrapa, 1999) e os dados estão apresentados na Tabela 1.

Todas as amostras coletadas foram transportadas para o Laboratório de Gramíneas da Embrapa Agrobiologia, em Seropédica - RJ, para análise.

Tabela 1: Características químicas dos solos onde as variedades de cana-de-açúcar foram mantidas.

Amostras	pH/água	Al	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K
		cmol/dm ³			mg/dm ³		
RB 72-454	5,7	0,0	5,6	4,4	1,2	15	235
RB 855113	5,7	0,0	5,0	3,7	1,3	15	320
CB45-3	6,1	0,0	7,6	6,2	1,4	28	135
Caiana Amarela	6,0	0,0	4,9	3,6	1,3	103	185
Caiana Roxa	6,0	0,0	4,5	3,7	1,2	15	160
AKBAR	5,6	0,0	8,3	5,3	3,0	14	165
SP78-4764	5,9	0,0	5,3	3,7	1,6	166	220
SP79-1011	6,5	0,0	6,6	4,0	2,6	178	195
SP87-344	6,3	0,0	6,7	4,2	2,5	185	594
SP87-432	4,7	1,4	2,8	1,3	1,5	5	53
SP80-1842	4,7	0,0	1,4	3,6	1,5	5	53
SP80-3280	5,2	0,0	4,5	2,8	3,0	14	65

2.2 Contagem e Isolamento

As amostras de cana-de-açúcar foram separadas em solo da rizosfera, raízes e colmos e processadas de acordo com a metodologia descrita por DÖBEREINER et al. (1995), para contagem da população de bactérias diazotróficas e posterior isolamento. Para tal, o solo presente na rizosfera das plantas foi separado, homogeneizado e pesado uma amostra composta de 10 g. Esta amostra foi colocada em frascos contendo 90 ml de solução salina (anexo) e permaneceu sob agitação constante de 150 rpm por 1 h para fragmentação dos agregados. As raízes e colmos foram muito bem lavados com água corrente, fragmentados em pedaços menores, homogeneizados e pesado amostras compostas de 10 g. Estas amostras foram colocadas em frascos estéreis e desinfestadas superficialmente pela imersão em solução aquosa de Cloramina T a 1%, por cinco min. Em seguida, foram lavadas três vezes com água destilada estéril e mantidas por 2,5 min. em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,0, e novamente lavadas cinco vezes com água destilada estéril. Após desinfestadas, foram trituradas por um a dois minutos com 90 ml de solução salina em liquidificador de uso doméstico e permaneceram em repouso por uma hora.

Depois de trituradas e agitadas em solução salina (diluição 10^{-1}) as amostras de solo da rizosfera, raízes e colmos, foram diluídas seriadamente até 10^{-6} , acrescentando-se 1 ml da diluição original a tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina. De cada diluição, uma amostra de 0,1 ml foi inoculada no meio de cultura, em frascos com 3 repetições, contendo 5 ml dos meios de cultura semi-sólidos sem adição de nitrogênio LGI (anexo) (DÖBEREINER et al., 1995) e JMV (anexo) (BALDANI, 1996) com pH alterado para 5,5 (BODDEY, 2002).

Os frascos inoculados foram incubados no escuro, a 30 °C por um período de 7 dias, para o desenvolvimento de película na região superficial do meio. A contagem da população bacteriana foi realizada através da técnica do Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady para 3 repetições de cada diluição (DÖBEREINER et al., 1995).

As amostras dos frascos das duas últimas diluições com crescimento positivo foram utilizadas para isolamento de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*. A repicagem para novo meio de cultura semi-sólido, como recomenda a metodologia, não foi realizada. As amostras foram diretamente riscadas em placas de Petri contendo o respectivo meio sólido. As placas foram incubadas no escuro a 30 °C por 5 dias para o crescimento de colônias isoladas.

Cada colônia formada nos meios sólidos foi repicada para novo meio semi-sólido. Nesta etapa observou-se a necessidade de adição de 20 mg de extrato de levedura no meio de cultura semi-sólido JMV, o que facilitou o crescimento da película e não inibe a atividade de redução de acetileno. Após formação de película característica em meio de cultura semi-sólido, as amostras foram riscadas novamente em placas para confirmação da pureza.

Quando purificados, os isolados foram estocados em glicerol 50% (glicerol diluído em 50% de água destilada estéril) estéril. Onde foram previamente crescidos em meio de cultura líquido Dyg's modificado (anexo) (BALDANI, 1996), por 18 h a 150 rpm e 2 ml da suspensão bacteriana foi centrifugada por 5 min a 520 x g, sendo o sobrenadante descartado e o concentrado de células ressuspensionado em 500 µl de glicerol 50%, homogeneizado e estocado a - 20 °C.

Todos os isolados foram também liofilizados e depositados na Coleção de Cultura da Embrapa Agrobiologia, recebendo assim, denominação BR, seguido de número de registro.

2.3 Oxidação de Fontes de Carbono (BIOLOG)

Esta avaliação foi realizada através da utilização do Kit BIOLOGTM, que é um sistema de placa de polietileno impregnada com 95 diferentes fontes de carbono, que permite identificar os isolados e avaliar a similaridade entre eles. O sistema escolhido foi BIOLOG GN2, específicos para culturas puras de bactérias Gram negativas.

Para esta análise, uma colônia característica de cada isolado foi inoculada em tubo de ensaio contendo 5 ml de meio de cultura líquido Dyg's, permanecendo sob agitação constante de 150 rpm por 18 h a 30 °C. Uma alíquota foi riscada em placas contendo meio de cultura Dyg's sólido e incubado no escuro a 30 °C por 48 h para verificação da pureza. Em seguida, foram riscados em meio sólido BUG (meio fornecido pelo fabricante do Kit BIOLOG) e incubados no escuro a 30 °C por 24 h. Após este período, as colônias foram retiradas das placas com o auxílio de um cotonete estéril, suspensas em um fluido inoculante (fornecido pelo fabricante do Kit BIOLOG) com concentração das células semelhantes a um padrão conhecido, já ajustado para 52% de transmitância em espectrofotômetro com filtro de 590 nm.

Com o uso de um pipetador multicanal, 150 µl da suspensão de células foi adicionada em cada um dos 96 poços da placa, que foi tampada e incubada por 24 h a 30 °C e avaliada com 4 e 24 h de incubação.

A identificação dos isolados foi dada pela capacidade de utilização das fontes de carbono, visualizados pela redução do indicador tetrazolium, o que faz com que ocorra a formação da cor roxa. Os valores foram representados como positivo, para as fontes de carbono que se apresentaram na cor roxa, e negativa para as fontes de carbono que não foram oxidadas pelos isolados e não alteraram a cor. Estes dados foram fornecidos ao programa Bio, do Kit BIOLOG, que identificou o gênero e espécie, ou a similaridade do isolado com algum gênero já descrito.

Os dados obtidos por este sistema, também permitem avaliar a similaridade entre os isolados e as estirpes padrões das espécies descritas. Para isso, foi construída uma matriz binária, sendo atribuído valor 1, para as fontes de carbono que foram oxidadas e zero para aquelas que não foram oxidadas. Os dados foram comparados e as semelhanças entre os isolados foram estimadas pelo coeficiente de SM (ROHLF, 1994), agrupados pelo método das distâncias médias UPGMA (Unweighted Pair Group Method) (SNEATH & SOKAL, 1973) e representados graficamente por um dendrograma construído pelo programa NTSYS (Numerical Taxonomy System Using Multivariate Statistical Program), versão 2.1.

Foram incluídas em todas as caracterizações as estirpes padrões das espécies diazotróficas do gênero *Burkholderia*, estirpe TVV75 de *B. vietnamiensis*, BR11366, padrão de *B. tropica*, KP23, padrão de *B. kururiensis*, ATCC25416, padrão do genômico I de *B.*

cepacia, MTI641, padrão de *B. unamae*, BR11340, padrão de *B. brasilensis*, STM815, padrão de *B. phymatum* e STM678, de *B. tuberum*. E IPT101, padrão da espécie *B. sacchari*, isolada de solo de canavial.

2.4 Identificação do Gênero *Burkholderia*

A extração de DNA genômico das bactérias isoladas, foi realizada com o auxílio de um kit de extração de DNA, QIAamp® DNA Mini Kit, fabricado pela empresa Quiagen. Para esta tese, foi utilizado o protocolo para extração de DNA de bactérias Gram negativas, crescidas em meio de cultura líquida.

A qualidade e quantidade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose na concentração 1,0%, fundida em tampão TAE 1 X (anexo). O gel foi submerso em tampão de corrida TAE 1 X. Em cada orifício do gel foi aplicado 1 µl de amostra, juntamente com 2 µL de tampão de amostra, e aplicado voltagem constante de 100 volts por 30 min., para promover a migração das amostras. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (5 mg/l) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador marca Kodak, modelo EL Logic Imaging System.

O gênero dos isolados foi confirmado utilizando a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) com os iniciadores específicos BurK3 (5'-CTGCGAAAGCCGGAT-3') e reverso BurkR (5'-TGCCATACTCTAGC(CT)(CT)GC-3') (SALLES et al., 2002), específicos para o gênero *Burkholderia*, desenhados a partir da região 16S rDNA, resultando num fragmento PCR de 500 pares de bases.

Os isolados foram amplificados em reação de 25 µL, obtida com a mistura de 10% do volume final da reação de tampão de PCR 10 X; 3,75 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTP; 0,4 µM de cada iniciador; 2,5 unidades de Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA. Estas amostras foram acomodadas em termociclador com uma etapa inicial de desnaturação (95 °C por quatro min.), seguido de 25 ciclos intermediários (94 °C por 14 min., 62 °C por 45 segundos e 72 °C por dois min.) e uma etapa final de extensão (72 °C por 10 min.).

Os produtos destas amplificações foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%, fundido em tampão TAE 1 X. O gel foi submerso em tampão de corrida TAE 1X e em cada orifício do gel foi aplicado dois µL de amostra juntamente com 2 µL de tampão de amostra (anexo), e aplicado voltagem de 100 volts por 60 min. para promover a migração das amostras. Em seguida, o gel foi corado e visualizado como descrito acima.

2.5 Detecção do Gene *nifH* e Determinação da Atividade da Nitrogenase

2.5.1 Amplificação da região do gene *nifH* da nitrogenase

O caráter diazotrófico dos isolados foi avaliado pela amplificação do gene *nifH*. Foram utilizados os iniciadores 19F (5'GCIWTTYTAYGGIAARGGIGG3') e 407R (5'AAICCRCCRCAIACIACRTC3') (onde I= inosina, R= A ou G ,W= A ou T e Y= C ou T) (UEDA et al., 1995), gerando um fragmento de aproximadamente 309 pares de bases. Foi utilizada a técnica de PCR e a reação, com volume final de 50 µl, foi obtida com a mistura de 10% do volume final da reação de tampão de PCR 10 X; 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP; 2,0 µM de cada iniciador; 2 unidades de Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA. Estas amostras foram acomodadas em termociclador com uma etapa inicial de desnaturação (94° C por quatro min), seguido de 35 ciclos intermediários (94 °C por 1 min, 50 °C por 45 s e 72 °C por 2 min) e uma etapa final de extensão (72 °C por 4 min).

Após o término do programa de amplificação, uma alíquota do produto amplificado foi submetida a eletroforese como descrito no item 2.4, para visualização dos produtos de amplificação.

2.5.2 Atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase pode ser medida pela redução do acetileno, inibidor competitivo da enzima. A técnica da redução de acetileno (ARA) foi realizada como descrito por BODDEY et al., (1990) e a atividade específica é quantificada dividindo-se a atividade total de ARA pela proteína celular acumulada pela cultura, determinada pelo método descrito por LOWRY et al (1951).

Os isolados foram cultivados como descrito no item 2.3, e uma alíquota de 20 µl da cultura crescida foi inoculada no meio de cultura, em frascos com capacidade de 10 ml, contendo 5 ml de meio de cultura semi-sólido BMGM contendo glicose, manitol e ácido málico como fontes de carbono (anexo) (ESTRADA DE LOS SANTOS, 2001), e incubados no escuro a 30 °C por 48 h. Após a formação da película na superfície do meio de cultura, os frascos foram fechados com rolhas de borracha perfurável, e 0,5 ml de acetileno foi injetado usando uma seringa. Este volume corresponde a 10% da fase gasosa do frasco. Após a injeção das amostras testes e do controle contendo apenas o meio de cultura sem bactérias, os frascos foram incubados por uma hora a 30 °C. A seguir procedeu-se a avaliação do etileno produzido através da injeção de 0,5 ml da fase gasosa das amostras em cromatógrafo de gás com ionização de chama, marca Perkin Elmer, modelo F11. O resultado foi obtido através de um integrador digital de marca PE Nelson modelo 1022 que está acoplado ao cromatógrafo. O integrador recebe o sinal do cromatógrafo e o converte em gráfico, calculando a área e altura do pico e comparando-a com a curva padrão usada na calibração do aparelho, desta maneira, calcula-se a concentração do gás etileno contido na fase gasosa das amostras (OLIVEIRA et al., 1998).

Após leitura de ARA, as amostras foram homogeneizadas para misturar a película ao meio de cultura e realizado a determinação de proteínas totais, seguindo a metodologia descrita por LOWRY et al. (1951) e modificada por RODRIGUES (2004). O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente de Fenol-Ciocalteau), que sofre redução quando reage com proteínas na presença de cobre e produz um composto com absorção máxima em 750 nm. Em tubos de ensaio, foi adicionado 0,1 ml de amostra, 0,4 ml de água destilada estéril, para diluir a amostra e não saturar o método e, 0,5 ml de NaOH 1 M, agitados e postos em banho-maria a 100 °C por 5 min. para lisar as células e desnaturar o agar. Após atingir temperatura ambiente, foi adicionado aos tubos 0,25 ml de reagente de Lowry (anexo), agitados e incubados por 10 min. no escuro. Em seguida foi adicionado aos tubos 0,5 ml da solução do Reativo Fenol Ciocalteau, diluído em 1 porção de reagente mais 2 porções de água destilada estéril, agitados e incubados no escuro por 30 min. Após incubação, foi efetuada leitura de absorbância em espectrofotômetro com filtro de 750 nm, marca Onda Científica, modelo Bel 2000 UV.

Os valores de absorbância das amostras foram multiplicados por 10 (correção pelo uso de 100 µl de amostras, para obter o resultado em ml) e a concentração de proteínas determinada usando como padrão curva obtida pelos valores de absorbância de amostras com quantidades conhecidas da proteína Albumina Bovina. O valor da concentração de proteína foi multiplicado pela quantidade de meio de cultura em que a bactéria estava crescendo.

A atividade de redução de acetileno é dada por nmol de etileno produzido por hora de incubação (neste caso 1 hora) e dividido pelo valor de absorbância obtido pela análise de proteínas totais, resultando em nmol de etileno por mg de proteínas totais, quantificando desta maneira a atividade da nitrogenase dos isolados.

2.6 Caracterização Morfológica dos Isolados

Para a caracterização morfológica das colônias, os isolados foram cultivados como descrito no item 2.3. Uma alçada desta suspensão foi usada para riscagem, em triplicata, em placas contendo os meios de cultura sólidos LGI e JMV, e incubadas no escuro, a 30 °C. Após sete dias de crescimento, foram avaliadas características como: 1. tamanho: menor que um mm, puntiforme e maior que um mm; 2. dimensão; 3. cor; 4. forma da colônia, em circular ou irregular; 5. elevação: plana, lente, convexa, pulvinada, umbonada ou umbilicada; 6. borda: ondulada, lobada, denteada, filamentosa ou inteira; e 7. superfície: lisa, rugosa ou papilada; 8. consistência: seca ou gomosa (YANO et al., 1993).

2.7 Amplificação da Região 16S rDNA e Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado

Inicialmente, foi amplificada a região 16S rDNA, utilizando os iniciadores Y1, complementar a sequência 5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3' e Y3, 5'-CTAGACCCCACTTCAGCATTGTTCCAT-3', (YOUNG et al., 1991), através da técnica de PCR. A reação, com volume final de 50 µl, consistiu na mistura de 10% do volume final, de tampão de PCR 10 X; 2 mM de MgCl₂; 200 µM de dNTP; 0,12 µM de cada iniciador, 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase e de 50 a 150 ng de DNA. Em seguida o material preparado foi colocado num termociclador e submetido ao seguinte programa de amplificação: uma etapa de desnaturação (93 °C por 2 min.), seguido de 35 ciclos intermediários (93° C por 45 segundos, 62° C por 45 segundos e 72° C por dois min.), e uma etapa final de extensão (72 °C por 5 min.) seguido por resfriamento (15 °C por 15 min.), para parar a reação.

Após o término do programa, uma alíquota do produto amplificado foi submetida a eletroforese como descrito no item 2.4, para visualização dos produtos de amplificação.

Os produtos de amplificação das regiões 16S rDNA foram digeridos com as endonucleases de restrição, de corte raro, recomendadas *AluI*, *DdeI*, *MspI*, *HinfI* e *HhaI* (Invitrogen), (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). Para cada reação, foi adicionado 8,5 µL de material amplificado, 1,0 µl de tampão de reação próprio de cada enzima e cinco unidades da enzima de interesse. Os tubos foram agitados para homogeneizar os reagentes e incubados a 37° C em banho-maria, por três horas.

O material foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 3%, fundido em tampão TAE 1 X. Toda a amostra, e mais 2 µL de tampão de amostra, foram distribuídos nos poços do gel, submersos em tampão de corrida TAE 1 X e submetido a 50 volts por 4 h. Após a migração das amostras, o gel foi corado e visualizado como descrito no item 2.4.

O tamanho dos fragmentos gerados foi comparado com um marcador de peso molecular, e cada perfil foi identificado por uma letra, para agrupamento inicial dos isolados. A similaridade entre os isolados e com as estirpes padrões, foi avaliada pela construção de uma matriz binária, composta do valor um, pela presença de banda de determinado tamanho e zero, pela ausência de banda. Os dados foram comparados e as semelhanças entre os padrões foram estimadas pelo coeficiente de similaridade SM (ROHLF, 1994), agrupados pelo método das médias das distâncias médias UPGMA (Unweighted Pair Group Method) (SNEATH & SOKAL, 1973) e representados graficamente por um dendrograma construído pelo programa NTSYS (Numerical Taxonomy System Using Multivariate Statistical Program), versão 2.1.

2.8 Sequenciamento da Região 16S rDNA

A região 16S rDNA foi amplificada como descrito no item acima e o produto da amplificação foi precipitado com a adição de oito µl de NaCl 5,0 M e 40 µL de polietilenoglicol (8000) 22% a 32 µL do material amplificado. A mistura foi agitada e incubada a 4 °C por uma noite. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 4 °C e 1600 x g por 30 min, o sobrenadante descartado, e o precipitado lavado com a adição de 500 µl de etanol 70%. Em seguida, foi centrifugado a 4 °C e 1600 x g por 15 min, retirado o sobrenadante e exposto ao ambiente para secar. Quando os tubos estavam secos e sem odor de etanol, o DNA foi ressuscitado em 20 µl de água milliQ estéril. Foi aplicado 1 µl de cada amostra em gel de agarose e submetido à eletroforese, como descrito no item 2.4, para verificar a qualidade e estimar a concentração para posterior reação de sequenciamento.

Para o sequenciamento do gene 16S rDNA foram utilizados os iniciadores citados na Tabela 2. Para a reação foi utilizando 200 ng dos produtos de PCR purificados, 5 µM de cada iniciador e 4 µL do kit de sequenciamento (“TE Dynamics Kit”) (Amersham Biosciences®) e água ultrapura para o volume final de 10 µl. O material preparado foi acomodado em termociclador, programado para 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão de 95 °C por 20 s, 50 °C por 15 s e 60 °C por um min., respectivamente. Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas adicionando 1 µl de acetato de amônio 7,5 M e 27,5 µl de etanol absoluto, e incubadas a 4 °C por uma noite. No outro dia, as amostras foram centrifugadas a 520 x g e 4 °C por 30 min, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com a adição 150 µl de etanol 70%. Em seguida, as amostras foram agitadas e depois centrifugadas a 520 x g e 4 °C por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e as amostras permaneceram em temperatura ambiente para secagem. Quando os tubos estavam secos, foi adicionado 7,5 µl de tampão de sequenciamento e as amostras analisadas em sequenciador automático MegaBACE1000 (Amersham Biosystem).

Tabela 2: Iniciadores utilizados para sequenciamento do gene 16S rDNA

Iniciador	Seqüência (5' →3')	Referência
Y1	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	YOUNG et al., 1991
Y2	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG	YOUNG et al., 1991
Y3	CTGACCCCACTTCAGCTTGTTCAT	CRUZ et al., 2001
16S362f	CTCCTACGGGAGGCAGTGGGG	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S786f	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S1203f	GAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTC	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S1110r	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACC	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S805r	GACTACCAGGGTATCTAATCCTG	SOARES-RAMOS et al., 2003

As novas seqüências foram comparadas com as presentes no banco de dados do NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) (www.ncbi.nlm.nih.gov), pelo programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL, et al., 1997) para nucleotídeos. As seqüências em estudo foram alinhadas com algumas delas depositadas no banco de dados com o auxílio do programa CLUSTALW (THOMPSON et al., 1994) e foram agrupadas pelo método Neighbour-joining (SAITOU e NEI, 1987) no programa MEGA (www.megasoftware.net) (KUMAR et al., 2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Contagem e Isolamento

A presença de bactérias diazotróficas nas amostras de solo rizosférico, raízes e colmos de cana-de-açúcar foi verificada pela formação de película nos meios de cultura semi-sólidos JMV e LGI. Em ambos os meios, com dois dias após inoculação, a película apresentou-se fina e localizada a aproximadamente 2 milímetros abaixo da superfície. Após 5 dias de incubação, a película apresentou-se densa e atingiu a superfície do meio de cultura. No meio de cultura JMV ocorreu formação de película de cor creme sem alteração de pH. Já em LGI ocorreu formação de película de cor amarela, juntamente com acidificação do meio de cultura.

Foi observado que o número de células por grama de massa fresca variou de não detectado a 4500×10^4 e foi maior em meio de cultura JMV (Tabela 3). LGI foi o meio com menor número de amostras que apresentou bactérias. Das 51 amostras analisadas, 20 não cresceram neste meio, sendo a maioria de colmos. Nas variedades coletadas em São Paulo, em nenhuma amostra cresceu bactérias e das variedades coletadas em Pernambuco, na maioria das amostras também não foi observado crescimento de bactérias no meio de cultura LGI.

A presença de maior população de bactérias em meio de cultura JMV se comparada à LGI pode estar relacionado à fonte de carbono. O meio de cultura JMV foi desenvolvido a partir de testes com crescimento de isolados bacterianos obtidos de arroz, cana-de-açúcar e batata-doce, que mais tarde foram identificados como *Burkholderia*. Os isolados cresceram em meio de cultura semi-sólido com inúmeras fontes de carbono, e foi observado que manitol favoreceu o crescimento dos isolados (BALDANI, 1996). Já o uso do meio de cultura LGI, desenvolvido para o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum amazonense* (DOBEREINER et al., 1995), foi escolhido para este estudo por conter sacarose como fonte de carbono, que é abundante em cana-de-açúcar. O uso de dois meios de cultura possivelmente ampliou as chances de isolamento de bactérias com maior versatilidade nutricional e o meio de cultura com maior população e isolados, foi aquele que continha a fonte de carbono preferencial da bactéria.

As maiores populações, em ambos os meios de cultura, foram encontradas nas amostras de raízes e rizosfera. As plantas fornecem nos seus exsudados, substâncias como carboidratos, ácidos orgânicos e vitaminas e o solo contribui com macro e micro nutrientes, isso possibilita grande desenvolvimento de bactérias próximo às raízes. Diversos estudos em cana-de-açúcar mostraram maior população de bactérias diazotróficas dos gêneros *Gluconacetobacter* (PERIN, 2003), *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (REIS JUNIOR et al., 2000) presente no sistema radicular. Isso parece ser comum também para o gênero *Burkholderia* em plantas de cana-de-açúcar coletadas no Brasil e Austrália (BODDEY, 2002).

Das 16 variedades de cana-de-açúcar analisadas, as maiores populações, em ambos os meios de cultura, foram nas duas variedades coletadas em Paranavaí, no Estado do Paraná (Tabela 3). As variedades coletadas no Estado do Rio de Janeiro apresentaram menor população, porém na maioria das amostras não foi possível detectar presença de bactérias diazotróficas. Já variedades coletadas em Piracicaba (SP) e Timbaúba (PE), na maioria das amostras não foi detectado a presença de bactérias diazotróficas. O material analisado era muito diverso, foram coletadas plantas com idades diferentes e cultivadas sob inúmeros manejos. Foram analisadas plantas de três a 10 meses de idade e plantas adultas do qual não se teve informação da idade. Foram utilizadas cana planta ou cana soca com até oito cortes, cultivadas sob diferentes tipos de solos, clima e manejos, dificultando definir qual fator seria responsável pela variação populacional.

Tabela 3 Número de células ($\times 10^4$) por grama de peso fresco de bactérias diazotróficas associadas à variedades de cana-de-açúcar coletadas no estado do Rio de Janeiro.

Local de coleta	Variedade	Amostras	Meios de cultura	
			LGI	JMV
Seropédica	RB72-454	Colmo	ND ¹	0,45
		Raízes	0,2	4,0
		Rizosfera	0,15	110
	SP70-1143	Colmo	0,04	ND ¹
		Raízes	0,11	110
		Rizosfera	0,15	11
	CB47-89	Colmo	ND ¹	0,25
		Raízes	0,2	45,0
		Rizosfera	0,45	15,0
	Chunne	Colmo	ND ¹	ND ¹
		Raízes	0,2	0,11
		Rizosfera	0,15	0,04
	Krakatau	Colmo	ND ¹	ND ¹
		Raízes	0,45	0,11
		Rizosfera	0,14	0,04
Campos dos Goytacazes	Caiana Roxa	Colmo	0,45	0,45
		Raízes	0,09	0,40
		Rizosfera	0,25	7,0
	Caiana Amarela	Colmo	0,45	ND ¹
		Raízes	0,02	ND ¹
		Rizosfera	0,45	0,04
	CB45-3	Colmo	ND ¹	ND ¹
		Raízes	0,2	0,11
		Rizosfera	0,15	0,04
	AKBAR	Colmo	ND ¹	0,25
		Raízes	0,45	ND ¹
		Rizosfera	14	14,0
Paranavaí-PR	RB 855113	Colmo	0,4	0,45
		Raízes	0,95	1400
		Rizosfera	0,75	1,5
	RB72-454	Colmo	0,4	0,95
		Raízes	1,5	4500
		Rizosfera	11,0	11,0
Piracicaba – SP	SP87-432	Colmo	ND ¹	ND ¹
		Raízes	ND ¹	1400
		Rizosfera	ND ¹	300
	SP80-1842	Colmo	ND ¹	ND ¹
		Raízes	ND ¹	14
		Rizosfera	ND ¹	2,5
	SP80-3280	Colmo	ND ¹	ND ¹
		Raízes	ND ¹	110
		Rizosfera	ND ¹	11,0
Timbaúba - PE	SP78-4764	Colmo	ND ¹	0,45
		Raízes	ND ¹	4,0
		Rizosfera	110	110
	SP79-1011	Colmo	ND ¹	0,25
		Raízes	ND ¹	45
		Rizosfera	45	15
	SP87-344	Colmo	2,0	45
		Raízes	ND ¹	0,95
		Rizosfera	2,0	14

1: ND, não detectado pelo método

Ao final do processo de isolamento, foram obtidos 80 isolados semelhantes a *Burkholderia*, 43 em meio de cultura JMV e 36 em LGI, de 12 das 16 variedades analisadas (Figura 1). Não foram obtidos isolados das variedades Chunne, Krakatau e CB47-89, coletadas em Seropédica, RJ e SP87-432, coletada em Piracicaba, Estado de SP.

Na rizosfera e raízes, estava localizada a maioria das bactérias e foram destas amostras que se obteve o maior número de isolados. Isso indica que esta bactéria coloniza provavelmente a rizosfera e posteriormente o interior das plantas. Estudos de microscopia eletrônica em plântulas de arroz inoculadas com os isolados M130 e M209 de *Burkholderia* spp., revelaram maior ocorrência de bactérias na superfície das raízes primárias e secundárias, com colonização de algumas células da epiderme das raízes e em apenas alguns casos foi observado a colonização do xilema (BALDANI, 1996).

A metodologia tradicional para isolamento de bactérias diazotróficas, recomenda repicar duas vezes consecutivas as bactérias crescidas nos frascos inoculados com amostras de plantas. Neste trabalho, as bactérias cultivadas em meio de cultura semi - sólido foram riscadas diretamente em placas contendo o respectivo meio sólido. Após crescimento em placa, cada colônia diferente foi inoculada sozinha em frascos contendo o respectivo meio de cultura semi-sólido, quando crescidas foram novamente riscadas em placas para confirmação de pureza. A alteração na metodologia de isolamento sugerida nesta tese pode ter contribuído para a obtenção de um maior número de isolados. Esta estratégia buscou diminuir a pressão seletiva e competição entre os diferentes gêneros e espécies de bactérias crescendo numa mesma película. Produção de bacteriocinas já foi detectada em condições de cultura pura por 2 grupos de bactérias da espécie *G. diazotrophicus* sobre outros grupos da mesma espécie e das espécies *G. johannae*, *G. azotocaptans* e *G. liquefaciens* (MUÑOZ-ROJAS et al., 2005), e os autores comentaram que esta competição pode contribuir para o insucesso de isolamento de *G. johannae* e *G. azotocaptans* em cana-de-açúcar e a baixa diversidade observada na espécie *G. diazotrophicus*.

A literatura recomenda também que a adição de extrato de levedura só deve ocorrer em meio de cultura sólido. Quando as colônias diferentes foram repicadas para o meio de cultura semi-sólido, foi observado que poucas cresceram. Para solucionar este problema foi adicionado 20 mg de extrato de levedura, atuando como fator de crescimento em quantidade que não interferiu na atividade da enzima nitrogenase (dados não apresentados). Sabe-se que menos de 1% dos microrganismos são cultiváveis (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006), a mudança do interior da planta para um meio de cultura limitado nutricionalmente diminui a possibilidade de crescimento de bactérias. Meios de cultivo são muito seletivos e podem não representar o ambiente de vida de alguns organismos, sendo necessário a adição de fatores de crescimento. Uma experiência bem sucedida de adição de fatores de crescimento, foi a adição de caldo de cana ao meio de cultura LGI-P, facilitando o isolamento e *G. diazotrophicus* (REIS et al., 1994).

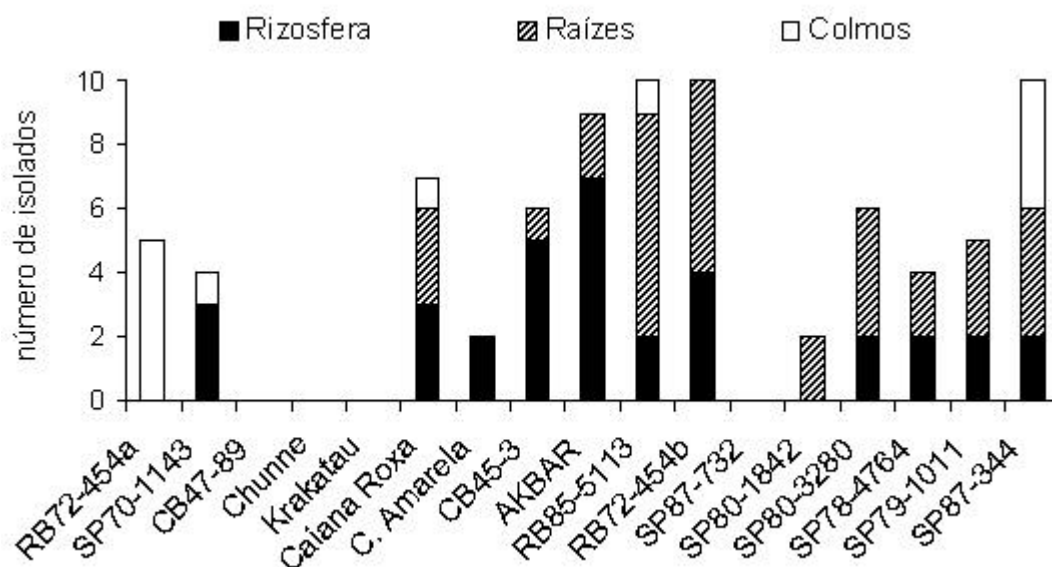


Figura 1: Número de isolados tipo *Burkholderia* spp. obtidos de variedades de cana-de-açúcar através dos meios de cultura JMV e LGI. RB72-454a: planta coletada em Seropédica, RJ; RB72-454b: planta coletada em Paranavaí, PR

3.2 Oxidação de Fontes de Carbono (BIOLOG)

Todos os 80 isolados obtidos de cana-de-açúcar e os 8 padrões do gênero foram cultivados no meio de cultura BUG, para o teste BIOLOG. Destes, apenas 6 apresentaram 100% de similaridade com o gênero *Burkholderia* e 58 não foram identificados, porém apresentaram similaridade com o gênero. Nesta etapa, 16 isolados que não apresentaram similaridade com *Burkholderia* foram eliminados do estudo: quatro por apresentarem 100% de similaridade com a espécie *H. seropedicae*, quatro identificados com 100% de similaridade com *Vibrio fluvialis*, quatro identificados como pertencentes ao gênero *Sphingomonas*, e quatro isolados identificados como pertencentes à *H. rubrisubalbicans*, *Brevundimonas*, *Agrobacterium* e *Ralstonia solanacearum*.

Todas as 95 fontes de carbono foram usadas pelos isolados e padrões testados, porém apresentaram grande variabilidade. Apenas sete delas, a – D – glicose, metilpiruvato, ácido cis aconítico, D, L – ácido lático, ácido bromo succínico, ácido succínico e L – asparagina, foram usadas por todos os 64 isolados e padrões testados. Metade das fontes de carbono foi usada pela maioria das amostras, e o restante poucos isolados conseguiram usar. Estes resultados foram semelhantes aos observados pelo uso de BIOLOG na caracterização de isolados em milho, onde de 76 a 89% das fontes de carbono foram usadas pela espécie *B. cenocepacia*, 81 a 84% por *B. ambifaria* e 76 a 84% por isolados da espécie *B. pyrocinia* (DALMASTRI et al., 2003).

Esses dados revelaram grande versatilidade metabólica entre os isolados do gênero *Burkholderia*, corroborando com resultados descritos na literatura (GILLIS et al., 1995; COENYE E VANDAMME, 2003) e possivelmente exsudados radiculares contribuem para esta habilidade. VERMIS e colaboradores (2003) também mostraram heterogeneidade na utilização de fontes de carbono por isolados do complexo *B. cepacia* bem como dentro dos genômavores.

Quando agrupados, observou-se grande variação entre os isolados e maior similaridade entre as estirpes padrões (Figura 2). Com 80% de similaridade foi observado a

formação de 12 grupos. O maior grupo (Grupo I) foi formado por 29 isolados com diferentes dados ecológicos, mais a estirpe padrão MTI641 de *B. unamae* (CABALLERO MELLADO et al., 2004), isolada de rizosfera de milho, cana-de-açúcar e café, no México. Na mesma ramificação ocorre a formação de um grupo (Grupo II) com 8 isolados e as estirpes padrões BR11366 de *B. tropica* (REIS et al., 2004), também isolada de cana-de-açúcar no Brasil e STM815 de *B. phymatum* (MOULIN et al., 2001) isolada de nódulos de *Aspalathus carnosa* coletada na África do Sul. Os grupos III, IV, VIII e XI possuem apenas um isolado cada, e os grupos V e IX, também com poucos isolados, englobam 5 dos 8 padrões testados. Os grupos VI, VII, X e XII se subdividem posteriormente e são formados apenas por isolados.

O agrupamento revelou que poucos isolados foram semelhantes aos padrões testados. O uso de BIOLOG na caracterização de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em arroz (RODRIGUES et al., 2006), mostrou que a maioria dos isolados eram semelhantes às *B. kururiensis* ou *B. vietnamiensis*, já isolados obtidos de cana-de-açúcar cultivada no Brasil e Austrália, pareceram mais versáteis nutricionalmente (BODDEY, 2002) e como neste estudo, poucos foram semelhantes aos padrões testados.

Neste estudo não foi observado semelhança nutricional entre os isolados em relação ao local de coleta das amostras, variedade de cana-de-açúcar ou parte da planta amostrada. Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos citados acima. Já o uso do sistema BIOLOG foi capaz de mostrar influência da planta em isolados de *Azospirillum amazonense*, uma espécie considerada similar nutricionalmente (REIS JUNIOR et al., 2004).

O sistema BIOLOG contribuiu na avaliação da diversidade e pode auxiliar na identificação dos isolados, porém não é suficiente para determinar espécies. Seu uso na identificação de isolados do solo da ilha Martinica mostrou pertencerem às espécies *B. cepacia* ou *B. glathei* (ACHOUAK et al., 1999), mas foram posteriormente descritos como uma nova espécie, nomeada *B. caribensis*.

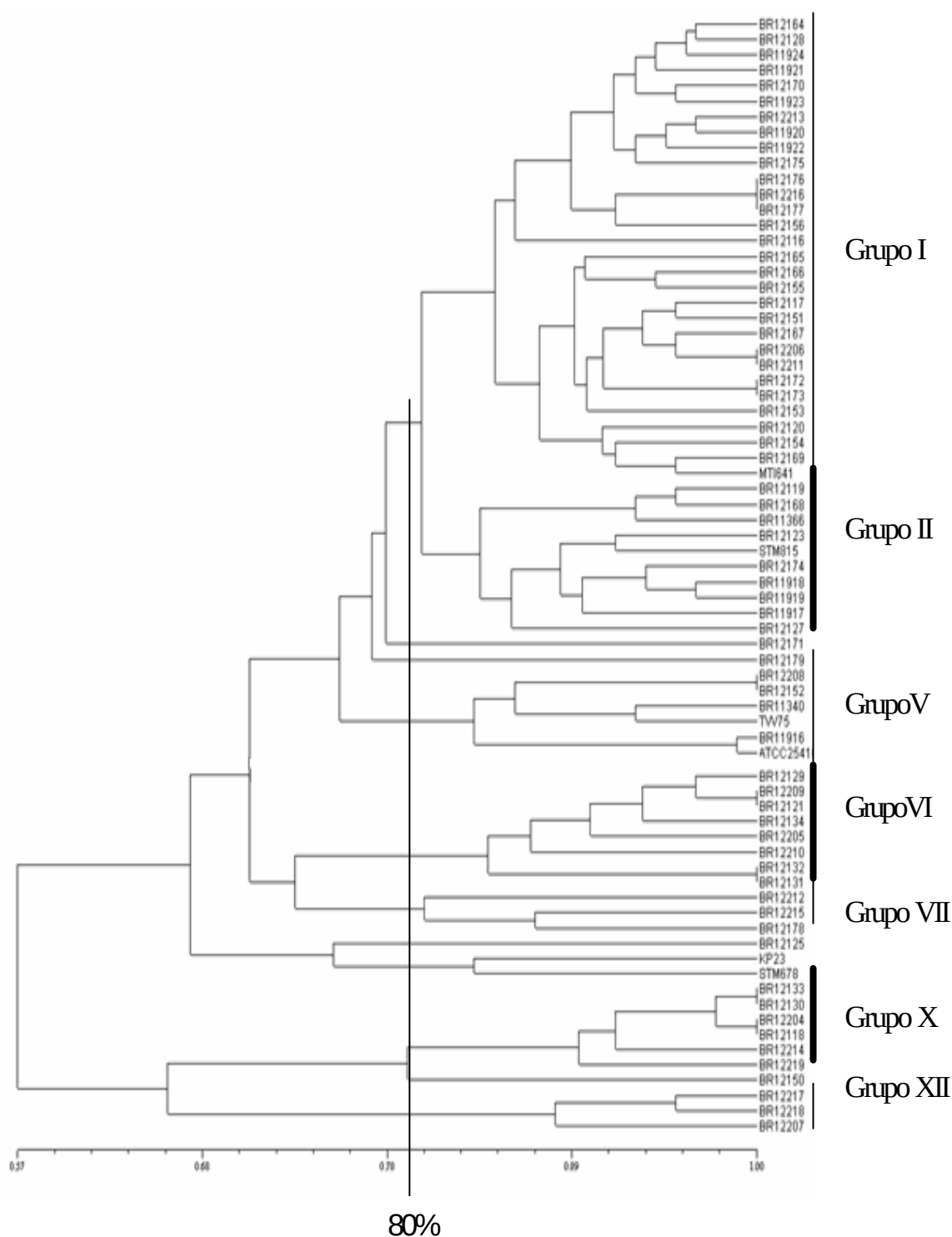


Figura 2: Dendrograma de similaridade de isolados do gênero *Burkholderia* spp., provenientes de variedades de cana-de-açúcar e das estirpes padrões de *B. vietnamiensis* (TVV75), *B. kururiensis* (KP23), *B. tropica* (BR11366), *B. cepacia* (ATCC25416), *B. unamae* (MTI641), *B. phymatum* (STM815) e *B. tuberum* (STM678) e espécie proposta *B. brasiliensis* (BR11340). Este dendrograma foi gerado no programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir da utilização de fontes de carbono pelo sistema BIOLOG.

3.3 Identificação do Gênero *Burkholderia*

Todos os isolados que foram identificados como pertencentes ao gênero *Burkholderia* ou similares ao gênero pelo teste BIOLOG, foram confirmados por PCR com o uso de iniciadores específicos (Figura 3). Estes resultados sugerem que ambos os meios de cultura usados, JMV e LGI, são eficientes para o isolamento de bactérias deste gênero. Estudos anteriores mostraram que o meio de cultura JMV possibilitou a obtenção de inúmeros isolados em arroz, mandioca e cana-de-açúcar (BALDANI, 1996), bananeiras e abacaxizeiros (WEBER et al., 1999), arroz inundado (BRASIL, 2005; RODRIGUES et al., 2006) e cana-de-açúcar (BODDEY, 2002). Já o meio de cultura LGI foi pouco usado para este fim, há apenas dois relatos na literatura de seu uso no isolamento de *Burkholderia*. Foi usado para isolamento em plantas de milho no México (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2002) e bananeiras e abacaxizeiros no Brasil (WEBER et al., 1999), e um variante deste meio, o LGI-P, desenvolvido para o isolamento de *G. diazotrophicus*, permitiu o isolamento da nova espécie *B. tropica*, em cana-de-açúcar no Brasil (REIS et al., 2004).

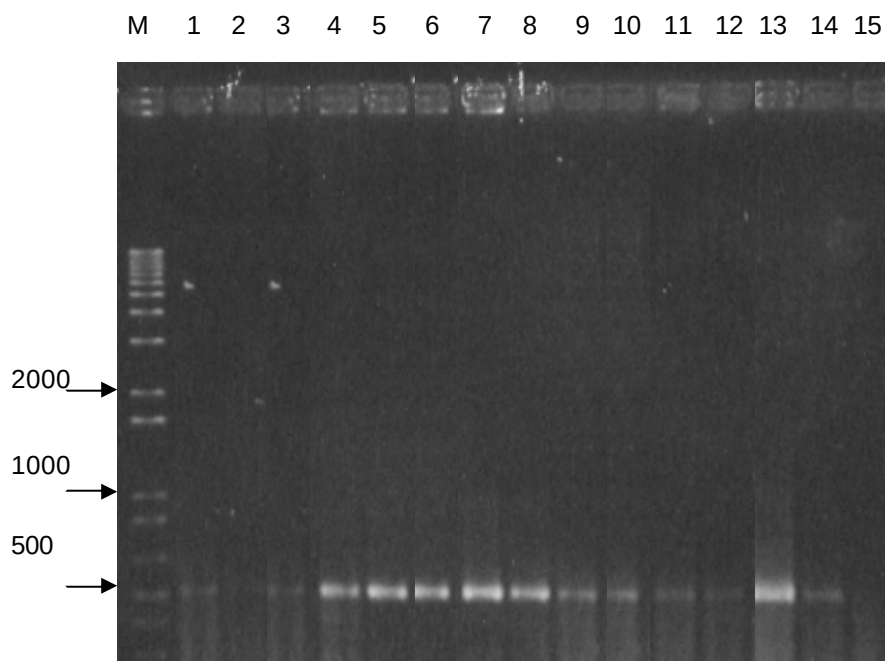


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação das regiões 16S flanqueada pelos iniciadores específicos para o gênero *Burkholderia*, Burk3 e BurkR. Legenda: (M) Marcador de peso molecular, 1 kb; (1) BR11366, controle positivo da reação, padrão da espécie *B. tropica*; (2 a 14) isolados e (15) água como controle negativo da reação.

3.4 Determinação da Atividade da Nitrogenase

Todos os isolados identificados como pertencentes ao gênero *Burkholderia* possuem o gene *nifH* (Figura 4), confirmando desta maneira seu caráter diazotrófico. Segundo ESTRADA DE LO SANTOS et al. (2001), este gênero é rico em bactérias diazotróficas e até o momento poucas espécies são conhecidas como diazotróficas devido à falta de estudos.

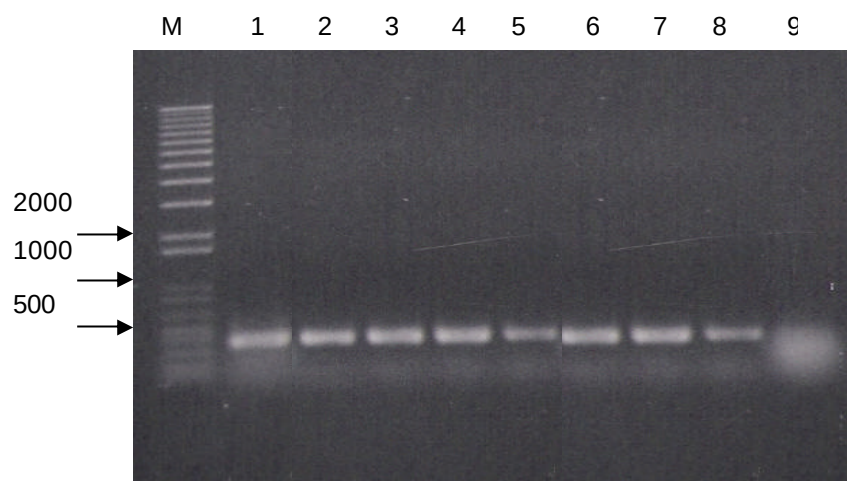


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação do gene *nifH* de isolados do gênero *Burkholderia* obtidos de cana-de-açúcar. Legenda: (M) Marcador de peso molecular, 1 kb; (1) BR11366, controle positivo da reação, padrão da espécie *B. tropica*; (2 a 8) isolados e (9) água como controle negativo da reação.

A leitura da redução de acetileno foi realizada com três dias de incubação a 30 °C, momento em que a película estava formada e atingiu a superfície. Todos os isolados e as estirpes padrões apresentaram capacidade de redução de acetileno, pela técnica da atividade de redução de acetileno (ARA) em meio de cultura BMGM. Mesmo usando um meio de cultura com três fontes de carbono, glicose, ácido málico e manitol, foi observado variação de 200 a 4 nmol de etileno por mg de proteína total em uma hora de incubação (Figura 5).

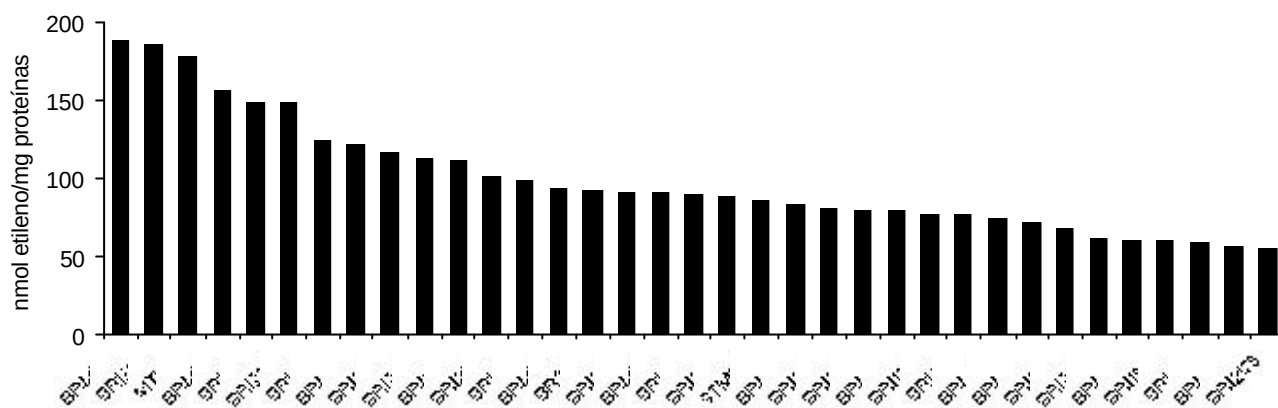
Variabilidade na atividade da nitrogenase entre isolados parece ser comum. Já foi observada entre isolados do gênero *Azospirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria* spp. (REIS JUNIOR, 2002), isolados de *A. amazonense* obtidos de plantas de arroz (RODRIGUES, 2004). Para bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* isoladas de arroz também foi observado variabilidade (RODRIGUES et al., 2006) e muitos valores foram baixos, assim como os padrões utilizados.

Entre isolados do gênero *Burkholderia* obtidos de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil e Austrália (BODDEY, 2002) e milho e café cultivados no México (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) também foi observado variação nos valores de redução de acetileno. Estes últimos autores ressaltaram que muitas espécies de bactérias fixadoras mostram tal habilidade sob condições de crescimento especiais e que varia dependendo da fonte de carbono usada.

Muitos isolados apresentaram valores baixos de FBN, porém esses valores obtidos em cultura pura não significam que a bactéria apresente os mesmos números quando no interior da planta. Como evidenciado por HAN e NEW, (1998), estirpes que tiveram alto desempenho em cultura pura apresentaram baixa ARA em associação com raízes de trigo.

A capacidade de redução de acetileno por todos os isolados confirma que a adição de pequenas quantidades de extrato de levedura não compromete o isolamento de bactérias diazotróficas.

A



B

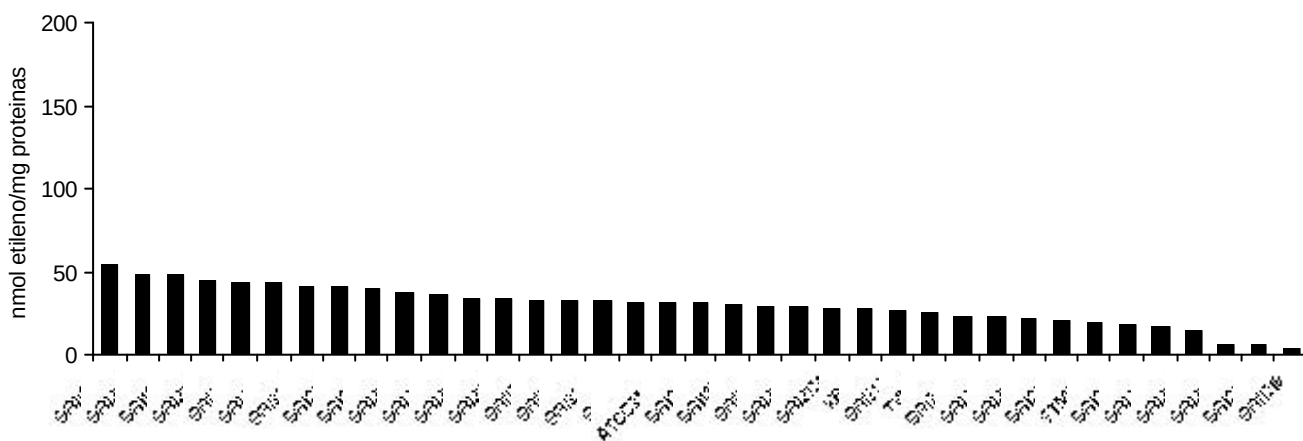


Figura 5: Quantificação da FBN utilizando a técnica de ARA em isolados de *Burkholderia* spp. provenientes de cultivares de cana-de-açúcar e estirpes padrões. Estirpe BR11340 (*B. brasiliensis*), TVV75 (*B. vietnamiensis*), KP23 (*B. kururiensis*), BR11366 (*B. tropica*), ATCC25416 (*B. cepacia*), MTI641 (*B. unamae*), STM815 (*B. phymatum*) e STM678 (*B. tuberum*). Valores referentes a média de três repetições.

3.5 Caracterização Morfológica de Colônias

Em meio de cultura LGI não houve variação na morfologia de colônias, todas eram amarelas, com aproximadamente 2 mm de diâmetro, com forma circular, elevação plana, borda inteira, superfície lisa e consistência seca.

Em meio de cultura JMV, os isolados e padrões apresentaram quatro tipos diferentes de colônias. Foram observadas variações no tamanho, cor, elevação e consistência. Um grupo, formado por 10 isolados e as estirpes TVV75 (*B. vietnamiensis*), KP23 (*B. kururiensis*), MTI641 (*B. unamae*) e ATCC2541 (*B. cepacia*) (Figura 6 A), apresentou colônias grandes, de cor amarela, elevação convexa e consistência gomosa. Outro grupo, formado apenas por seis isolados (Figura 6 B) apresentaram colônias com aproximadamente três mm, de cor creme, elevação convexa e também gomosa. Porém a maioria dos isolados formaram colônias com um a dois mm, amarelas e secas (Figura 6 C). Destes, 16 isolados e os padrões BR11340 (*B. tropica*), IPT101 (*B. sacchari*), STM815 (*B. phymatum*) e STM678 (*B. tuberum*) permaneceram com as mesmas características, porém a maioria deles, 32 isolados, sofreu alterações morfológicas. Após 10 dias de cultivo, estes isolados alteraram a elevação de convexa para puntiforme, podendo servir como proteção da nitrogenase ao oxigênio (DONG et al., 2002).

Novamente como observado no agrupamento pelo uso de fontes de carbono, a maioria dos isolados não foram similares aos padrões testados. Diferente do observado em bactérias do gênero *Burkholderia* em plantas de arroz, onde a maioria apresentou características semelhantes à espécie *B. kururiensis* e *B. vietnamiensis* (RODRIGUES, 2003).

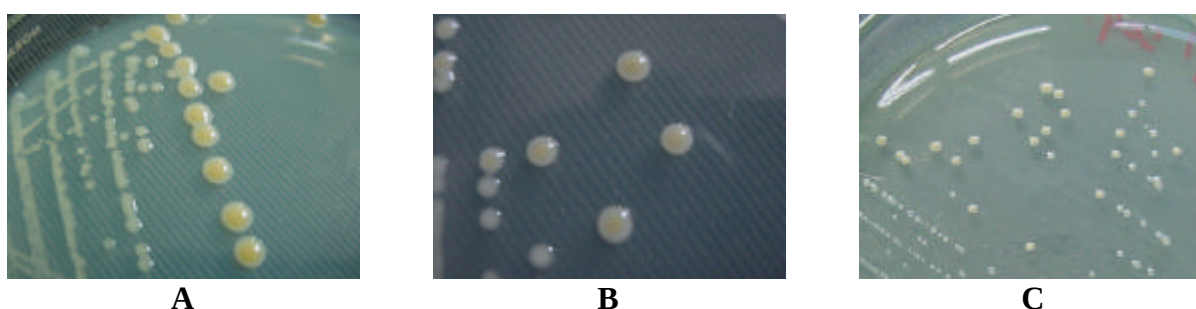


Figura 6: Morfologia de colônias em meio de cultura JMV de isolados do gênero *Burkholderia* spp. obtidos de plantas de cana-de-açúcar. A: isolado BR12132; B: isolado BR12133; C: isolado BR12116

3.6 Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificados (ARDRA)

A região 16S rDNA amplificada pela técnica de PCR (Figura 7) foi fragmentada com enzimas de restrição para identificar e avaliar a diversidade dos isolados. As enzimas analisadas apresentaram grande variação nos tamanhos dos fragmentos gerados. *MspI* foi a enzima que apresentou maior poder discriminatório, gerando 16 perfis diferentes, (Figura 8), seguido de *AluI* com 12 perfis diferentes (Figura 9), *HhaI* com 11 (Figura 10), *HinfI* com 9 (Figura 11) e *DdeI* com 7 tipos de perfis (Figura 12).

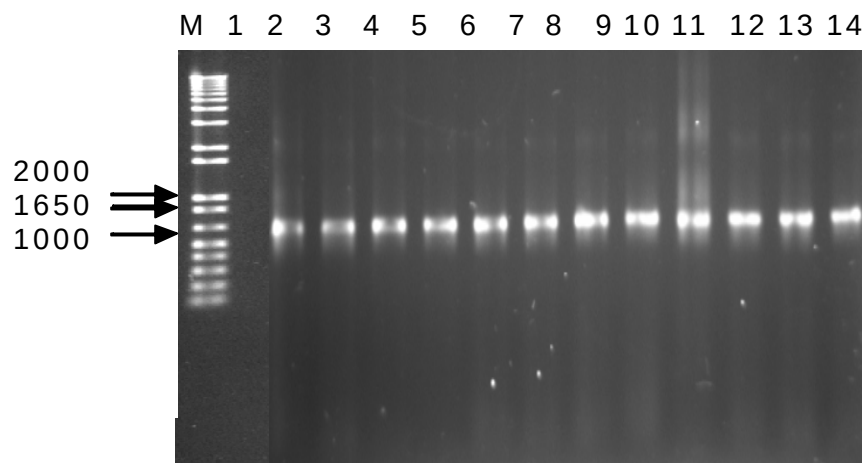


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação das regiões 16S flanqueada pelos iniciadores específicos Y1 e Y3. Legenda: (M) Marcador de peso molecular; (1) água como controle negativo da reação; (2) BR11366, controle positivo da reação, (3 a 14) isolados.

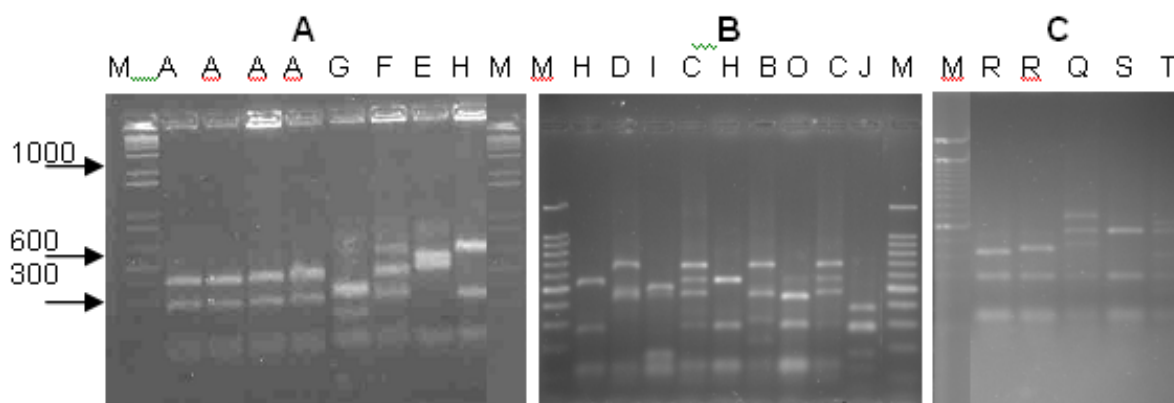


Figura 8: Perfil eletroforético gerado pela digestão com enzimas de restrição da região 16S rDNA dos isolados e estirpes padrões de *Burkholderia* com as enzima *MspI* (Figuras A, B e C). Legenda: M: marcador de 100 pb; A: isolado BR12164; G: isolado BR12131; F: isolado BR12215; E: isolado BR12219; H: isolado BR12171; D: estirpe BR 12134; I: isolado BR12207; C: isolado BR12125; B: isolado BR12211; O: isolado BR12132; J: isolado BR12133; R: estirpe TVV75 (*B. vietnamiensis*); Q: estirpe IPT101 (*B. sacchari*); S: estirpe STM815 (*B. phymatum*); T: estirpe STM678 (*B. tuberum*).

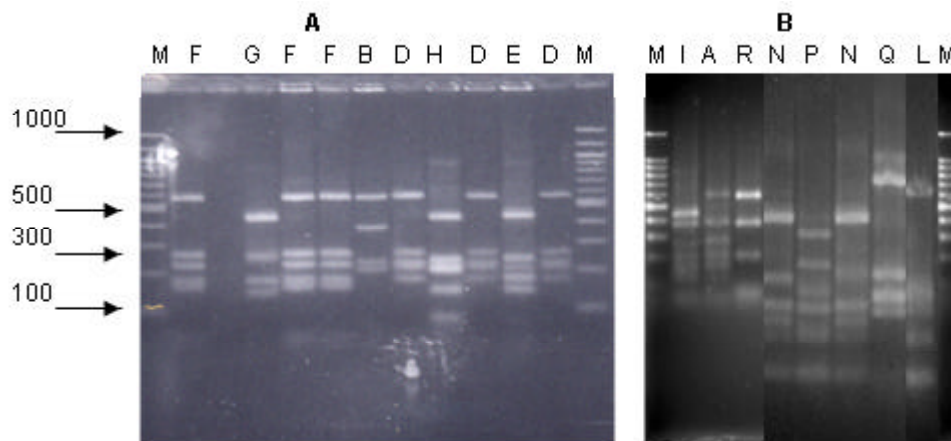


Figura 9: Perfil eletroforético gerado pela digestão com enzimas de restrição da região 16S rDNA dos isolados e estirpes padrões de *Burkholderia* com as enzima *AluI* (Figuras A e B). Legenda: M: marcador de 100 pb; F: isolado BR12164; G: isolado BR12131; B: isolado BR12132; D: isolado BR12119; I: isolado BR12214; A: isolado BR 12121; R: isolado BR12212; N: isolado BR P: isolado BR12130; Q: isolado BR12211; L: isolado BR11916.

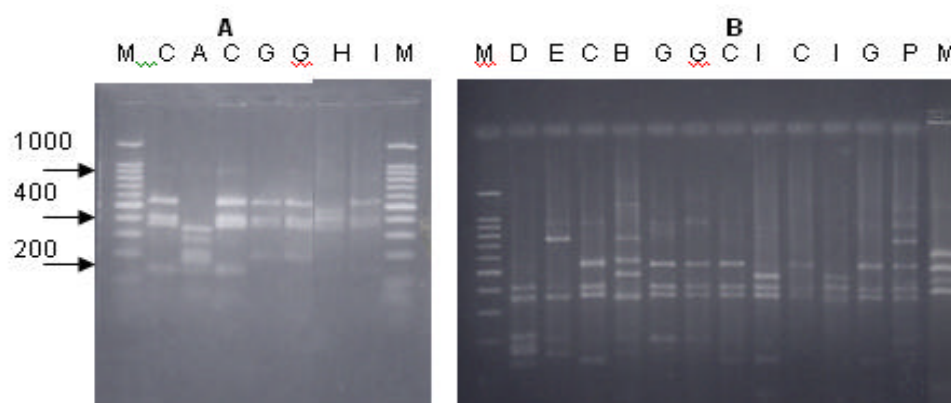


Figura 10: Perfil eletroforético gerado pela digestão com enzimas de restrição da região 16S rDNA dos isolados e estirpes padrões de *Burkholderia* com as enzima *HhaI* (Figuras A e B). Legenda: M: marcador de 100 pb; C: isolados BR12164, BR12116, BR12165, A: isolado BR12119; G: isolados BR12131; H: isolado BR12171; I: isolados BR12121, BR11916 e estirpe BR11340 (*B. brasiliensis*); D: isolado BR 12211; E: isolado BR12214; B: isolado BR12212; P: isolado BR12118.

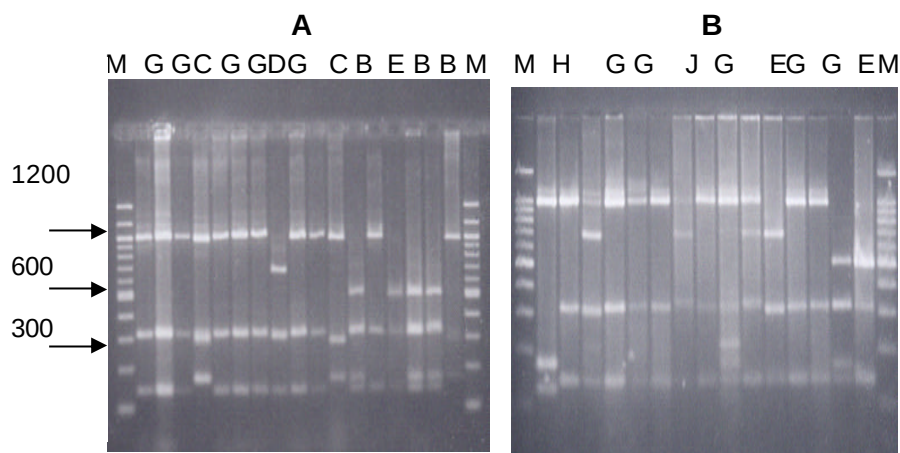


Figura 11: Perfil eletroforético gerado pela digestão com enzimas de restrição da região 16S rDNA dos isolados e estirpes padrões de *Burkholderia* com as enzima *Hinf*I (Figuras A e B). Legenda: M: marcador de 100 pb; G: isolados BR12164, BR12116, BR12166, BR12165, BR12129, BR12155, BR12177, BR12156, BR12120, BR12208, BR12169, BR11920, BR11921, BR11922 e BR11924; C: isolados BR12131 e BR12133; D: isolado BR12132; B: isolado BR11916 e estirpes BR11340 (*B. brasiliensis*), TVV75 (*B. vietnamiensis*) e KP23 (*B. kururiensis*), E: isolados BR12179, BR12207 e BR12212; H: isolado BR 12211; J: isolado BR12209; F: isolado BR12218.

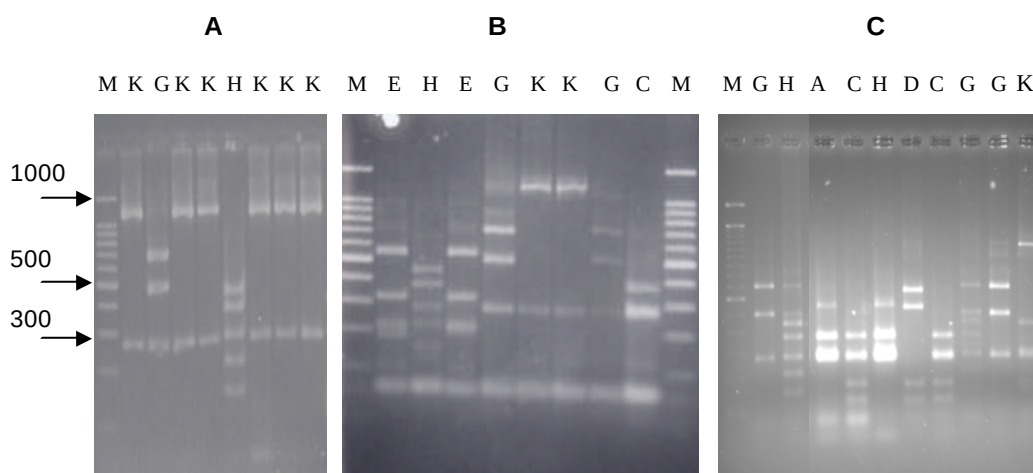


Figura 12: Perfil eletroforético gerado pela digestão com enzimas de restrição da região 16S rDNA dos isolados e estirpes padrões de *Burkholderia* com as enzima *Dde*I (Figuras A, B e C). Legenda: M: marcador de 100 pb; K: isolado BR12164; G: isolado BR12130; H: isolado BR12131; E: isolado BR12133; C: isolado BR11916; A: estirpe BR 11340 (*B. brasiliensis*); D:estirpe KP23 (*B. kururiensis*).

Na tabela 4 estão os dados ecológicos dos isolados avaliados. O uso da técnica de ARDRA mostrou grande variação entre os isolados, formando 26 tipos de cortes e foi capaz de identificar apenas cinco isolados, dois como *B. tropica* e três como *B. unamae*. Porém foi possível observar um grande grupo de isolados (Grupo I) com mesmo perfil de restrição.

Tabela 4: Padrão de restrição e dados ecológicos dos isolados diazotróficos do gênero *Burkholderia* obtidos de plantas de cana-de-açúcar. (Continua)

Local	Variedade	Meio	Amostra	Isolados	Padrão de restrição	Grupos
Seropédica RJ	RB72-454	JMV	Colmo	BR11920	fkagc	1
		JMV	Colmo	BR11921	fkagc	1
		JMV	Colmo	BR11922	fkagc	1
		JMV	Colmo	BR11923	fkagc	1
		JMV	Colmo	BR11924	fkagc	1
	SP70-1143	JMV	Rizosfera	BR11917	dgcd	2
		JMV	Rizosfera	BR11918	dgcd	2
		JMV	Rizosfera	BR11919	dgcd	2
		LGI	Colmo	BR11916	lcabi	3
		JMV	Rizosfera	BR12204	fkagc	1
Campos dos Goytacazes RJ	Caiana	JMV	Colmo	BR12205	nelcg	4
		JMV	Raízes	BR12206	fkagc	1
	AKBAR	JMV	Rizosfera	BR12207	agiej	5
		JMV	Rizosfera	BR12118	ahifp	6
		LGI	Rizosfera	BR12120	fkagc	1
		LGI	Rizosfera	BR12208	fkagc	1
		JMV	Rizosfera	BR12209	fhgja	7
		JMV	Rizosfera	BR12210	ghgcg	8
		LGI	Raízes	BR12168	dghga	9
		LGI	Raízes	BR12123	dghga	9
		JMV	Rizosfera	BR12169	fkagc	1
		LGI	Rizosfera	BR12152	fkagc	1
	CB45-3	LGI	Rizosfera	BR12121	agddi	10
		LGI	Raízes	BR12211	qkbhd	11
		LGI	Rizosfera	BR12212	rkdeb	12
		LGI	Rizosfera	BR12154	fkagc	1
Paranavaí - PR	RB 85-5113	LGI	Raízes	BR12164	fkagc	1
		LGI	Raízes	BR12116	fkagc	1
		LGI	Raízes	BR12165	fkagc	1
		LGI	Raízes	BR12129	fkagc	1
		LGI	Colmo	BR12130	pgaga	13
		LGI	Rizosfera	BR12131	ghgcg	8
		JMV	Raízes	BR12167	fkagc	1
		JMV	Rizosfera	BR12119	dgega	14
		JMV	Raízes	BR12153	fkagc	1
	RB72-454	LGI	Raízes	BR12132	bhodd	15
		LGI	Raízes	BR12166	fkagc	1
		JMV	Rizosfera	BR12133	nejcg	16
		LGI	Raízes	BR12134	phdde	17
		LGI	Rizosfera	BR12117	fkagc	1
		LGI	Rizosfera	BR12150	ahdde	18
		LGI	Raízes	BR12151	fkagc	1
Piracicaba SP	SP80-3280	JMV	Raízes	BR12170	fkagc	1
		JMV	Raízes	BR12171	fkghg	19
		JMV	Raízes	BR12155	fkagc	1
		JMV	Raízes	BR12177	fkagc	1
		JMV	Rizosfera	BR12156	fkagc	1
		JMV	Rizosfera	BR12128	fkagc	1

Tabela 4. Continuação

Local	Variedade	Meio	Amostra	Isolados	Padrão de restrição	Grupos
Piracicaba	SP80-1842	JMV	Raízes	BR12179	dghec	20
SP		JMV	Raízes	BR12125	dkcgh	21
Timbaúba	SP78-4764	JMV	Raízes	BR12172	fkagc	1
PE		JMV	Rizosfera	BR12173	fkagc	1
		JMV	Rizosfera	BR12175	fkagc	1
	SP87-344	LGI	Rizosfera	BR12213	fkagc	1
		JMV	Raízes	BR12127	dgcea	22
		JMV	Raízes	BR12174	dgcea	22
		JMV	Raízes	BR12214	ihdde	23
		JMV	Colmo	BR12215	hkfeb	24
		JMV	Colmo	BR12178	hkfeb	24
		JMV	Colmo	BR12176	hkfef	25
		JMV	Rizosfera	BR12216	hkfef	25
	SP79-1011	JMV	Rizosfera	BR12217	ihefa	26
		JMV	Rizosfera	BR12218	ihefa	26
		JMV	Raízes	BR12219	ihefa	26
				BR11366	dghga	9
				BR11340	laai	27
				TVV75	larai	28
				KP23	laai	27
				ATCC2541	lcraa	39
				MTI641	lrga	30
				M2Cy-717	dgcda	2
				IPT101	fcqai	31
				STM815	fgsga	32
				STM678	fkgtga	33

M2Cy717, genótipo 15a de *B. unamae*

Observa-se no agrupamento gerado pela técnica de ARDRA, como no agrupamento obtido pelo teste BIOLOG, que os isolados com diferentes dados ecológicos distribuem-se aleatoriamente ao longo do dendrograma e são pouco semelhantes aos padrões testados.

O dendrograma revelou a formação de inúmeros grupos com 85% de similaridade. Um grande grupo (Grupo I), identificado na tabela acima (Tabela 4) como grupo 1, composto por 30 isolados e mais 2 com 90% de similaridade, vem apresentando características similares também em outras análises. Foram semelhantes nutricionalmente pela oxidação de fontes de carbono e também apresentaram colônias distintas dos demais.

O grupo II foi formado apenas por padrões e o grupo II englobou 10 isolados e se subdivide posteriormente. No grupo III estão os 3 isolados identificados como *B. unamae* e mais 4 isolados próximos. Estes isolados pertencem ao genótipo 15a de *B. unamae*, que diferem um pouco do padrão MTI641, que pertence ao genótipo 15. Na subdivisão seguinte se encontra a estirpe padrão BR11366 da espécie *B. tropica* e três isolados, 2 com mesmo perfil de restrição da estirpe padrão e o isolado BR12179 que difere nas enzimas *HinfI* e *HhaI*, porém é muito próximo do padrão. Destes 9 isolados, 7 também permaneceram próximos aos padrões de *B. tropica* e *B. unamae* pelo teste BIOLOG, corroborando com os dados da literatura que mostram que estas duas espécies são muito próximas.

Apresentando maiores variações, foi observada a formação de 16 grupos, englobando 22 isolados e a maioria destes grupos possuem apenas 1 isolado. Os dados mostraram grande

variabilidade entre os isolados de *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e não foi observada influência da planta e local de coleta sobre a diversidade da comunidade.

Apesar de espécies próximas, a maioria dos isolados de *B. tropica* obtidos neste estudo, cresceram em meio de cultura LGI e *B. unamae* em JMV. Os 2 isolados de *B. tropica* foram obtidos de raízes da variedade AKBAR, coletada em Campos dos Goytacazes, no estado do Rio de Janeiro em meio de cultura LGI e o isolado semelhante, de raízes da variedade SP80-1842, coletada em Piracicaba-SP, foi obtido em meio de cultura JMV. O meio de cultura LGI possui menor concentração de sacarose e maior pH que o meio de cultura LGI-P, onde foram obtidos os primeiros e únicos isolados desta espécie em cana-de-açúcar no Brasil (REIS et al., 2004), porém permitiu o isolamento de novos representantes neste estudo.

Os isolados identificados como *B. unamae*, foram obtidos em meio de cultura JMV e da rizosfera da variedade SP70-1143, coletada em Seropédica-RJ. Dos quatro isolados semelhantes a esta espécie, dois foram obtidos de raízes da variedade SP87-344, em Timbaúba-PE, um da rizosfera em meio de cultura JMV e outro, de colmos em meio de cultura LGI, ambos da variedade RB85-5113, coletada em Paranaíba-PR.

Apesar do baixo número de isolados de *B. tropica* e *B. unamae*, estes resultados contribuem para o estudo da ecologia destas espécies. *B. unamae* já foi isolada da rizosfera de cana-de-açúcar na África do Sul e milho, cana-de-açúcar, café e tomate no México (CABALLERO-MELLADO et al., 2004) e agora de cana-de-açúcar coletada na região Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. *B. tropica* foi isolada de milho e teosinte no México, cana-de-açúcar no Brasil, México e África do Sul (REIS et al., 2004), abacaxi no Brasil (CRUZ et al., 2001) e um estudo mostrou que um isolado de *Ammophila arenaria* nos EUA era 99% similar a *B. tropica* (DALTON et al., 2004). Este estudo mostrou que além de Pernambuco, local do primeiro isolamento de *B. tropica* no Brasil, foram obtidos isolados também de canaviais localizados nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo.

Outros estudos não mostraram isolamento destas espécies no Brasil em plantas de cana-de-açúcar (BODDEY, 2002) e arroz (RODRIGUES, 2003; BRASIL, 2005), sendo este o primeiro relato de sua ocorrência. Também como nos estudos anteriores, onde apenas quatro isolados de cana-de-açúcar e dois de abacaxi foram obtidos no Brasil, poucos isolados são da espécie *B. tropica*. Porém, não é possível determinar se estas espécies se encontram em baixos números em cana-de-açúcar, a condição de isolamento não as beneficia ou ocorre algum tipo de antagonismo no processo de isolamento, limitando seu desenvolvimento.

A análise de restrição da 16S rDNA mostrou grande variação entre os isolados e a maioria é diferente dos padrões, semelhantes ao obtido com isolados deste gênero em plantas de milho e café cultivados no México (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001), onde posteriormente duas novas espécies foram descritas a partir destes isolados, *B. tropica* (REIS et al., 2004) e *B. unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004). Grande diversidade entre os isolados diazotróficos do gênero *Burkholderia* já foi observado em plantas de cana-de-açúcar (BODDEY, 2002), arroz (RODRIGUES, 2003; BRASIL, 2005) e banana e abacaxi (CRUZ et al., 2001), sendo que em arroz, banana e abacaxi, a diversidade foi maior que isolados do gênero *Herbaspirillum*. Provavelmente o caráter endofítico contribui para a baixa diversidade de bactérias, como verificado acima para o gênero *Herbaspirillum* e na espécie *G. diazotrophicus* (CABALLERO-MELLADO et al., 1994 e 1995), já bactérias com melhor sobrevivência no solo como *Azospirillum*, apresentam elevada diversidade (BALDANI et al., 2002). Como já descrito na introdução deste capítulo, o gênero *Burkholderia* foi isolado em inúmeros ambientes e sua alta diversidade metabólica reflete também em alta diversidade genética.

Embora amplamente usada para identificação, a técnica de ARDRA não é suficiente para identificar espécies. A análise da 16S rDNA do complexo *B. cepacia*, pela técnica de ARDRA permitiu a discriminação de duas espécies *B. vietnamiensis* e *B. multivorans* mas não

separou os genótipos I, III e *B. stabilis* (MAHENTHIRALINGAM et al., 2000), portanto é necessário o uso de técnicas mais precisas para confirmação das espécies dos isolados, como o sequenciamento da região 16S rDNA.

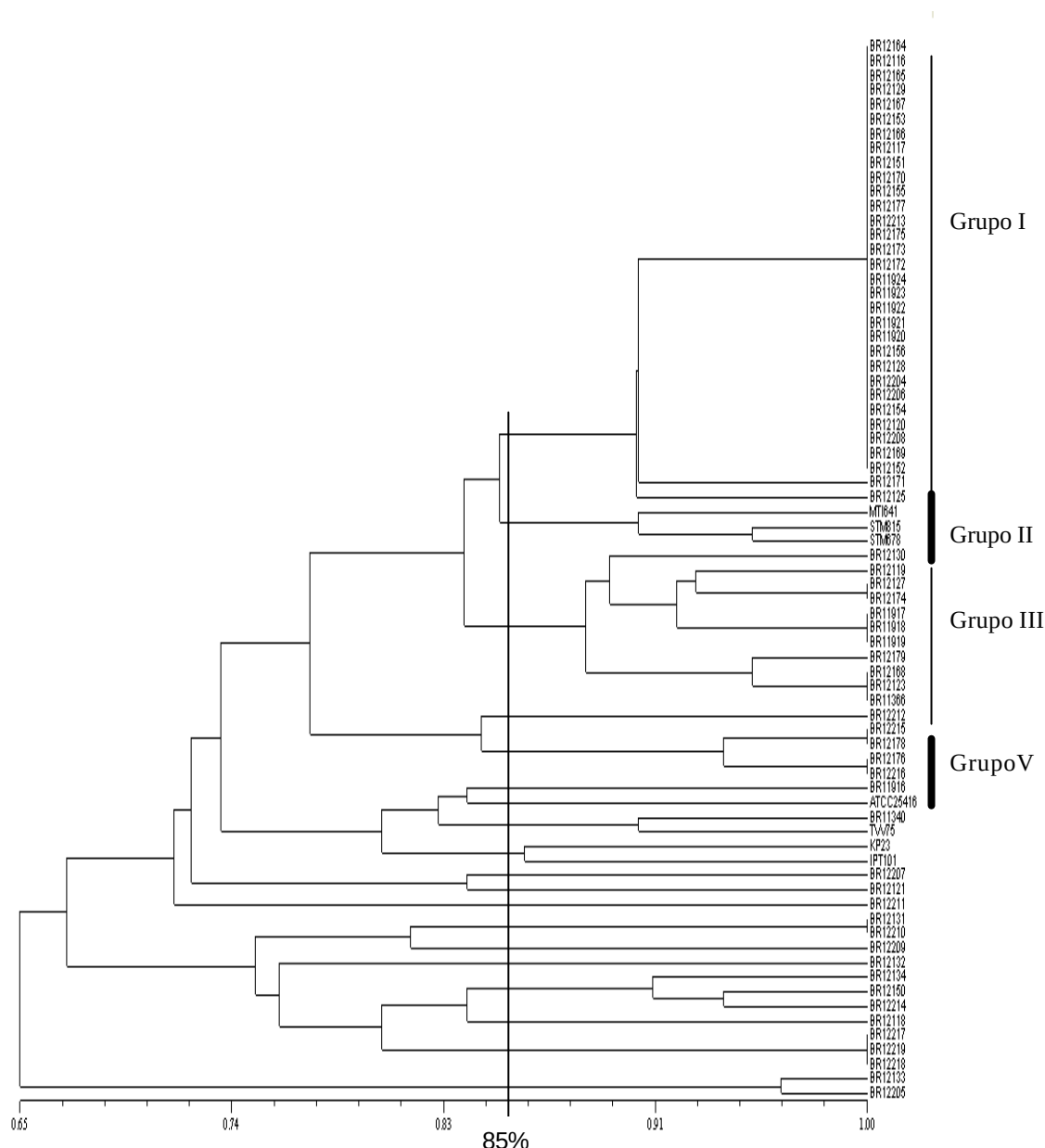


Figura 13: Dendrograma de similaridade de isolados do gênero *Burkholderia* spp., provenientes de variedades de cana-de-açúcar e das estirpes padrões *B. vietnamiensis* (TVV75), *B. kururiensis* (KP23), *B. tropica* (BR11366), *B. cepacia* (ATCC25416), *B. unamae* (MTI641), *B. phymatum* (STM815) e *B. tuberum* (STM678) e espécie proposta *B. brasiliensis* (BR11340). Este dendrograma foi gerado no programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir da digestão com enzimas de restrição da região 16S rDNA amplificada por PCR.

3.7 Sequenciamento da Região 16S rDNA

O gene 16S rDNA é o mais utilizado para estudos filogenéticos e taxonômicos em bactérias, devido a sua característica de universalidade, constância (tamanho da molécula de 1500 pb é constante para todas as bactérias) e funcionalidade, que não é afetada por mudanças ambientais (WOESE, 1987) além de ser uma molécula com baixa homologia entre os reinos (WOESE & FOX, 1977).

Foi sequenciada a região 16S rDNA de dois isolados do grupo 1 (Tabela 4 e Figura 13), um grupo representativo e pouco semelhante às estirpes padrões testadas. O isolado BR12116, obtido de raízes da variedade RB85-5113, coletada em Paranaíba - PR foi sequenciado no Brasil com a metodologia descrita nesta tese e a o isolado BR11920, obtido de rizosfera da variedade SP70-1143, coletada em Seropédica - RJ foi sequenciado pela equipe do Dr. Jesus Caballero-Mellado. A comparação destas seqüências com seqüências de espécies do gênero *Burkholderia* presentes no banco de dados, mostrou que estes dois isolados apresentaram 100% de similaridade com o isolado BR11563, obtido de raízes de abacaxizeiro, variedade Perolera, coletado em Cruz das Almas - BA e muito próximo do isolado BR11680, isolado de pseudo caule de abacaxizeiro, variedade Pérola, coletado em Macaé - RJ (Figura 14). Estes isolados foram obtidos por Olmar Baller Weber (WEBER et al., 1999), estavam depositados na coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia e foram introduzidos neste estudo. Em estudo anterior (CRUZ et al., 2001), relataram que estes e mais dois isolados com mesmo perfil de restrição, possivelmente pertenciam a uma nova espécie.

Os dois isolados sequenciados foram semelhantes entre si e apresentaram 97% de similaridade com a espécie mais próxima, *B. unamae* (Figura 14). De acordo com os dados da literatura, organismos que possuam menos de 97% de similaridade em suas seqüências do 16S rDNA não irão apresentar dados de reassociação do DNA maiores do que 60%, independentemente da metodologia utilizada (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994), sendo provavelmente uma nova espécie.

Como a região 16S rDNA é muito conservada, não é ideal para separar espécies muito próximas. Portanto, serão usadas técnicas mais precisas, como homologia DNA-DNA e AFLP, que avaliam não apenas um gene, mas o genoma de todo o organismo.

O processo de isolamento deste material foi relativamente simples e mesmo sujeito a limitação pelo uso de meios de cultura, permitiu o isolamento de um grande número de isolados diazotróficos do gênero *Burkholderia*, muito diferentes entre si e com os padrões das espécies descritas. Possibilitando provavelmente a descrição de uma nova espécie, que talvez não seja a única, pois como dito anteriormente os isolados são muito distintos.

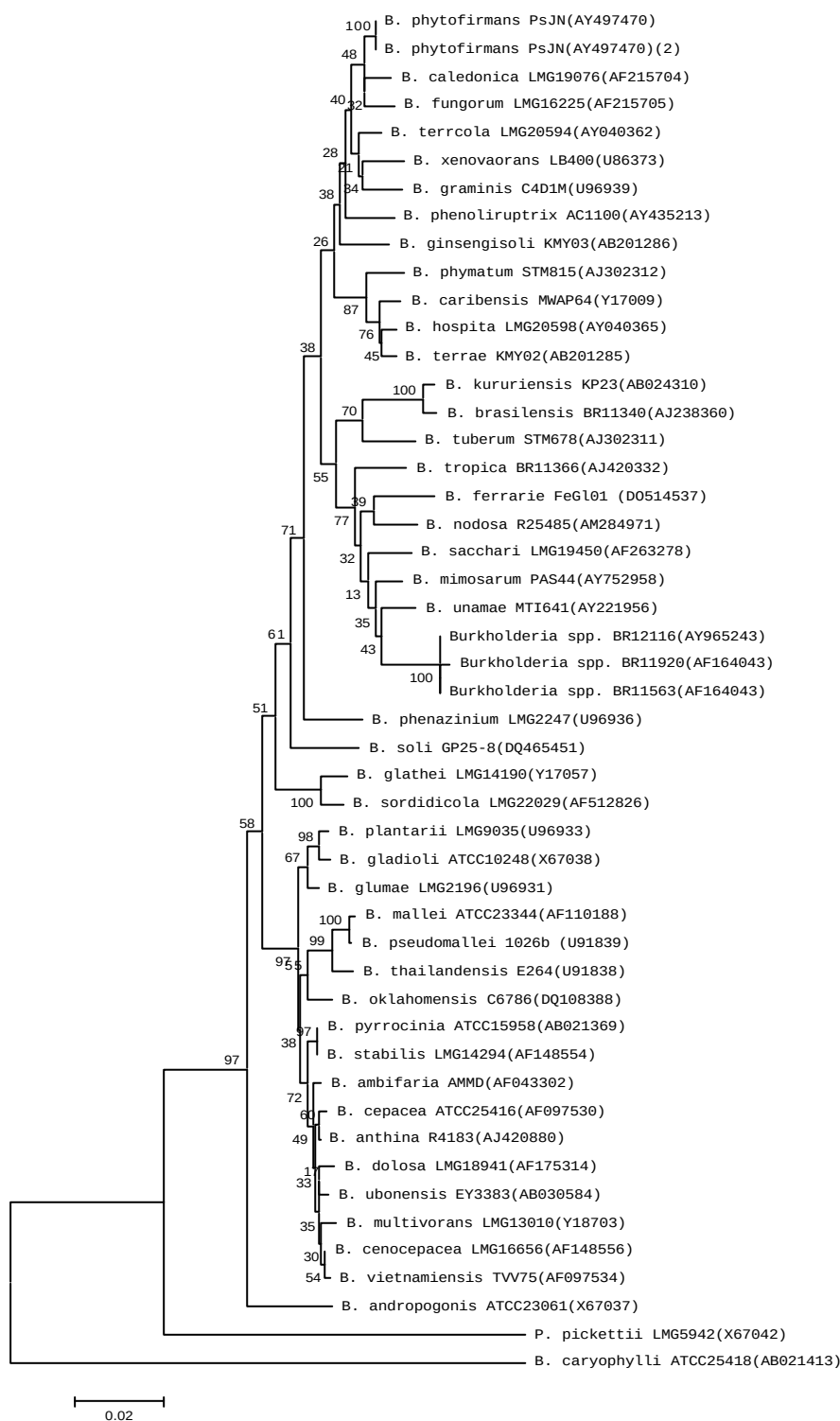


Figura 14: Análise filogenética da sequência do gene 16S rDNA dos isolados diazotróficos BR11920 e BR12116, obtidos de cana-de-açúcar, comparados às espécies de *Burkholderia* presentes no banco de dados do NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information). As sequências foram alinhadas no programa CLUSTALW, e agrupadas pelo método Neighbour-joining no programa MEGA com 1000 repetições. O número de acesso dos isolados ao banco de dados se encontra entre parênteses.

4 CONCLUSÕES

- a) Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* estão presentes na maioria das variedades de cana-de-açúcar analisadas, em maior número nas raízes e rizosfera;
- b) Dos 80 isolados obtidos, 64 pertencem ao gênero *Burkholderia*, apresentam o gene *nifH* e atividade da nitrogenase em meio de cultura;
- c) Os isolados apresentaram grande variação no uso de fontes de carbono e a maioria difere dos padrões analisados;
- d) Apenas 5 isolados foram identificados pela técnica de ARDRA, 2 pertencem à espécie *B. tropica* e 3 à *B. unamae*;
- e) 32 isolados, similares na maioria das análises, não foram identificados pela técnica de ARDRA e seqüenciamento da região 16S rDNA;
- f) Não foi possível detectar efeito das variedades ou do solo na diversidade dos isolados de *Burkholderia*;
- g) Os resultados obtidos nas diferentes técnicas, aplicadas para caracterização das bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*, isoladas de cana-de-açúcar, sugerem a presença de nova espécie.

CAPÍTULO II

DESCRIÇÃO DE *Burkholderia silvatlantica*, UMA NOVA ESPÉCIE DE BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA

RESUMO

O gênero *Burkholderia* foi criado em 1992 e conta atualmente com 36 espécies descritas. Colonizam diversos nichos ecológicos, desde plantas, solos contaminados e seres humanos, sendo um importante componente da comunidade microbiana destes habitats. Das espécies descritas atualmente, oito são diazotróficas e estudos recentes mostraram que isolados de mais quatro espécies fixam nitrogênio atmosférico, sendo capaz de formar nódulos em leguminosas e também se associar à rizosfera e tecidos internos de *Poaceas*. O objetivo deste estudo foi descrever uma nova espécie diazotrófica do gênero *Burkholderia*, com isolados obtidos de cana-de-açúcar, milho e abacaxi. Para ampliar o número de isolados da espécie proposta, foram coletadas plantas de milho para contagem e isolamento de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* nos meios de cultura LGI e JMV. Estes isolados foram caracterizados e juntamente com os isolados de cana-de-açúcar e abacaxi, foram descritos como uma nova espécie. Também foi avaliada a capacidade de solubilização de fosfatos, produção de hormônios vegetais, capacidade de crescimento em meio de cultura semi - sólido, capacidade de nodulação e diversidade da espécie. As maiores populações em plantas de milho foi encontrada nas raízes e rizosfera. Foram obtidos 11 isolados, semelhantes no uso de fontes de carbono e pela técnica de ARDRA. O sequenciamento da região 16S rDNA e hibridização DNA:DNA confirmaram que os isolados obtidos de cana-de-açúcar, milho e abacaxi, não pertenceram a espécies já descritas e foram sugeridos como nova espécie de nome *B. silvatlantica*. Esta espécie possui células em forma de bastonete, individualizadas e com flagelos polares. Pode ser diferenciada das outras espécies pela técnica de ARDRA. Não solubiliza fosfato inorgânico e não produz hormônios vegetais. Cresce e fixa nitrogênio em meio de cultura semi-sólido e não nodula plantas de feijão, siratro, *Mimosa pellita* e *M. pudica*, como as outras espécies de *Burkholderia* isoladas de *Poaceas*. Já foram obtidos 47 isolados de *B. silvatlantica* em cana-de-açúcar, milho e abacaxi. Esta espécie predomina entre as bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* isoladas de cana-de-açúcar e apresenta ampla distribuição. Estes resultados confirmam que o gênero *Burkholderia* é rico em espécies e habitats e que a capacidade de fixar nitrogênio é comum neste gênero.

Palavras – chave: Fixação Biológica de Nitrogênio. Cana-de-açúcar. Milho

ABSTRACT

The *Burkholderia* genus was created in 1992 and currently counts on 36 described species. They colonize several ecological niches since plants, contaminated soil and human beings, being an important component of these habitats microbiological community. From the currently described species, eight are diazotrophic and recent studies had shown that isolates from other four species fix atmospheric nitrogen, being the only genus capable of forming nodules in leguminous and also associates with the rizosphere and internal tissues of *Poaceas*. The objective of this study was to describe a new diazotrophic species of the *Burkholderia* genus, with isolates gotten from sugarcane, maize and pineapple. To extend the number of isolates from the proposal species, plants of maize were collected for counting and isolation of *Burkholderia* diazotrophic bacteria in the culture media LGI and JMV. This isolates were characterized and together with isolates from sugarcane and pineapple, were described as a new species. Also, the capacity of phosphates solubilization, vegetal growth production hormone, growth capacity in semisolid culture media, nodulation capacity and diversity of the species were evaluated. The higher populations in maize plants were found in the roots and rizosphere and culture media JMV. Eleven isolates, similar in the use of carbon sources and by the technique of ARDRA, were gotten. The sequencing of the 16S rDNA region and hybridization DNA: DNA had shown that the isolates gotten from sugarcane, maize and pineapple, did not belong to the species already described and had been suggested as a new species named by *B. silvatlantica*. This species had cells in rod form, individualized and with polar flagels. It was differentiated of the other species by the ARDRA technique. It solubilized inorganic phosphate and did not produce vegetal hormones. It grew and fixed nitrogen in semisolid culture media and did not nodulate bean, siratro, *Mimosa pudica* and *M. pellita* plants, as the other isolated *Burkholderia* species of *Poaceas*. Fourty-seven *B. silvatlantica* isolates had been already gotten from sugarcane, maize and pineapple and this species predominates among the diazotrophic *Burkholderia* bacteria isolated from sugarcane and presents wide distribution. These results confirmed that the *Burkholderia* is a rich genus in species and habitats with the capacity of fixing nitrogen.

Key words : Biological Nitrogen Fixation. Sugarcane. Maize.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Descrição do Gênero *Burkholderia*

Diversos estudos filogenéticos mostraram que o gênero *Pseudomonas* apresentava organismos muito distintos. Estes foram separados em cinco grupos, que não se relacionavam muito bem e abrigavam espécies de outros gêneros (PALLERONI et al., 1973, GILLIS et al., 1995). O grupo I foi o único aceito como autêntico do gênero *Pseudomonas* e novos gêneros foram descritos com os outros grupos. O grupo II incluiu as espécies *P. solanacearum*, *P. cepacia*, *P. gladioli*, *P. caryophylli*, *P. mallei*, *P. pseudomallei* e *P. pickettii*, e foram propostos como gênero *Burkholderia*.

O gênero *Burkholderia* foi criado por YABUUCHI et al. (1992), sendo a espécie *B. cepacia*, escolhida como espécie tipo do gênero, e as espécies *P. andropogonis*, *P. glumae*, *P. plantarii* e *P. syringii* foram introduzidas ao novo gênero. Mais tarde, estudos de taxonomia polifásica revelaram que *B. cepacia* não era uma única espécie. Constituiu o que se chamou de “complexo”, composto de inúmeras novas espécies similares fenotipicamente, chamados de genomovares (VANDAMME et al., 2002b). Atualmente, o complexo *B. cepacia* compreende nove genomovares. Genomovar I: *B. cepacia*; genomovar II: *B. multivorans*; genomovar III: *B. cenocepacia*; genomovar IV: *B. stabilis*; genomovar V: *B. vietnamiensis*; genomovar VI: *B. dolosa*; genomovar VII: *B. ambifaria*; genomovar VIII: *B. anthina* e genomovar IX: *B. pyrocinia* (COENYE et al., 1999a). Estas espécies possuem moderado nível de hibridização (30 a 50%) mas a região 16S rDNA é muito similar (98 a 99%) assim como o gene *recA* (94 a 95%).

Desde 1992, a lista de espécies do gênero *Burkholderia* mudou inúmeras vezes. Muitas espécies foram removidas do gênero (YABUUCHI et al., 1995), muitas foram mais tarde adicionadas (GILLIS et al., 1995; VIALARD et al., 1998) e inúmeras espécies foram descritas. Atualmente, em adição aos nove genomovares do complexo *B. cepacia*, 35 outras espécies constituem o gênero (NCBI, 2007). São elas: *B. andropogonis* (englobou *P. woodsii*), *B. caledonica*, *B. caribensis*, *B. caryophylli*, *B. ferrarie*, *B. fungorum*, *B. ginsengisoli*, *B. gladioli* patovares *cocovenenans* e *agaricicola*, *B. glathei*, *B. glumae*, *B. graminis*, *B. hospita*, *B. koorensis*, *B. kururiensis*, *B. mallei*, *B. mimosarum*, *B. oklahomensis*, *B. phenazinium*, *B. phenoliruptrix*, *B. phymatum*, *B. phytofirmans*, *B. plantarii*, *B. pseudomallei*, *B. sacchari*, *B. singaporensis*, *B. soli*, *B. sordidicola*, *B. terricola*, *B. thailandensis*, *B. tropica*, *B. tuberum*, *B. ubonensis*, *B. unamae*, *B. xenovorans* e *B. terrae*. E mais duas, *B. brasilensis* e *B. nodosa*, foram propostas como novas espécies e estão em processo de descrição. As bactérias “*Candidatus B. kirkii*, *nigropunctata*, *calva* e *verschuerenii*”, constituem grupo à parte por não serem cultiváveis em meio de cultura, consequentemente sua publicação não é validada e não podem ser designadas nova espécie.

1.2 Distribuição e Diversidade

Espécies de *Burkholderia* tem ampla distribuição, ocorrendo comumente no solo, água, plantas, fungos, animais e humanos. Com exceção das espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei*, causadoras das doenças mormo em animais e melioidosis em humanos, e as espécies do complexo *B. cepacia* em pacientes com Fibrose Cística, a maioria das espécies aparentemente não são patogênicas.

Algumas espécies foram originalmente isoladas de amostras de solo de áreas agrícolas, como *B. glathei* (VIALARD et al., 1998), *B. phenazinium*, *B. hospita*, *B. terricola* (GORIS

et al., 2002), *B. caribensis* (ACHOUAK, et al., 1999), *B. soli* (YOO et al., 2007) e *B. sacchari* (BRAMER et al., 2001). *Burkholderia sacchari*, foi isolada de solo de canavial brasileiro (GOMEZ et al., 1996) e tem grande potencial para a indústria. Produz e acumula polihidroxialcanoatos (PHAs), polímeros com importantes propriedades plásticas (BRAMER et al., 2001).

Em interações não patogênicas com plantas, *B. graminis* tem sido descrita associada ao rizoplasma de milho e trigo na Austrália e França (VIALARD et al., 1998), enquanto *B. caledonica* foi isolada da rizosfera de plantas na Escócia (COENYE et al., 2001a) e espécies pertencentes ao complexo *B. cepacia* são freqüentemente encontrada em associação com grama (NIJHUIS et al., 1993) e raízes de milho (DI CELLO et al., 1997). A recente espécie descrita *B. phytofirmans*, foi originalmente isolada de superfície desinfestada de raízes de alho e também coloniza rizosfera e tecidos de batata, tomate e uva (SESSITSCH et al., 2005). Isolados identificados como *B. cenocepacia* foram obtidos de tecidos de trigo, milho e tremoço no Sul da Austrália e França (BALANDREAU et al., 2001), e as espécies “*Candidatus B. calva*, *B. nigropunctata* e *B. kirkii*” foram encontradas em folhas de *Psychotria* (VAN OEVELEN et al., 2002, 2004).

As espécies *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamiensis* e *B. anthina*, foram isoladas de dois rios da Europa, (VERMIS et al., 2003) e *B. kururiensis* foi isolada de um sítio aquífero poluído com tricloroetileno, no Japão (ZHANG et al., 2000).

Outas espécies foram encontradas em associação com fungos. *B. fungorum* foi isolada do fungo *Phanerochaete chrysosporium*, e foi sugerido que há relação simbiótica entre a bactéria e o fungo (COENYE et al., 2001b). A espécie *B. sordidicola* foi isolada do fungo *Phanerochaete sordicola* e também encontrada na microflora de formigas *Tetraponera*, (VAN BORM et al., 2002).

B. cepacia tem metabolismo muito versátil. Foi encontrada em pacientes com FC (Fibrose Cística), causa doença em cebola, promove crescimento em plantas de feijão e trigo e fixa nitrogênio atmosférico em associação com milho, degrada compostos xenobióticos e atua no controle biológico de inúmeros fungos. Esta grande variabilidade de funções entre os organismos deste gênero pode ter sido adquirida via transferência lateral de genes. A detecção de seqüências de inserções em *B. pseudomallei* que já tinham sido detectadas em *B. cepacia*, mostra uma possível transferência horizontal de material genético entre estas espécies (MACK & TITBALL, 1998).

Estas diferenças possivelmente permitem versatilidade nutricional e adaptabilidade, possibilitando que um mesmo organismo possa sobreviver em diferentes condições. Esta redundância de funções é ecologicamente importante para a sustentabilidade dos sistemas, porém a interferência humana na distribuição destes organismos ou sua introdução no ambiente deve ser cuidadosa, monitorada e realizada por pessoas capacitadas.

O melhor entendimento do metabolismo deste gênero poderá ser possível com o sequenciamento de seu genoma. Até o momento, foram sequenciados genomas do complexo *B. cepacia* e as espécies *B. glumae*, *B. glathei*, *B. gladioli* e *B. xenovorans*. Os resultados mostraram que possuem genoma complexo e muito variável. Possuem numerosas inserções e de um a quatro replicons, contrariando a literatura que afirma que todo organismo procarioto possui apenas um replicon. Outro dado interessante foi o tamanho de seu genoma, espécies muito próximas possuem de 4,7 a mais de 9 Mb. Isso possibilita adaptações em diferentes ambientes.

1.3 Patógenos em Humanos e Animais

Algumas espécies do gênero são consideradas patógenos. O patovar cocovenerans, de *B. gladioli*, produz uma flavotoxina, que causa infecção em humanos pelo consumo de farinha de trigo ou milho contaminado (ZHAO et al., 1995). Bactérias do complexo *B. cepacia* são contaminantes de cosméticos, soluções farmacêuticas (JIMENEZ, 2001, citado por COENYE et al., 2003) e causam infecções em seres humanos, sendo os pacientes com Fibrose Cística (FC) como os mais suscetíveis.

A retenção das secreções mucosas favorece colonização e infecção respiratória por bactérias, que aparecem na seguinte ordem: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosae* e complexo *B. cepacia* (RIBEIRO et al., 2002). A colonização por bactérias do complexo *B. cepacia* ocorre em menor número de pacientes (ALVAREZ et al., 2004), porém sua presença é considerada preocupante, pois acelera a deterioração dos pulmões, podendo diminuir a sobrevivência dos pacientes em até uma década, se comparada a *P. aeruginosa* (JONES et al., 2001).

Todos os genomovares do complexo *B. cepacia* foram identificadas em culturas de pacientes, e estão em média em 3% dos casos. Em muitos casos *B. cenocepacia* e *B. multivorans* prevaleceram (COENYE et al., 2003). No Brasil, já foi detectado *B. cepacia*, *B. fungorum* e a estirpe padrão TVV75 de *B. vietnamiensis* foi encontrada sozinha em paciente em estado terminal de FC (Elizabeth de Andrade Marques/UERJ-RJ, comunicação pessoal).

B. mallei e *B. pseudomallei* são patógenos de seres humanos e animais. *B. mallei* causa mormo, que provoca inflamação das glândulas. Foi observada em cavalos, cabras, macacos e pode ser transmitida ao homem pelo contato direto. Melioidosis é uma doença infecciosa, causada por *B. pseudomallei*. Esta bactéria é encontrada no solo e em águas geralmente paradas, atingem humanos e animais com maior ocorrência em algumas regiões da Ásia e Oceania, porém um caso de morte provocada por esta bactéria foi relatado no estado do Ceará (MIRALLES et al., 2004).

Benefícios ecológicos e econômicos pelo uso de *Burkholderia* são inúmeros. Apesar de seu potencial, o impacto provocado pela presença de estirpes de bactérias do complexo *B. cepacia* em pacientes com Fibrose Cística tem levado a um rigoroso sistema de segurança. Como resultado, muitas estirpes com potencial para biocontrole, que já tinham sido aprovados pelo “United States Environmental Protection Agency”, teve sua avaliação de risco modificada e seu uso restrito. No site desta agência na internet, está escrito que “o conhecimento atual de taxonomia e genética não permitem afirmar que isolados usados em controle biológico não causariam doença em pacientes com Fibrose Cística”.

1.4 Patógenos em Plantas

Apenas cinco espécies são relatadas como patógenas de plantas. *B. cepacia* foi descrita como causadora de apodrecimento da casca de cebola nos Estados Unidos (BURKHOLDER, 1950, COENYE & VANDAMME, 2003). *B. caryophylli* é um patógeno em cravo e alho. *B. plantarii* e *B. glumae* são patógenos de arroz. Este último também causa apodrecimento de tubérculos de batata e foi considerado, por mais de 2 décadas, a bactéria patogênica mais importante para a cultura do arroz no Japão, Coreia e Taiwan. *B. andropogonis* foi descrita como patógeno em sorgo, feijão e cravo (COENYE et al., 2003).

1.5 Promoção de Crescimento em Plantas

Bactérias promovem crescimento em plantas por vários fatores. A inoculação da estirpe SAOCV2, de *B. cepacia*, promoveu crescimento de plantas de feijão, segundo os autores, por vários mecanismos, incluindo solubilização de fosfatos, antagonismo contra *Fusarium* e indiretamente pelo aumento da nodulação (PEIX et al., 2001).

B. vietnamiensis quando inoculada em plantas de arroz em experimento de campo e casa de vegetação no Vietnã, aumentaram de 13 a 22% a produção de grãos (TRAN VAN et al., 2000), ainda assim, as plantas inoculadas floresceram mais cedo do que as não inoculadas.

No Brasil, várias plantas foram beneficiadas quando inoculadas com *Burkholderia*. A inoculação da espécie proposta *B. brasilensis* em plantas de arroz cultivadas em condições gnotobióticas, contribuiu com 31% do total de nitrogênio da planta, tendo aumentado 69% da biomassa das plantas (BALDANI et al., 2000). A cultivar de arroz IAC4440, teve sua produção de grãos aumentada em torno de 50% quando inoculada com a estirpe M209 e o acúmulo de N nos grãos, aumentado em 90% (GUIMARÃES, 2001).

Contribuições também foram observadas com a inoculação da espécie proposta *B. brasilensis* na cultura da mandioca. A inoculação desta espécie juntamente com fungos micorrízicos arbusculares, promoveu aumento da parte aérea e raízes em 50 e 105%, respectivamente, em relação à inoculação do fungo isoladamente, e também se destacou em relação a outras espécies de bactérias diazotróficas inoculadas (BALOTA et al., 1997). Em plantas de abacaxi, a inoculação de isolados de *B. cepacia*, reduziu o tempo de aclimação das plantas micropropagadas e contribuiu com incremento de matéria seca de raízes e parte aérea (WEBER et al., 2003) e contribuição também foi observada com inoculação de *Burkholderia* spp. em plantas de bananeiras (WEBER et al., 2000).

O etileno é um importante hormônio para o crescimento e desenvolvimento de plantas. Porém, estresses como alta concentração de metais pesados, aumentam a concentração de etileno endógeno, resultando em inibição da germinação de semente e crescimento radicular (JACKSON, 1991). A enzima 1- aminociclopropano-1-carboxilase (ACC) de aminase, comumente encontrada em bactérias, apresenta capacidade de promover crescimento em plantas por hidrolizar o precursor imediato de etileno. Esta enzima foi encontrada, apresentando alta atividade, na espécie descrita recentemente, *B. phytofirmans*. E plantas inoculadas com *B. phytofirmans* mostraram maior desenvolvimento do sistema radicular (NOWAK, 1998).

Um grande número de espécies do gênero *Burkholderia* foram identificadas como agentes de controle de patógenos de inúmeras culturas. Podendo inibir o crescimento de muitos fungos, como *Phythium aphanidermatum*, *Phythium ultimum*, *Fusarium* sp., *Phytophthora capsici* e *Rhizoctonia solani* (CAIN et al., 2000; HEBBAR et al., 1998; HEYDARI & MISAGHI, 1998; LI et al., 2002), e uma estirpe identificada como *Burkholderia* spp., foi capaz de inibir o crescimento de bactérias, leveduras e protozoários (CAIN et al., 2000).

Em muitos casos, o mecanismo envolvido na supressão da doença não é conhecido, mas provavelmente controlam populações patogênicas pela produção de sideróforos, verificado em *B. cepacia* e *B. vietnamiensis* (MEYER et al., 1995) e compostos antibióticos como Phenazine e Pyrrolnitrin, produzidos por *B. phenazinium*, *B. pyrrocinia*, *B. ambifaria*, *B. vietnamiensis* e *B. cepacia*-NB-1 (EL BANNA & WINKELMANN, 1998; TRAN VAN et al., 2000).

Espécies de *Burkholderia* já foram usadas para biorremediação. Muitas estirpes, todas identificadas como *B. cepacia*, mostraram capacidade em degradar compostos xenobióticos. A estirpe LB400, da nova espécie descrita *B. xenovorans*, mostrou capacidade de degradar “cianide e polychlorinated biphenyls”. E o herbicida 2,4-D teve sua concentração muito diminuída quando aplicado em solo com dominância do gênero *Burkholderia* na população

microbiana (TIEDJE et al., 1999). Também a espécie *B. singaporensis* foi isolada e usada para biorremediação de praias contaminadas com óleo (WANG et al., 2006).

1.6 Espécies Diazotróficas em Leguminosas

Até recentemente, sabia-se que leguminosas eram noduladas exclusivamente por membros da sub classe α -proteobactérias, família *Rhizobiaceae*, gêneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (VAN BERKUM & EARDLY, 1998). Nos últimos anos, entretanto, outras α -proteobactérias foram mostradas como nodulantes de leguminosas (MOULIN et al., 2002) incluindo estirpes de *Methylobacterium* (SY et al., 2001); *Devosia* (RIVAS et al., 2002) e *Ralstonia taiwanensis*, reclassificada para *Cupriavidus taiwanensis* (VANDAMME & COENYE, 2004) em *Mimosas* de diferentes regiões de Taiwan (CHEN et al., 2001, 2003a) e Índia (VERMA et al., 2004).

Em 2001, bactérias isoladas de nódulos de *Aspalathus carnosa*, da África do Sul e *Machaerium lunatum*, da Guiana Francesa, foram caracterizadas como pertencentes ao gênero *Burkholderia* (MOULIN et al., 2001). Foi o primeiro relato de β -proteobactérias, do gênero *Burkholderia*, presentes em nódulos de leguminosas. Estes autores sugeriram o uso dos termos α -rizóbio e β -rizóbio, para distinguir as proteobactérias nodulantes de leguminosas. Em trabalho de caracterização (VANDAMME et al., 2002a) os isolados acima foram descritos como novas espécies, STM815 isolado de *Machaerium lunatum* e STM678 de *Aspalathus carnosa*, foram descritas como *Burkholderia phymatum* e *B. tuberum*, respectivamente. Neste mesmo trabalho, mais três isolados foram caracterizados. Um isolado de *Alysicarpus glumaceus*, do Senegal, foi identificado como *B. dolosa* e dois isolados de *Mimosa pudica* e *M. diplotricha*, pertencem à espécie *B. caribensis*.

Novos isolados de *Burkholderia* foram obtidos em leguminosas de diferentes partes do mundo. Bactérias diazotróficas da espécie *B. caribensis*, foram novamente isoladas de *M. pudica* e *M. diplotricha* em Taiwan (CHEN et al., 2003b). No Brasil, 14 isolados de inúmeras espécies de *Mimosa* spp. foram obtidos a mais de 20 anos (CHEN et al., 2005a). Este último trabalho relatou mais seis isolados de *M. pigra* (sinônimo de *M. pellita*) da Venezuela, que juntamente com alguns isolados obtidos no Brasil, foram propostos como *B. mimosarum* (CHEN et al., 2006). Das leguminosas *M. pigra*, *M. casta*, *M. pudica*, *Abarema macradenia* e *Pithecellobium hymenaeafolium*, na Ilha de Barro Colorado, Panamá, 44 isolados dos 55 obtidos, pertenceram ao gênero *Burkholderia*. A sequência do gene 16 e 23S rDNA, mostrou similaridade dos isolados com *B. tuberum* e *B. fungorum* (BARRET & PARKER, 2005).

O predomínio do gênero *Burkholderia* em nódulos foi novamente observado, desta vez em *M. pigra*, em Taiwan. Dos 191 isolados, 96% eram *Burkholderia* (CHEN et al., 2005b) e este trabalho confirmou a capacidade de nodulação do gênero *Burkholderia*, pelo uso de proteína fluorescente e microscopia eletrônica.

1.7 Espécies Diazotróficas em Plantas Não Leguminosas

No mesmo período em que o gênero *Burkholderia* foi criado, um isolamento de bactérias diazotróficas em plantas de arroz irrigado, cultivado em experimento com solo de Itaperuna-RJ, foram obtidos 24 isolados com características distintas dos demais em meio de cultura semi-sólido sem nitrogênio NFb COG (NFb mais citrato, oxalato e glicose). Mais 3 isolados semelhantes aos anteriores foram obtidos de plantas de arroz irrigado da região de Pindamonhangaba-SP. Testes com fontes de carbono diferenciaram este grupo dos demais gêneros e espécies isolados e foram chamados de Bactéria E (OLIVEIRA, 1992).

Outras bactérias com características desse grupo também foram isoladas de plantas de mandioca, cultivadas em Santa Cruz e Itaguaí-RJ (BALOTA, 1994) e mais tarde, com o

desenvolvimento do meio de cultura JMV, 37 isolados foram obtidos de raízes, colmos e folhas de arroz, 10 em associação com cana-de-açúcar e seis com batata doce (BALDANI, 1996). Testes bioquímicos e moleculares foram usados para caracterizar e identificar os isolados. O uso de sondas para a região 23S rDNA, permitiu agrupar os isolados na subdivisão β das proteobactérias, e o sequenciamento parcial da região 16S rDNA indicou que os isolados pertenciam ao gênero *Burkholderia*. Este grande grupo foi proposto como uma nova espécie de nome *B. brasilensis*. Porém mais tarde, a estirpe padrão desta espécie apresentou mesmo perfil de corte com enzimas de restrição e 99% de similaridade da região 16S rDNA, com a estirpe padrão KP23, de *B. kururiensis* (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001), sugerindo que sejam mesma espécie.

A capacidade de alguns isolados de *B. cepacia* fixarem nitrogênio atmosférico foi relatada em 1994 (BEVIVINO et al., 1994). Porém a primeira espécie do gênero descrita como diazotrófica foi *B. vietnamiensis*, isolada de solos cultivados com arroz no Vietnã (GILLIS et al., 1995). Esta espécie mais tarde foi isolada da rizosfera, rizoplano e tecidos internos de raízes de milho, café e sorgo, cultivados em diferentes regiões do México (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001).

Neste trabalho, a maioria dos isolados identificados como gênero *Burkholderia* não pertenceram a nenhuma espécie descrita. Estes resultados, segundo os autores, mostraram que o gênero *Burkholderia* é rico em bactérias diazotróficas e que essa capacidade é desconhecida porque não é rotineiramente avaliada quando uma nova espécie é descrita. Alguns isolados do trabalho acima, e um novo isolamento, levou a descrição da nova espécie diazotrófica. *B. unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004), descrita com 20 isolados obtidos de rizosfera e rizoplano de café e milho, raízes e colmos de milho e rizosfera, raízes e colmos de cana-de-açúcar de diferentes lugares do México.

B. tropica (REIS et al., 2004) e *B. xenovorans* (GORIS et al., 2004) foram as últimas espécies diazotróficas descritas. A primeira foi isolada de plantas de cana-de-açúcar no Brasil e África do Sul, solo nos EUA e rizosfera, rizoplano e raízes de milho no México. *B. xenovorans* foi descrita com apenas três isolados. A estirpe padrão, LB400, foi isolada de solo contaminado com policlorinato bifenil (PCB) nos EUA e os isolados CCUG 28445 e CAC-124, de sangue humano na Suécia e café no México, respectivamente.

Inúmeros isolados diazotróficos de *Burkholderia* foram obtidos em associação com plantas. Em associação com bananeiras e abacaxizeiros no estado do RJ e BA, foram obtidos inúmeros isolados, alguns foram identificados como *B. brasilensis* e *B. tropica*, e a maioria não foram identificados (WEBER et al., 1999; CRUZ et al., 2001). *B. vietnamiensis* e *B. kururiensis*, foram isoladas das cultivares de arroz inundado IR42, IAC4440 (RODRIGUES, et al., 2006), e destas mais a cultivar CNA 7553 (BRASIL, 2005). *B. tropica*, *B. kururiensis*, *B. gladioli*, *B. thailandensis* e *B. caribensis* foram isoladas de amostras de cultivares de cana-de-açúcar brasileiras e australianas (BODDEY, 2002).

Estes resultados mostram que bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* são comuns e abundantes em inúmeras plantas, possuem inúmeros potenciais biotecnológicos e o conhecimento de sua ecologia é importante para melhor exploração e manejo do sistema. Portanto, o objetivo deste capítulo foi identificar e caracterizar um grupo de isolados diazotróficos do gênero *Burkholderia*, obtidos de cana-de-açúcar, milho e abacaxi.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento em Plantas de Milho

Para verificar a ocorrência do novo do grupo de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em outras plantas, foram coletadas amostras de plantas de milho, cultivadas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia em solo Latossolo Vermelho Amarelo, série Itaguaí. Foram avaliadas quatro plantas de milho tipo doce da variedade Aventis A2345, duas na fase reprodutiva e duas na fase germinativa. As plantas foram fertilizadas com esterco bovino no momento da semeadura e 15 dias depois com esterco de aves.

A contagem e o isolamento seguiram metodologia descrita no capítulo 1 e os isolados foram também caracterizados como descrito no capítulo 1.

2.2 Hibridização DNA : DNA

O trabalho foi desenvolvido pela equipe do Dr. Jesus Caballero-Mellado, no Centro de Ciências Genômicas, da Universidade Nacional Autônoma do México (UNAM), em Cuernavaca, estado de Morelos, México, seguindo a técnica de Southern Blot, como descrito por ESTRADA DE LOS SANTOS et al., (2001). Foi usado como sonda o isolado BR11911, marcado com ^{32}P , pareado contra mais oito isolados do mesmo grupo e espécies próximas.

Inicialmente, o DNA das amostras foi digerido com a enzima de restrição de corte frequente, *EcoRI* e separado em gel de agarose 1,2%, submetido a 20 volts por 24 horas em tampão TAE 1 X. Em seguida, o DNA foi depurinizado, pela lavagem do gel por 2 vezes em solução de HCl 0,25 N por 15 min., desnaturado pela lavagem em solução de NaOH 0,5 N + NaCl 1,5 M por 45 min. e neutralizado em SSC 20 X (anexo) por 10 minutos. O processo de transferência do DNA do gel ocorreu por capilaridade, com a imersão em solução de SSC 10 X, aderido a uma membrana de náilon, sobre um peso de aproximadamente 1 kg por 12 a 14 horas. Após a transferência do DNA, a membrana secou em temperatura ambiente por duas horas. Depois de seca, a membrana foi tratada com a sonda marcada e o processo de hibridização ocorreu por 12 horas a 65 °C e a membrana foi lavada uma vez com SSC 2 X a temperatura ambiente por 10 min., uma vez em SSC 1 X a 55 °C por 5 min. e uma vez em SSC 0,1 X a 65 °C por 5 min. Encerrada as lavagens, a membrana foi acondicionada em cassette para exposição de filmes raios-X e colocado filme sobre a membrana em sala escura. Após exposição, a membrana foi revelada e calculada a porcentagem de homologia do isolado BR11911 com o restante de isolados e estirpes testadas, através da intensidade de luz emitida pelas amostras.

2.3 Temperatura e pH Ideal de Crescimento

Foram testados os isolados BR11911, BR12116 e BR11563 e os controles BR11366, padrão de *B. tropica*, BR11340, da espécie proposta *B. brasilensis*, e ATCC25416, padrão do genômico I de *B. cepacia*. Uma colônia característica de cada isolado, foi inoculada em tubo de ensaio contendo cinco ml de meio de cultura líquido Dyg's, permanecendo sob agitação constante de 150 rpm por 18 e a 30 °C. A concentração de células foi ajustada para 1,0, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 436 nm. Uma alíquota de 20 µl da suspensão foi inoculada em frascos contendo cinco ml de meio de cultura semi- sólido BSE (anexo) (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001), com 3 repetições e incubados no escuro nas

temperaturas 7, 20, 25, 30, 35 e 40 °C. O crescimento dos isolados foi observado diariamente, até 10 dias após a inoculação.

Para determinação do pH ideal de crescimento, foram inoculados 20 µl de suspensão bacteriana em frascos contendo cinco ml de meio de cultura semi-sólido BSE, com 3 repetições e ajustado pH final para os seguintes valores: 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 e 7,0. Os frascos foram incubados no escuro a 30 °C e o crescimento dos isolados foi observado diariamente, até 10 dias após a inoculação.

2.4 Tamanho e Forma da Célula

Esta etapa também foi desenvolvida pela equipe do Dr. Jesus Caballero-Mellado, no México. A estirpe BR11911 foi cultivada em placa com meio de cultura BAZ (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001) por 3 dias a 29 °C. Com uma ponteira, foi retirado um fragmento de uma colônia e misturada a 50 µl de tampão fosfato. Desta suspensão, foi colocada uma pequena gota em grade e deixado sedimentar as bactérias por 15 a 30 s. Foi retirado o excesso de tampão e contrastada com ácido fosfotungstênico 0,05% durante um min. e se procedeu a observação ao microscópio eletrônico de transmissão.

2.5 Observação de Cápsulas

A presença de cápsulas foi verificada no isolado BR11911, usando como controle positivo a estirpe BR11340 da espécie proposta *B. brasiliensis* e como controle negativo a estirpe BR11366, padrão de *B. tropica*. As bactérias foram cultivadas como descrito no item 2.3 e uma alçada foi usada para fazer um esfregaço sob uma lâmina. Sobre o esfregaço foi adicionada uma gota de tinta nanquim preta e visualizado ao microscópio de contraste de fase (YANO et al., 1991).

A presença de cápsulas foi detectada através de um halo branco ao redor das células, devido a não coloração dos polissacarídeos.

2.6 Oxidação de Fontes de Carbono

O padrão de oxidação de fontes de carbono da estirpe padrão BR11911, da espécie proposta foi comparado com 8 espécies de *Burkholderia* já descritas, avaliado pelo kit BIOLOG, como descrito no item 2.3, do capítulo 1.

2.7 Produção de Hormônio de Crescimento (AIA – ácido indol acético)

AIA é um hormônio de crescimento que pode ser produzido por alguns microrganismos, que vivendo no interior das plantas, podem contribuir no crescimento do vegetal. Devido a importância da produção de hormônios por bactérias diazotróficas, foi avaliado a capacidade de produção de AIA pelos isolados BR11911, BR12116, BR11563, BR11922 e BR11915 da espécie proposta e as estirpes padrões BR11366 de *B. tropica*, BR11340 de *B. brasiliensis*, KP23 de *B. kururiensis* e MTI641 de *B. unamae*. Como controle positivo foram usados os padrões TVV75 de *B. vietnamiensis*, BR11281 (PAL5), de *G. diazotrophicus* e ATCC29729 (Cd) de *A. brasilense*. Foi usada a metodologia descrita por SARWAR & KREMER (1995).

As bactérias cultivadas inicialmente como descrito no item 2.3 e 20 µl do inóculo foi inoculado em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio de cultura líquido LGI, para *G. diazotrophicus*, NFb para *A. brasiliensis* e JMV, para os isolados do gênero *Burkholderia*. Nestes meios de cultura foi adicionado KNO₃ e suprimido o corante azul de bromotinol para

não interferir na leitura de proteínas totais. Foram testados os tratamentos sem adição de triptofano, com 100 µg/ml e 200 µg/ml de triptofano, com 3 repetições de cada bactéria. Os tubos contendo meio de cultura e inoculados com bactérias e diferentes doses de triptofano, foram incubados no escuro por 72 h a 30 °C, sob agitação constante de 150 rpm.

Após o período de incubação, foi quantificada a produção de hormônios. Uma alíquota de um ml foi centrifugada por cinco minutos a 520 x g, e 150 µl do material em suspensão foi aplicado em poços contidos em placa de poliestireno com capacidade para 300 µl, com 3 repetições. Sobre as amostras, foi adicionado 100 µl do reagente de Salkowisk (1 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 M em 50 ml de HClO_4 a 35%), e as placas permaneceram no escuro por 30 minutos. A presença de hormônio foi visualizada pela coloração rósea e quantificada por leitura de absorbância em espectrofotômetro com filtro de 492 nm. A estimativa da produção de AIA foi determinada por uma curva padrão utilizando o produto comercial AIA nas concentrações: 0, 25, 50, 100, 150, 200 e 250 µM.

As amostras usadas para determinação de hormônios foram usadas para quantificação de proteínas totais, como descrito no item 2.5.2 do capítulo 1, e os resultados foram dados em µM de AIA por mg de proteínas totais.

2.8 Avaliação da Capacidade de Solubilização de Fosfatos

A capacidade de solubilização de fosfato insolúvel foi testada em meio de cultura GL sólido (anexo) (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982). Depois de esterilizado, e com temperatura em torno de 50° C, foi adicionado ao meio 50 ml de K_2HPO_4 (10%) e 100 ml de CaCl_2 (10%), para formação de precipitado insolúvel de CaHPO_4 , e o meio de cultura distribuído em placas de Petri.

Foram testados os isolados BR11911, BR12116, BR11563, BR11922 e BR11915 da espécie proposta e as estirpes padrões BR11366 de *B. tropica*, BR11340 de *B. brasiliensis*, KP23 de *B. kururiensis*, TVV75 de *B. vietnamiensis*, MTI641 de *B. unamae* e BR11281 e isolado BSF55, de *Bacillus megaterium*, como controle positivo (SOUCHIE, 2004). As bactérias foram crescidas como descrito no item 2.3 e uma alíquota de 20 µl foi inoculada na superfície da placa de Petri, formando um ponto. Para cada bactéria testada, foram inoculados três pontos de aplicação da cultura em cada placa de Petri com 3 repetições cada placa, e foram incubadas por cinco dias a 30 °C no escuro. Após o período de incubação, foi avaliada visualmente a formação de halo transparente no meio de cultura originalmente opaco, indicando a capacidade de solubilização de fosfato adicionado ao meio de cultura.

2.9 AFLP (Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos Amplificados)

A técnica de AFLP (Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos Amplificados) (VOS et al., 1995) foi usada neste trabalho para auxiliar na descrição da espécie proposta *Burkholderia silvatlantica*, bem como avaliar a diversidade de seus isolados. A técnica consiste no desenvolvimento de inúmeras etapas, descritas abaixo:

2.9.1 Digestão com enzimas de restrição e ligação dos adaptadores

O DNA das amostras, obtido como descrito no item 2.4 do capítulo 1, foi digerido com enzimas de restrição e ligado aos adaptadores seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante: AFLP – Core Reagent Kit (Invitrogen). Em tubo com capacidade para 1,5 ml, foi colocado 500 ng de amostra de DNA, mais 5 µl de tampão 5 X, 2 µl das enzimas *EcoRI* / *MseI* e água destilada para completar volume de 25 µl. Esta mistura foi agitada, centrifugada rapidamente e incubada por 2 h a 37 °C. Em seguida, as amostras permaneceram 15 min. a 70

°C para inativação das endonucleases, e imediatamente postas no gelo. A esta mistura foram adicionados 24 µl de solução de ligação aos adaptadores e 1 µl de T4 DNA ligase, o tubo foi agitado gentilmente e incubado a 20 °C por 2 h e estocados a – 20 °C.

2.9.2 Reação de pré-amplificação

Após a ligação dos adaptadores, as amostras foram amplificadas usando iniciadores com um ou nenhum nucleotídeo adicional na sua extremidade 3'. Foram testadas as combinações de iniciadores *MseI* + G e *EcoRI* + A, *MseI* + AG e *EcoRI* + 0 e *MseI* + 0 e *EcoRI* + 0. Para reação de 50 µl foi adicionado: 10% do volume final, de tampão de PCR 10 X; 2 mmol de MgCl₂; 0,5 mmol de dNTP; 0,1 µmol de cada iniciador, 1 unidade da enzima Taq polimerase; 5 µl das amostras ligadas com adaptadores, (diluídas 10 vezes) e água ultra pura para completar o volume final de 50 µl. O material preparado foi acomodado em termociclador programado para 27 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min. a 60 °C e 1 min. a 72 °C.

O material amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,2% em TAE 1 X, a 65 volts por 1 hora e 30 min., e visualizados após corado com brometo de etídeo (5 µg/ml), sob luz ultravioleta.

2.9.3 Reação de amplificação seletiva

Nesta etapa, foram usados iniciadores com um nucleotídeo adicional na sua extremidade 3', assim, apenas os fragmentos que possuem nucleotídeos complementares aos nucleotídeos seletivos serão amplificados, diminuindo o número de fragmentos gerados. As amostras pré-amplificadas com os iniciadores *EcoRI* + 0 e *MseI* + 0, foram amplificadas com os iniciadores *EcoRI* + A e *MseI* + C. As reações procederam com a mistura de 10% do volume final da reação, de tampão de PCR 10 X; 2 mmol de MgCl₂; 0,05 mmol de dNTP; 1 mmol de cada iniciador marcado com radioisótopo [³²P] ATP; 2 unidades de Taq DNA polimerase, 5 µl da pré amplificação diluída 5 vezes e volume final completado para 25 µl.

As amostras foram acomodadas em termociclador programado para 94 °C por 1 min., um ciclo de 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s e 72 °C por 30 s, repetido por 9 vezes com diminuição de 0,7 °C da temperatura de anelamento (65 °C) por ciclo. O último ciclo, onde a temperatura de anelamento atingiu 56 °C, foi repetido mais 22 vezes. Após o término da reação, as amostras migraram em gel de poliacrilamida.

2.9.4 Marcação radioativa dos iniciadores específicos

Neste trabalho foram usados iniciadores marcados com o radioisótopo [³²P] ATP. A marcação foi feita nos iniciadores das enzimas de corte raro, neste caso *EcoRI*, contendo 10% do volume da reação de tampão para a enzima, 0,2 unidade da enzima polinucleotídeo kinase, 10 ng do iniciador e 600 ci/mmol do radioisótopo [³²P] ATP. A reação foi incubada a 37 °C por 1 hora, seguido de 10 min. a 80 °C para inativação da enzima.

2.9.5 Confeção do gel

As amostras migraram em gel vertical de poliacrilamida, em placas com 40 cm de comprimento e 30 cm de largura. O preparo das placas iniciou com 3 lavagens com bucha e detergentealconox 10% em água de torneira, seguido de 3 enxágües com água destilada estéril e postas para secar ao ambiente. Quando secas, foi passado etanol com papel macio, por 3 vezes em ambas as placas, finalizando com aplicação de um ml de repelente de água para vidros, marca Proauto, muito bem distribuído, sobre as duas placas. As placas foram

colocadas uma sobre a outra, separadas por espaçadores de 1 mm de espessura e vedadas com fita para demarcação de solo, marca Adelbras, ou fita tipo “silver tape”, marca Adelbras. Acomodadas em aparato desenvolvido para auxiliar na vedação das extremidades e melhor firmeza do pente.

O gel foi preparado pela mistura, de 100 ml de solução para gel (anexo), 500 µl de Persulfato de amônio 10% e 100 µl de TEMED (N, N, N', N' – tetra metiletilenodiamina), misturados nesta ordem. A solução foi aplicada com o auxílio de uma seringa e aguardada 1 hora para polimerização.

2.9.6 Migração das amostras

O preparo das amostras para aplicação no gel, consistiu na adição de 25 µl de corante (anexo) à reação de PCR seletiva, seguido de desnaturação por 5 min. a 95 °C e acomodação imediata no gelo.

Após polimerização do gel, as placas foram acomodadas em cuba para eletroforese, submersas em tampão TBE 1 X (Anexo) a 50° C e submetidas a 1568 volts, 60 amperes e 100 wats por 30 min. para pré- corrida. Após a pré corrida, foi aplicado 10 µl de cada amostra nos poços do gel, que migraram por uma hora e 30 min. sob as mesmas condições.

Ao término da migração das amostras, o gel foi transferido para um papel de filtro e acomodado em uma secadora de gel (Bio Rad), por 2 h a 80 °C. O papel, com o gel aderido, foi acomodado em cassete e exposto a um filme de raio X a – 80 °C por 2 dias. O filme de raio X foi revelado pela imersão por 20 segundos em solução reveladora Kodak D 79 (anexo), lavagem em água, seguido de 20 segundos em solução fixadora para filme e papel preto e branco.

2.9.7 Avaliação dos resultados

Os dados foram comparados e a semelhança entre isolados e padrões, foi estimada pelo coeficiente de similaridade SM, (ROHLF, 1994), agrupados pelo método das médias das distâncias médias UPGMA (Unweighted Pair Group Method) (SNEATH & SOKAL, 1973), e representados graficamente por um dendrograma construído pelo programa GelComparII.

2.10 Capacidade de Nodulação e Promoção de Crescimento

Foi avaliada a capacidade de nodulação e promoção de crescimento em plantas de feijão variedade Carioca, siratro (*Macroptilium atropurpureum*), *M. pellita* e *M. pudica*, por isolados de diferentes espécies do gênero *Burkholderia*.

2.10.1 Isolados bacterianos testados

Foram testados os isolados BR11911, BR12116 e BR11563 da espécie proposta *B. silvatlantica* e estirpes padrões das espécies diazotróficas em associação com gramíneas. Como controle positivo para o experimento com feijão, foi usada a estirpe recomendada BR322 (*Rhizobium tropici*), para siratro foi usada a estirpe recomendada BR1010 (*Bradyrhizobium* spp.), para *M. pellita* foi usada a estirpe BR3467 (*B. mimosarum*) e para *M. pudica*, estirpe BR3437 (*Burkholderia* spp.).

2.10.2 Preparo dos inóculos

Uma colônia de cada isolado foi inoculada em frascos com capacidade para 125 ml, contendo 50 ml de meio de cultura líquido 79 (anexo) (FRED E WARSMAN, 1928), pH 6,5, acrescido de 0,1% de agar. Os frascos foram incubados por 48 h a 30 °C, sob agitação constante de 150 rpm.

2.10.3 Preparo das sementes

As sementes de siratro, *M. pellita* e *M. pudica* sofreram processo de escarificação, permanecendo 10 minutos em ácido sulfúrico, seguido de 10 lavagens abundantes com água destilada estéril. Posteriormente, as sementes de feijão, siratro, *M. pellita* e *M. pudica* foram desinfestadas superficialmente, permanecendo 30 segundos em álcool 96%, 3 min. em peróxido de hidrogênio, seguido de 10 lavagens abundantes em água destilada estéril.

2.10.4 Montagem e condução dos experimentos

Os experimentos foram montados em casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia em vasos de Leonard (VINCENT, 1970), contendo areia e vermiculita, esterilizados 3 vezes em autoclave a 120 °C, por 1 hora. O delineamento experimental usado foi o inteiramente casualizado com 3 repetições, e cada repetição composta de 2 plantas por vaso.

Cada vaso recebeu 4 sementes inoculadas com 1 ml de cultura líquida aplicada diretamente sobre a semente, que foram recobertas com uma fina camada de areia lavada esterilizada e seca para evitar a contaminação. O desbaste foi realizado aos 7 dias após emergência (DAE), permanecendo apenas 2 plântulas por vaso e novamente recobriu-se os vasos com uma camada de 2 a 3 cm de areia lavada estéril. Após queda dos cotilédones, os vasos foram mantidos com solução nutritiva de Norris para vasos de Leonard (anexo) (NORRIS & T'MANNETJE, 1964). Como controle negativo foi usado um tratamento sem inoculação de bactérias e como controle nitrogenado um tratamento recebeu semanalmente 20 mg de nitrogênio por planta na forma de NH_4NO_3 .

As plantas de feijão foram coletadas aos 26 dias após emergência, siratro aos 40 dias e *Mimosa pellita* e *M. pudica*, 2 meses após emergência.

2.10.5 Parâmetros analisados

Os parâmetros analisados foram: matéria seca da parte aérea e raízes, número e peso seco de nódulos. A matéria seca das plantas foi determinada através da secagem das amostras em uma estufa de circulação forçada, com temperatura constante de 65 °C por um período de 4 dias.

Os procedimentos estatísticos constaram de análise de variância e teste F. Nas variáveis cujo teste F foi significativo, aplicou-se o teste de LSD a 5% de probabilidade, para a comparação das médias, com o auxílio do programa SAEG.

2.11 Cultivo em Meio de Cultura Semi-sólido

Foi avaliada a capacidade de crescimento e FBN em diferentes meios de cultura semi-sólidos, por isolados da espécie proposta, estirpes padrões de espécies nodulantes e não nodulantes do gênero *Burkholderia* e estirpes dos gêneros *Rhizobium* e *Sinorhizobium*.

Os isolados foram crescidos em meio de cultura líquida Dyg's, como descrito no item 2.3. Uma alíquota de 20 µl da suspensão bacteriana foi inoculado em frascos contendo 5 ml de meio de cultura semi-sólido, com 3 repetições, e incubados no escuro a 30 °C por 10 dias.

Foram utilizados os meios de cultura semi-sólidos BMGM (anexo) (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001), 79 (anexo) (FRED E WARSMAN, 1928), LGI (anexo) (DOBEREINER et al., 1995), LGI-P (anexo) (DÖBEREINER et al., 1995) e JMV (anexo) sem extrato de levedura e com 20 mg de extrato de levedura por litro de meio de cultura (BALDANI, 1996). A atividade da nitrogenase foi determinada pela técnica de ARA (BODDEY et al., 1990) nos isolados que cresceram nos meios de culturas semi-sólidos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento em Plantas de Milho

A contagem do número de células de bactérias por grama de peso fresco de amostras de milho, coletado no campo experimental da Embrapa Agrobiologia, variou de não detectado a 7×10^4 . Semelhante ao observado em amostras de cana-de-açúcar, a população foi maior nas amostras de raízes e rizosfera e em meio de cultura JMV (Tabela 6).

Tabela 5: Número de células de bactérias diazotróficas por grama de peso fresco de amostras ($\times 10^4$) associadas ao milho híbrido Aventis A2345, cultivado em Seropédica-RJ.

Fase da planta	Amostra	Meio de cultura	
		LGI	JMV
Vegetativa	Colmo	ND ¹	1,5
	Raízes	0,15	14
	Rizosfera	0,45	1,5
Reprodutiva	Colmo	ND ¹	0,45
	Raízes	0,15	0,4
	Rizosfera	0,2	7

1: ND, não detectado pelo método

Seguindo a metodologia para isolamento sugerida no capítulo capítulo I desta tese, foram obtidos 11 isolados, 3 em meio de cultura LGI e 8 em JMV, todos da rizosfera e a maioria de plantas na fase reprodutiva (Tabela 6). A eficácia desta estratégia foi comprovada em isolamento de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* de plantas de milho, onde se optou por repicagens sucessivas em meio de cultura semi-sólido antes da seleção de colônias em placas e não houve adição de extrato de levedura. Neste caso, de 21 isolados, apenas 3 eram *Burkholderia* (CRUZ et al., 2005).

Todos os isolados pertenceram ao gênero *Burkholderia*. Apresentaram uma banda com tamanho esperado, verificado pelo uso da técnica de PCR com iniciadores específicos. Suas colônias eram pequenas, amarelas, com elevação convexa e consistência gomosa, que após 10 dias de incubação alteraram a elevação para puntiforme. Possuem capacidade de fixar nitrogênio atmosférico pela técnica de ARA e apresentaram o gene *nifH*. A restrição da região 16S rDNA mostrou que quatro isolados apresentaram mesmo padrão de restrição (grupo 1) e sete deles diferiram apenas na enzima *AluI* (grupo 1a) (Tabela 6). Estes isolados são semelhantes ao grande grupo de isolados obtidos de cana-de-açúcar, apresentados no capítulo 1 desta tese, e provavelmente pertencem a uma nova espécie.

O isolamento de *Burkholderia* em milho é bastante comum. Um estudo conduzido na França mostrou que *B. cepacia* é abundante em plantas de milho (HEBBAR et al., 1998). Também na França foi detectado *B. graminis* (VIALARD et al., 1998) e *B. cenocepacia* (BALANDREAU et al., 2001) e na Itália foi relatada a ocorrência de *B. cepacia* (DALMASTRI et al., 1999; FIORE et al., 2001). Isolados diazotróficos também foram encontrados em plantas de milho, como *B. cepacia* (BEVIVINO et al., 1994; ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2002), *B. vietnamiensis* (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001), *B. unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004) e *B. tropica* (REIS et al., 2004). Porém, neste isolamento, nenhum isolado pertence às espécies citadas.

Neste estudo, os isolados diferiram dos padrões analisados e foram semelhantes entre si. Apesar de poucas plantas e apenas uma cultivar analisada, estes dados corroboram com os resultados obtidos por RAMETTE et al. (2005). Onde num isolamento de bactérias do complexo *B. cepacia* da rizosfera de milho, mostraram que cada planta continha alta densidade de bactérias e era colonizada por uma espécie dominante e em menor número, foram encontradas outras espécies ou variantes.

Tabela 6: Dados ecológicos e padrão de restrição da região 16S rDNA dos isolados diazotróficos do gênero *Burkholderia* spp. obtidos da rizosfera de plantas de milho, híbrido Aventis A2345, coletado em Seropédica-RJ, comparando com padrões do gênero.

Espécies	Isolado	Meio de cultura	Fase da planta	Padrão de restrição	Grupo
<i>Burkholderia</i> spp.	BR11905	LGI	Vegetativa	dkagc	1a
	BR11906	LGI	Reprodutiva	dkagc	1a
	BR11907	LGI	Reprodutiva	dkagc	1a
	BR11908	JMV	Vegetativa	dkagc	1a
	BR11909	JMV	Vegetativa	fkagc	1
	BR11910	JMV	Vegetativa	dkagc	1a
	BR11911	JMV	Reprodutiva	fkagc	1
	BR11912	JMV	Reprodutiva	fkagc	1
	BR11913	JMV	Reprodutiva	dkagc	1a
	BR11914	JMV	Reprodutiva	fkagc	1
	BR11915	JMV	Reprodutiva	dkagc	1 ^a
<i>B. tropica</i>	BR11366			dghga	2
<i>B. brasiliensis</i>	BR11340			laaai	3
<i>B. vietnamiensis</i>	TVV75			larai	4
<i>B. kururiensis</i>	KP23			laaai	3
<i>B. cepacia</i>	ATCC2541			lcraa	5
<i>B. unamae</i>	MTI641			lrga	6
<i>B. unamae</i>	M2Cy-717			dgcda	7
<i>B. sacchari</i>	IPT101			fcqai	8
<i>B. phymatum</i>	STM815			fgsga	9
<i>B. tuberum</i>	STM678			ftkga	10

3.2 Hibridização DNA:DNA

A homologia DNA:DNA foi empregada para comparar o grau de relacionamento genético entre espécies, tendo papel principal na descrição de novas espécies. A hibridização foi usada neste trabalho para avaliar a semelhança do novo grupo de isolados com as espécies mais próximas, verificado pelo sequenciamento da região 16S rDNA. Quando estes dados foram obtidos, em março de 2005, este gênero possuía apenas 27 espécies, e a avaliação de similaridade das seqüências do gene 16S rDNA revelou que *B. sacchari*, seguido de *B. tropica* e *B. unamae*, eram as espécies mais próximas. Neste intervalo, nove espécies foram descritas e uma nova análise de seqüências mostrou alteração no agrupamento dos isolados. Das espécies mais próximas atualmente, *B. mimosarum*, *B. nodosa* (em processo de descrição) e *B. ferrarie* não foram usadas na técnica de hibridização, pois não estavam depositadas no banco de dados naquele momento. Vale ressaltar aqui que foram contruídos dendrogramas novos para a apresentação desta tese. Porém o artigo que descreve a espécie aqui sugerida, já foi publicado na revista oficial para descrição de novas espécies de

microrganismos, a “International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology”, volume 56 de agosto de 2006, o periódico oficial para caracterizações taxonômicas.

Observa-se, pelos resultados apresentados (Tabela 7), que os isolados testados não pertencem às espécies mais próximas, como verificado pelo sequenciamento da região 16S rDNA e também a nenhuma espécie diazotrófica já descrita, pois os valores de associação são abaixo de 70%, indicando que fazem parte de uma nova espécie (STACKEBRANDT et al., 2002; VANDAMME et al., 1996).

Tabela 7: Porcentagem de hibridização entre “*B. silvatlantica*” e espécies mais próximas pelo sequenciamento da região 16S rDNA.

Espécie	Estirpes	Hospedeiro	% hibridização
“ <i>B. silvatlantica</i> ”	BR11911 ^T	Milho	100
	BR11907	Milho	102
	BR11924	Cana-de-açúcar	99
	BR11117	Cana-de-açúcar	96
	BR11908	Milho	86
	BR11563	Abacaxi	83
	BR12204	Cana-de-açúcar	79
	BR12116	Cana-de-açúcar	78
	BR12165	Cana-de-açúcar	75
<i>B. sacchari</i>	IPT101 ^T	Solo	30
<i>B. unamae</i>	MTI-641 ^T	Café	28
<i>B. tropica</i>	Ppe8 ^T	Cana-de-açúcar	27
<i>B. kururiensis</i>	KP23 ^T	Aquífero	22
<i>B. xenovorans</i>	LB-400 ^T	Solo	21
<i>B. vietnamiensis</i>	TVV75 ^T	Arroz	19
<i>B. tuberum</i>	STM678 ^T	<i>Aspalathus carnosa</i>	14
<i>B. phymatum</i>	STM815 ^T	<i>Machaerium lunatum</i>	13

3.3 Descrição de *Burkholderia silvatlantica*

Os dados da hibridização DNA:DNA apresentados acima (Tabela 8), sequenciamento da região 16S DNA de dois isolados de cana-de-açúcar, dois de milho e dois de abacaxi (Figura 15) juntamente com os dados de SDS-PAGE, MLEE (Multilocus Enzyme Electrophoresis) e perfil de ácidos graxos (PERIN et al., 2006) confirmaram a existência de uma nova espécie.

A espécie nova foi nomeada *Burkholderia silvatlantica*. Este nome foi escolhido em homenagem ao Bioma Mata Atlântica. Os isolados que pertencem à nova espécie foram obtidos em áreas de cultivos na região do Bioma Mata Atlântica, que suporta 80% da população brasileira, é o bioma de maior biodiversidade do mundo e atualmente possui apenas 5% de sua área preservada. A etimologia da palavra foi gentilmente fornecida pelo Dr. Hans G. Trüper (Universidade de Bonn, Alemanha), onde se lê: silv.at.lan' ti.ca. L n. silva, floresta, L. fem. adj. atlantica pertence a Atlântica, N. L. fem. adj. silvatlantica pertence a Floresta Atlântica, Brasil.

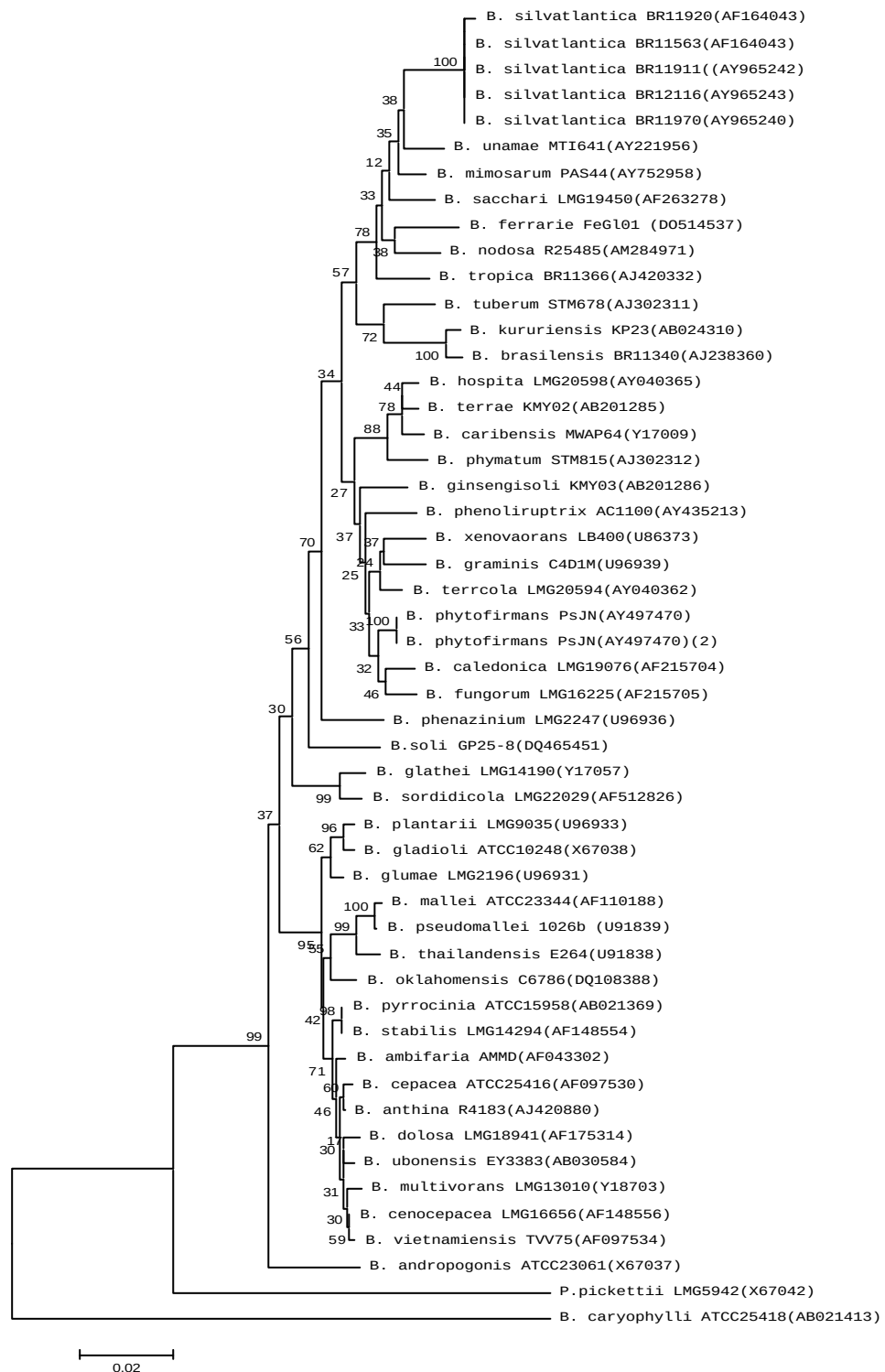


Figura 15: Análise filogenética da sequência do gene 16S rDNA de isolados diazotróficos do gênero *Burkholderia* comparados às espécies de *Burkholderia* presentes no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information). As seqüências foram alinhadas no programa CLUSTALW, e agrupadas pelo método Neighbour-joining no programa MEGA com 1000 repetições. O número de acesso dos isolados ao banco de dados se encontra entre parênteses. Isolados BR11920 e BR12116, de cana-de-açúcar, isolados BR11907 e BR11911 de milho e BR11563 de abacaxi.

B. silvatlantica apresentou células em forma de bacilos com 1,6 a 1,9 μm de comprimento e 0,8 a 0,9 μm de largura, apresentando-se individualizadas e com flagelos polares (Figura 16). Não possuem cápsulas e se deslocam com menor velocidade que BR11340 (*B. brasiliensis*) e BR11366 (*B. tropica*) em placas com meio de cultura semi-sólido.

Observou-se que com dois dias de incubação, a temperatura ótima para esta espécie foi de 30° C, medido pela quantificação de proteínas totais e ARA. Também com dois dias de incubação, observou-se que nas temperaturas de 25 e 35° C, houve pouco crescimento microbiano e não houve crescimento nas temperaturas de 7, 20 e 40° C. Com dez dias de incubação os mesmos resultados foram observados.

O pH ideal para crescimento de *B. silvatlantica* foi 5,5, também avaliado pela quantificação de proteínas totais e ARA. Com dois e dez dias de incubação, não houve crescimento nos frascos com pH variando de 3,0 a 5,0 e acima de 5,5 houve pouco crescimento microbiano.

Contribuindo para a distinção desta espécie, suas colônias são facilmente reconhecidas em placas com meio de cultura JMV, podendo dispensar o uso de técnicas com maior custo para sua identificação.

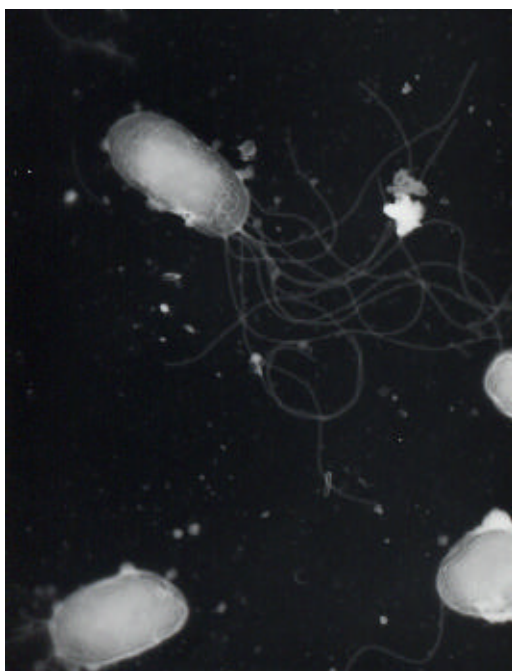


Figura 16: Fotomicrografia de uma célula de *B. silvatlantica* (BR11911) apresentando flagelos polares, obtida em microscópio eletrônico de transmissão em aumento de 12000 vezes.

Foi observado que a planta de origem não interferiu na utilização de fontes de carbono pelos isolados, todos foram similares nutricionalmente e puderam ser diferenciados das demais espécies (Tabela 8). Pelo uso de fontes de carbono, *B. silvatlantica*, estirpe padrão BR11911, pode ser diferenciada das demais estirpes, exceto de *B. vietnamiensis*, *B. sacchari* e *B. cepacia* Gen. I, pela habilidade de usar sacarose. Pode ser diferenciada de *B. vietnamiensis* pela habilidade de usar adonitol e L-ramnose, de *B. sacchari* pela habilidade de usar D-arabitol e L-ramnose e de *B. cepacia* também por usar L-ramnose. Foi observado também que a maioria dos isolados de *B. silvatlantica*, 43 de 47, usaram artritrol, que não foi usado por nenhuma estirpe padrão das espécies analisadas. Semelhante ao ocorrido com L-ramnose, usada por 45 isolados e apenas os padrões BR11366 (*B. tropica*), MTI641 (*B. unamae*) e

STM815 (*B. phymatum*). O oposto ocorreu com alfa-ceto-ácido glutárico e glicerol, usados por todos os padrões das espécies testadas e apenas 14 e 13 isolados de *B. silvatlantica*, respectivamente.

Tabela 8: Diferenças na utilização de fontes de carbono pela estirpe padrão de *B. silvatlantica* e espécies diazotróficas. Os dados foram obtidos utilizando o Kit BIOLOG. 1) Estirpe padrão de *B. silvatlantica* BR1911^T; 2) BR 1366 (*B. tropica*); 3) BR11340 (*B. brasiliensis*); 4) KP23 (*B. kururiensis*); 5) TVV75 (*B. vietnamiensis*); 6) ATCC25416 (*B. cepacia*, Gen. I); 7) MTI641 (*B. unamae*); 8) IPT101 (*B. sacchari*); 9) STM678 (*B. tuberum*); 10) STM815 (*B. phymatum*).

Substrato	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Adonitol	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
D-Arabitól	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Celobiose	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
L-fucose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
B-gentiobiose	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D-rafinose	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
L-ramnose	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
Sacarose	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
D-trehalose	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Xilitol	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Até o momento são conhecidos 47 isolados da nova espécie *B. silvatlantica*, sendo 32 de cana-de-açúcar e 11 milho (nesta tese) e 4 abacaxi (WEBER et al., 1999 e CRUZ et al., 2001) (Tabela 9). Foram isolados de oito das 16 variedades de cana-de-açúcar coletadas e de todos os locais amostrados, uma cultivar de milho e de 3 das cinco cultivares de abacaxi. Os resultados mostraram que esta espécie possui ampla distribuição, ocorrendo em canaviais de Nordeste ao Sul do Brasil, milho em Seropédica-RJ e abacaxi coletado nos estados do Rio de Janeiro e Bahia.

Cinco isolados desta espécie também foram testados pela técnica de PCR, com os iniciadores desenhados a partir da região 16S rDNA, específicos para as espécies *B. kururiensis* e *B. tropica* (BRASIL, 2005). A região do 16S rDNA de nenhum isolado foi amplificada com o iniciador BKTF/BKR, específico para *B. kururiensis*. Mas quando testados com o iniciador BKTF/R1, específico para *B. tropica*, a região 16S rDNA de todos os isolados foi amplificada. Porém com BKTF/R1, os isolados de *B. silvatlantica* apresentaram fragmento de 550 pb, maior que o observado para *B. tropica*, de 390 pb (dados não apresentados). *B. tropica* é muito próxima de *B. silvatlantica*, observado pelo sequenciamento da região 16S rDNA, e quando os iniciadores foram desenvolvidos esta nova espécie não existia. Este resultado indica que o iniciador BKTF/R1, pode ser usado para discriminar as duas espécies, já que o tamanho do fragmento é diferente, porém a análise precisa ser confirmada com maior número de isolados.

Tabela 9: Dados ecológicos dos isolados da espécie *B. silvatlantica*.

Isolado	Planta e cultivar	Amostra	Localidade	Meio de cultura	Padrão de restrição
BR11920	Cana-RB72-454	Colmo	Seropédica-RJ	JMV	fkagc
BR11921	Cana-RB72-454	Colmo	Seropédica-RJ	JMV	fkagc
BR11922	Cana-RB72-454	Colmo	Seropédica-RJ	JMV	fkagc
BR11923	Cana-RB72-454	Colmo	Seropédica-RJ	JMV	fkagc
BR11924	Cana-RB72-454	Colmo	Seropédica-RJ	JMV	fkagc
BR12204	Cana-Caiana Roxa	Rizosfera	Campos-RJ	JMV	fkagc
BR12206	Cana-Caiana Roxa	Raízes	Campos-RJ	JMV	fkagc
BR12120	Cana-AKBAR	Rizosfera	Campos-RJ	LGI	fkagc
BR12208	Cana-AKBAR	Rizosfera	Campos-RJ	LGI	fkagc
BR12169	Cana-AKBAR	Rizosfera	Campos-RJ	JMV	fkagc
BR12152	Cana-CB45-3	Rizosfera	Campos-RJ	LGI	fkagc
BR12154	Cana-CB45-3	Rizosfera	Campos-RJ	LGI	fkagc
BR12164	Cana-RB85-5113	Raízes	Paranavaí-PR	LGI	fkagc
BR12116	Cana-RB85-5113	Raízes	Paranavaí-PR	LGI	fkagc
BR12165	Cana-RB85-5113	Raízes	Paranavaí-PR	LGI	fkagc
BR12129	Cana-RB85-5113	Raízes	Paranavaí-PR	LGI	fkagc
BR12167	Cana-RB85-5113	Raízes	Paranavaí-PR	JMV	fkagc
BR12153	Cana-RB85-5113	Raízes	Paranavaí-PR	JMV	fkagc
BR12166	Cana-RB72-454	Raízes	Paranavaí-PR	LGI	fkagc
BR12117	Cana-RB72-454	Rizosfera	Paranavaí-PR	LGI	fkagc
BR12151	Cana-RB72-454	Raízes	Paranavaí-PR	LGI	fkagc
BR12170	Cana-SP80-3280	Raízes	Piracicaba-SP	JMV	fkagc
BR12171	Cana-SP80-3280	Raízes	Piracicaba-SP	JMV	fkghg
BR12155	Cana-SP80-3280	Raízes	Piracicaba-SP	JMV	fkagc
BR12177	Cana-SP80-3280	Raízes	Piracicaba-SP	JMV	fkagc
BR12156	Cana-SP80-3280	Rizosfera	Piracicaba-SP	JMV	fkagc
BR12128	Cana-SP80-3280	Rizosfera	Piracicaba-SP	JMV	fkagc
BR12125	Cana-SP80-1842	Raízes	Piracicaba-SP	JMV	dkcgh
BR12172	Cana-SP78-4764	Raízes	Timbaúba-PE	JMV	fkagc
BR12173	Cana-SP78-4764	Rizosfera	Timbaúba-PE	JMV	fkagc
BR12175	Cana-SP78-4764	Rizosfera	Timbaúba-PE	JMV	fkagc
BR12213	Cana-SP87-344	Rizosfera	Timbaúba-PE	LGI	fkagc
BR11905	Milho-AventisA2345	Rizosfera	Seropédica-RJ	LGI	dkagc
BR11906	Milho-AventisA2345	Rizosfera	Seropédica-RJ	LGI	dkagc
BR11907	Milho-AventisA2345	Rizosfera	Seropédica-RJ	LGI	dkagc
BR11908	Milho-AventisA2345	Rizosfera	Seropédica-RJ	JMV	dkagc
BR11909	Milho-AventisA2345	Rizosfera	Seropédica-RJ	JMV	fkagc
BR11910	Milho-AventisA2345	Rizosfera	Seropédica-RJ	JMV	dkagc
BR11911	Milho-AventisA2345	Rizosfera	Seropédica-RJ	JMV	fkagc
BR11912	Milho-AventisA2345	Rizosfera	Seropédica-RJ	JMV	fkagc
BR11913	Milho-AventisA2345	Rizosfera	Seropédica-RJ	JMV	dkagc
BR11914	Milho-AventisA2345	Rizosfera	Seropédica-RJ	JMV	fkagc
BR11915	Milho-AventisA2345	Rizosfera	Seropédica-RJ	JMV	dkagc
BR11563	Abacaxi-Perolera	Raízes	Cruz das Almas-BA	LGI	fkagc
AB71	Abacaxi-Perolera	Raízes	Cruz das Almas-BA	LGI	fkagc
BR11680	Abacaxi-Pérola	Caule	Macaé-RJ	LGI	fkagc
AB117	Abacaxi-Ammoth Cayenne	Raízes	Quissamã-RJ	JMV	fkagc

3.4 Produção de Hormônio de Crescimento (AIA – ácido indol acético)

Através da produção de fitormônios, os microrganismos podem estimular o crescimento vegetal e aumentar a produção de metabólitos pelas plantas, que podem ser utilizados para o seu próprio crescimento. Acredita-se que cerca de 80% das espécies de bactérias isoladas da rizosfera possuem capacidade de produzir AIA (LOPER e SCHROTH, 1986).

Neste estudo não foi observado produção de AIA pelos isolados da nova espécie e estirpes padrões de *B. tropica*, *B. brasiliensis*, *B. kururiensis*, *B. cepacia* Gen. I e *B. unamae*. A capacidade de produzir hormônios vegetais por bactérias de *Burkholderia* foi apenas verificada na estirpe padrão TVV75, de *B. vietnamiensis*, que produz ácido indolacético (AIA), corroborando com dados da literatura (TABACCHIONI et al., 1993).

A produção de AIA já foi observada em *A. amazonense* isolado de raízes de *Brachiaria* (REIS JUNIOR et al., 2004) e arroz inundado (RODRIGUES, 2004), *H. seropedicae* e *G. diazotrophicus* (BASTIAN et al., 1998). Alguns autores acreditam que grande contribuição das bactérias diazotróficas esteja relacionada com a produção de fitohormônios, desempenhando papel importante na promoção do crescimento de plantas em geral.

3.5 Avaliação da Capacidade de Solubilização de Fosfatos

O fósforo é um nutriente limitante em solos tropicais, sendo os microrganismos solubilizadores de fosfato um grupo microbiano de grande relevância, pois apresentam capacidade de mineralizar fósforo orgânico e solubilizar formas inorgânicas de fósforo, disponibilizando-os para as plantas (SILVA FILHO, 1998). Esta solubilização ocorre pela ação de ácidos orgânicos e CO₂ produzidos nos processos normais do metabolismo de bactérias e fungos. A maioria dos microrganismos solubilizadores de fosfato são fungos (SILVA FILHO et al., 2002), porém bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* apresentam potencial de solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999).

Das estirpes testadas neste estudo, ATCC25416 (*B. cepacia* gen. I), KP23 (*B. kururiensis*), TVV75 (*B. vietnamiensis*) BR11366 (*B. tropica*) e BR11340 da espécie proposta *B. brasiliensis*, formaram halo transparente ao redor das colônias, indicando capacidade de solubilização de fosfato. Já MTI641 (*B. unamae*) e os isolados de *B. silvatlantica* não solubilizaram fosfato.

Este é o primeiro relato da capacidade de solubilização de fosfato por espécies diazotróficas do gênero *Burkholderia*. Esta habilidade foi relatada apenas por isolados de *B. cepacia* (PEIX et al., 2001), e outro estudo mostrou a capacidade de acumulação de fosfatos por *B. cepacia* em condições de baixo pH (MULLAN et al., 2002). Portanto, estes dados são importantes ao revelar que algumas espécies diazotróficas também solubilizam fosfatos, contribuindo ainda mais para a sustentabilidade dos sistemas.

3.6 AFLP (Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos Amplificados)

A técnica de AFLP, desenvolvida por Vos (VOS et al., 1995), apresenta alto potencial para estudos de taxonomia (JANSSEN et al., 1996) e diversidade genética entre isolados de diferentes origens e espécies ou grupos de bactérias muito semelhantes como *Burkholderia* (COENYE et al., 1999b). Também mostrou alto poder discriminatório entre isolados de *B. cenocepacia* e *B. ambifaria*, isolados de milho (DALMASTRI et al., 2003).

Vários estudos independentes mostraram uma alta correlação entre a similaridade de padrões de AFLP e de hibridização de DNA-DNA para diversos grupos taxonômicos, incluindo *Aeromonas* (HUYS et al., 1996), *Agrobacterium* (MOUGEL et al., 2001), *Bradyrhizobium* (WILLEMS et al., 2001), *Vibrio* (THOMPSON et al., 2004), *Xanthomonas* (RADEMAKER et al., 2000) e *Burkholderia* (COENYE et al., 2000). Por este motivo, AFLP foi sugerido como uma alternativa para as hibridizações de DNA (STACKEBRANDT et al., 2002; THOMPSON et al., 2004).

Neste estudo, os resultados obtidos com AFLP foram semelhantes aos observados nas análises usadas para a taxonomia polifásica de *B. silvatlantica*, contribuindo para a confirmação da nova espécie. Como observado na figura abaixo (Figura 17) todos os isolados testados, das diferentes plantas, permaneceram agrupados, formando um grupo diferente dos padrões analisados.

O agrupamento e a porcentagem de diferença entre *B. silvatlantica* e as outras espécies está de acordo com os dados da hibridização DNA:DNA, onde a espécie mais próxima *B. sacchari* é apenas 30% semelhante à *B. silvatlantica*. Porém também foi observado neste dendrograma que a similaridade entre os isolados de *B. silvatlantica* foi muito baixa, separando os isolados abaixo do nível de espécie. Semelhante ao observado com os iniciadores *EcoRI*+G e *MseI*+C (dados não apresentados).

Provavelmente a digestão do DNA genômico com as enzimas *EcoRI* e *MseI* e amplificações com iniciadores com as bases seletivas A mais C, associado a complexidade do genoma de *Burkholderia* seja responsável pelo grande polimorfismo observado. Esta técnica vem sendo utilizada na Embrapa Agrobiologia e maiores esforços serão necessários para avaliar a diversidade da espécie *B. silvatlantica*. Outras combinações de enzimas de restrição bem como iniciadores com diferentes bases seletivas, deverão ser utilizados para caracterizar melhor o padrão de AFLP de *B. silvatlantica*.

Estudos adicionais ainda são necessários para o melhor conhecimento da espécie descrita nesta tese. Em função de sua constante presença nas plantas estudadas e ampla distribuição, pode ser importante não apenas pela FBN, mas também por apresentar atributos importantes para a biotecnologia. Estudos como desta tese contribuem para viabilizar a aplicação dessas bactérias, através da inoculação, como alternativa na substituição de fertilizantes nitrogenados ou na redução de doses aplicadas, diminuindo danos à saúde humana e contribuindo para a sustentabilidade ambiental.

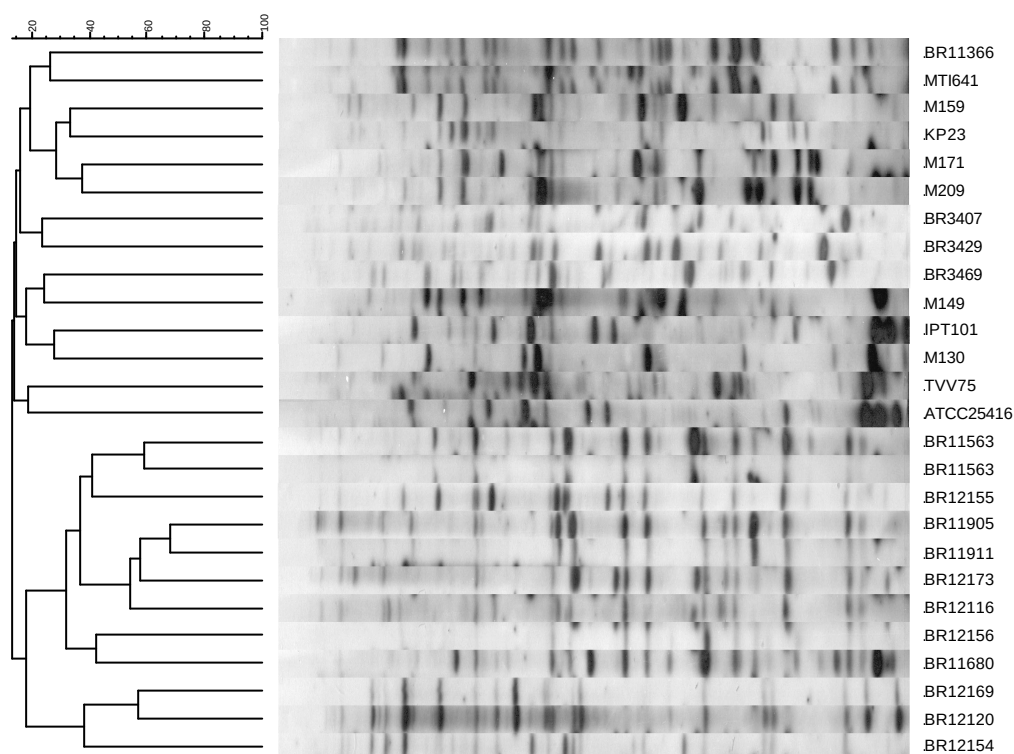


Figura 17: Dendrograma de similaridade de isolados da nova espécie *B. silvatlantica* (BR11563 e BR11680 de abacaxi; BR12155, BR12173, BR12116, BR12156, BR12169, BR12120 e BR12154 de cana-de-açúcar; BR11905 e BR11911^T de milho) e estirpe padrão de *B. vietnamiensis* (TVV75), *B. kururiensis* (KP23), *B. tropica* (BR11366), *B. cepacia* gen I (ATCC25416), *B. unamae* (MTI641), *B. phymatum* (STM815), *B. tuberum* (STM678), *B. sacchari* (IPT101) isolados da espécie proposta *B. brasiliensis* (BR11340) e *Burkholderia* spp. (M159, M171, M209, M149, BR3407, BR3429 e BR3469). Dados obtidos pelo padrão de AFLP usando os primers específicos *EcoRI* + A e *MseI* + C. O dendrograma foi gerado pelo programa GelCompar, utilizando o algoritmo UPGMA e índice Jaccard.

3.7 Capacidade de Nodulação e Promoção de Crescimento

Os isolados de *B. silvatlantica*, assim como as bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* isoladas de *Poaceas*, não formaram nódulos e não contribuíram para o crescimento de plantas de feijão, siratro, *Mimosa pellita* e *Mimosa pudica* (dados não apresentados). Os resultados obtidos corroboram com trabalhos já desenvolvidos, que mostraram alta especificidade de nodulação por bactérias do gênero *Burkholderia*. Apenas foram encontradas, e em alta população, em plantas da sub família *Mimosoidea* e possuem alta especificidade com o hospedeiro.

Em experimentos de inoculação cruzada (FARIA et al., 1999), foi observado que quase todas as espécies de plantas da sub família *Mimosoidea* são bastante específicas em relação à bactéria, e só nodulam com estirpes provenientes de plantas da própria tribo. Estes isolados, mais tarde, foram identificados como pertencentes ao gênero *Burkholderia* (CHEN et al., 2005a) e quando inoculados em plantas ditas promíscuas de feijão e siratro, de 15 isolados, apenas cinco nodularam siratro e sete nodularam feijão, porém os nódulos eram ineficientes (OLIVEIRA et al., 2005). Fato semelhante ocorreu com a estirpe STM687 de *B.*

tuberosum, quando inoculado em siratro formou de cinco a 20 nódulos, todos ineficientes (MOULIN et al., 2001). Porém bactérias diazotróficas da espécie *B. caribensis*, isoladas de *M. pudica* e *M. diplotricha* em Taiwan, quando inoculadas em *M. pudica*, foi verificado a formação de nódulos eficientes 60 dias depois da inoculação (CHEN et al., 2003b).

Os dados de isolamento revisados na introdução deste capítulo e os resultados de inoculações em diferentes plantas, indicam que bactérias do gênero *Burkholderia* nodulam um número restrito de leguminosas da sub família *Mimosoidea*, mostrando pouca ou nenhuma sobreposição de bactérias no mesmo nicho ecológico.

Acredita-se que a FBN é um processo muito antigo que foi perdido ao longo da evolução por muitas bactérias. Já a nodulação é um evento recente, que provavelmente apareceu na Terra junto com as leguminosas a 70 milhões de anos atrás. A presença, em α e β -rizóbio dos genes *nodABC*, suporta a hipótese de origem comum dos genes *nod* e que α e β -proteobactérias usam a mesma estratégia para o estabelecimento da simbiose, já que ao mutar *nodA* da estirpe STM678, esta não formou nódulos quando inoculada em Siratro (MOULIN et al., 2001).

Os genes requeridos para a nodulação, em *C. taiwanensis* e *B. phymatum*, estão localizados em plasmídeos, juntamente com *nifH* e, provavelmente, foram adquiridos via transferência horizontal. Entretanto, acredita-se que inúmeros eventos de transferência horizontal tenham ocorrido. Os genes *nod* e *nif* de *Burkholderia* são similares a α -rizóbio, porém, a análise de agrupamento das seqüências dos genes *nodA* e *nifH* de isolados de *C. taiwanensis*, *B. caribensis* e dois isolados de α -rizóbio, mostrou que estes se agrupam de maneira diferente, sugerindo que seus genes de nodulação e FBN tenham sido adquiridos em inúmeros eventos de transferência horizontal (CHEN et al., 2003a).

3.8 Cultivo em Meio de Cultura Semi-sólido

Foi observado que todas as bactérias testadas cresceram no meio de cultura 79, que contém 400 mg de extrato de levedura (Tabela 10), porém apenas as estirpes isoladas de *Poaceas* não apresentaram inibição da enzima nitrogenase e fixaram nitrogênio nesta condição. Das bactérias isoladas de *Poaceas*, todas cresceram e fixaram nitrogênio em condições microaerofílicas, já das bactérias nodulantes, apenas as estirpes STM815 (*B. phymatum*) e STM678 (*B. tuberosum*), cresceram e fixaram nitrogênio nesta condição.

Estes resultados mostraram que bactérias isoladas de nódulos cresceram apenas em meio de cultura semi-sólido com alta adição de extrato de levedura e não fixaram nitrogênio. Comportamento intermediário foi observado nas estirpes padrões das espécies *B. tuberosum* e *B. phymatum*. Estas bactérias foram isoladas de nódulos de *Aspalathus carnosa* e *Machaerium lunatum* e como as bactérias isoladas de *Poaceas*, fixaram nitrogênio em LGI, JMV e JNFb, porém não fixaram nitrogênio em meio 79, como as bactérias isoladas de nódulos. *B. tuberosum*, já apresentou características distintas das demais espécies nodulantes, nodulou 30 das 31 espécies de *Mimosas* testadas, apresentando nódulos eficientes em 21 delas, e provavelmente a capacidade de fixar nitrogênio fora da planta contribuiu para esta promiscuidade (ELLIOT et al., 2007).

Foi observado também que os isolados de *B. silvatlantica* testados, assim como as espécies próximas, *B. unamae* e *B. tropica* (isolada em meio de cultura LGI-P) cresceram e fixaram nitrogênio em meio de cultura LGI e LGI-P, com 5 e 10% de sacarose, destacando a alta tolerância osmótica destas espécies. Este comportamento é bastante similar a da espécie *G. diazotrophicus*, também isolada de cana-de-açúcar, que é capaz de crescer em LGI-P com até 10% de sacarose (DÖBEREINER et al., 1995).

Os resultados anteriores de inoculação e os testes de crescimento em meios de cultura semi-sólidos contribuíram para o conhecimento das bactérias do gênero *Burkholderia*,

mostrando que aquelas que nodulam leguminosas são diferentes das encontradas em associação com *Poaceas*.

Tabela 10: Capacidade de crescimento em meio de cultura semi-sólido por estirpes diazotróficas de diferentes gêneros.

Gênero	Estirpe	LGI-P	LGI	JMV	JMVe ¹	BMGM	79
<i>B. silvatlantica</i>	BR11911	+	+	+	+	+	+
<i>B. silvatlantica</i>	BR12116	+	+	+	+	+	+
<i>B. silvatlantica</i>	BR11563	+	+	+	+	+	+
<i>B. tropica</i>	BR11366	+	+	+	+	+	+
<i>B. brasiliensis</i>	BR11340	-	-	+	+	+	+
<i>B. kururiensis</i>	KP23	-	+	+	+	+	+
<i>B. vietnamiensis</i>	TVV75	-	-	+	+	+	+
<i>B. unamae</i>	MTI641	+	+	+	+	+	+
<i>B. cepacia</i> g. I	ATCC25416	-	-	+	+	+	+
<i>B. phymatum</i>	STM815	-	-	+	+	+	+
<i>B. tuberum</i>	STM678	-	-	+	+	+	+
<i>B. mimosarum</i>	PAS44	-	-	-	-	-	+
<i>Burkholderia</i> (A)	BR3470	-	-	-	-	-	+
<i>Burkholderia</i> (B)	BR3432	-	-	-	-	-	+
<i>Burkholderia</i> (C)	BR3407	-	-	-	-	-	+
<i>Burkholderia</i> (D)	BR3469	-	-	-	-	-	+
<i>Sinorhizobium</i> sp.	TJ170	-	-	-	-	-	+
<i>Rhizobium</i> sp.	TJ167	-	-	-	-	-	+

JMVe¹: adição de 20 mg de extrato de levedura por 1000 ml de meio de cultura

4 CONCLUSÕES

- a) A população de bactérias diazotróficas foi maior em amostras de raízes e rizosfera de milho;
- b) Foram obtidos 11 isolados de *Burkholderia* spp. de amostras de milho;
- c) Bactérias diazotróficas isoladas em associação com cana-de-açúcar, milho e abacaxi pertencem a uma nova espécie nomeada como *B. silvatlantica*;
- d) Esta espécie é comum em cana-de-açúcar e apresenta ampla distribuição geográfica;
- e) *B. silvatlantica* não produz AIA, não solubiliza fosfato inorgânico e não nodula leguminosas;
- f) A técnica de AFLP contribuiu para a descrição da nova espécie, no entanto, com as enzimas de restrição e combinação de iniciadores utilizados, não permitiu o estudo da diversidade entre os isolados.
- g) *B. silvatlantica* e espécies diazotróficas isoladas de *Poaceas*, fixam nitrogênio em condições microaerofílicas, diferente da maioria das espécies de *Burkholderia* isoladas de nódulos.

CONCLUSÕES GERAIS

- a) Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* estão presentes na maioria das variedades de cana-de-açúcar e na cultivar de milho analisadas, em maior número nas raízes e rizosfera;
- b) A alteração na metodologia de isolamento proporcionou a obtenção de maior número de isolados;
- c) Os isolados apresentam grande variação metabólica e genética e a maioria difere dos padrões analisados;
- d) Apenas cinco foram identificados pela técnica de ARDRA, dois pertencem à espécie *B. tropica* e três à *B. unamae*.
- e) Grande parte dos isolados de bactérias diazotróficas em associação com cana-de-açúcar, todos os isolados de milho e dois de abacaxi pertencem a uma nova espécie nomeada *B. silvatlantica*;
- f) *B. silvatlantica* não produz AIA e não solubiliza fosfato inorgânico;
- g) *B. silvatlantica* e bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*, isoladas de *Poaceas*, fixam nitrogênio em condições microaerofílicas e não nodulam leguminosas;
- h) A maioria das bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*, que nodulam leguminosas, não fixam nitrogênio em condições microaerofílicas;

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHOUAK, W.; CHRISTEN, R.; BARAKAT, M.; MARTEL, M. H.; HEULIN H. *Burkholderia caribensis* sp. nov., na exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microagregates in Martinique. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 787-794, 1999.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v.25, p. 3389-402, 1997.
- ALVAREZ, A. E.; RIBEIRO, A. F.; HESSEL, G.; BERTUZZO, C. S.; RIBEIRO, J. D. Fibrose cística em um centro de referência no Brasil: características clínicas e laboratoriais de 104 pacientes e sua associação com o genótipo e a gravidade da doença. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 5, p. 1-9, 2004.
- ASH, C.; PRIEST, F.G.; COLLINS, M. D.; Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **J. Microbiol. Serol.** v. 64, p. 253-260, 1993.
- AZEREDO, D. F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, H.; VIEIRA, J. R. Nitrogênio na cana planta; doses e fracionamento. **STAB-Açúcar, Álcool e Subprodutos**. v. 4, p. 32-36, 1986.
- BALANDREAU, J.; VIALARD, V.; COURNOYER, B.; COENYE, T.; LAEVEENS, S.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* genomovars III is a common plant-associated bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 982-985, 2001.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L. V.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biol. Biochem** v. 29, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, J. I.; POT, B. KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Inter. J. System. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996. 238 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 485-491, 2000.
- BALOTA, E. L. **Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca.** 1994. 302 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BALOTA, E. L.; LOPES, E. S.; HUNGRIA, M.; DÖBEREINER, J. Inoculação de bactérias diazotróficas e fungos micorrizicos arbusculares na cultura da mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 6, p. 627-639, 1997.

BARRET, C. F.; PARKER, M. A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 57-65, 2005.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant growth regulation**, v. 24, p. 7-11, 1998.

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

BODDEY, L. H. **Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*, isoladas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) cultivadas na Austrália e no Brasil**. 2002. 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

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

BODDEY, R. M.; BODDEY, L. H.; URQUIAGA, S. A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio. 27 p., 1990. EMBRAPA, CNPAB, documento 6.

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and others grasses. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.28, p.889-895, 2001.

BRAMER, C. O.; VANDAMME, P.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; STEINBUCHER, A. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate- accumulating bacterium isolated from soil of sugar-cane plantation in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1709-1713, 2001.

BRASIL, M. da S. **Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz**. 2005. 137 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BURKHOLDER, W. H.. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, v. 40, p. 115-117, 1950.

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

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

- CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., in N₂-fixing rhizospheric and endophyte species. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 54, p. 1165-1172, 2004.
- CAIN, C. C.; HENRY, A. T.; WALDO, R. H.; CASIDA, L. J.; FALKINHAM, J. O. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4139-4141, 2000.
- CANUTO, E. DE L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, suplementos 2, p. 62-64, 2003.
- CARUSO, L. V. & BALDANI, J. I. Monitoring the survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil using lacZ fusion. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics**. BODDEY, R. M. & RESENDE, A. S. (eds). Embrapa, Rio de Janeiro, p. 108-109, 1995.
- CAVALCANTE, V. A. & DOBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.
- CHEN, W. M., JAMES, E. K.; COENYE, T.; CHOU, J. H.; BARRIOS, E.; FARIA, S. M. de; ELLIOTT, G. N.; SHEU, S. Y.; SPRENT, J. I.; VANDAME, P. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 1847-1851, 2006.
- CHEN, W. M., JAMES, E. K.; PRESCOTT, A. R.; KIERANS, M.; SPRENT, J. I. Nodulation of *Mimosa* spp. by the β -proteobacterium *Ralstonia taiwanensis*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 16, p. 1051-1061, 2003a.
- CHEN, W. M., LAEVEENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; VOS, P. de; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1729-1735, 2001.
- CHEN, W. M.; DE FARIA, S. M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; CHOU, YI-JU; CHOU, JH.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Proof that *Burkholderia* forms effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7461-7471, 2005a.
- CHEN, W. M.; JAMES, E. K.; CHOU, J. H.; SHEU, S. Y.; YANG, S. Z.; SPRENT, J. I. beta-*Rhizobium* from *Mimosa pigra*, a newly discovered invasive plant in Taiwan. **New Phytologist**, v. 168, p. 661-675, 2005b.
- CHEN, W. M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, C.; BÉNA, G.; BOIVIN-MASSON, C. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -Proteobacteria is widespread in nature. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 7266-7272, 2003b.
- COENYE, T.; HOLMES, B.; KERSTERS, K.; GOVAN, J. R. W.; VANDAMME, P. *Burkholderia cocovenans* and *Burkholderia vandii* are junior synonyms of *Burkholderia gladioli* and *Burkholderia plantarii*, respectively. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 37-42, 1999a.

- COENYE, T.; SCHOULS, L. M.; GOVAN, J. R. W.; KERSTERS, K.; VANDAMME P. Identification of *Burkholderia* species and genomovars from cystic fibrosis patients by AFLP fingerprinting. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 49, p.1657-1666, 1999b.
- COENYE, T.; LAEVEENS, S.; WILLEMS, A.; OHLEN, M.; HANNANT, W.; GOVAN, J. R. W.; GILLIS, M.; FALSEN, E.; VANDAMME, P. *Burkholderia fungorum* sp. nov., and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1099-1107, 2001a.
- COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HENRY, D.; LIPUMA, J. J.; LAEVEENS, S.; GILLIS, M.; SPEERT, D. P.; VANDAMME, P. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1481-1490, 2001b.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 719-729, 2003.
- CONAB – Conselho Nacional de Abastecimento (2006). Disponível: site IBGE. URL: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2_levantamento_cana_safra_2006_07.pdf. Consultado em 20 de novembro de 2006.
- CRUZ, B. B. G.; PERIN, L.; REIS, V. M. Quantificação e caracterização de bactérias diazotróficas associadas a plantas de milho. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 23., 2005, Santos. **Resumos...** Santos: SBM, 2005. p. 280.
- CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacterial isolated from banana (*Musa* spp.) e abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merril). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.
- DALMASTRI, C.; FIORE, A.; ALISI, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; GIULIANO, G.; SPROCATI, A. R.; SEGRE, L.; MATHENTHIRALINGAM, E.; CHIARINI, L.; VANDAMME, P. A rhizosferic *Burkholderia cepacia* complex population: genotypic and phenotypic diversity of *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia ambifaria*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 46, p. 179-187, 2003.
- DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S. Soil type and mayze cultivar affect the genetic diversity of mayze root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbial Ecology**, v. 38, p. 274-283, 1999.
- DALTON, D. A.; KRAMER, S.; AZIOS, N.; FUSARO, S.; CAHILL, E.; KENNEDY, C. Endoohytc nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 469-479, 2004.
- DI CELLO, F.; BEVIVIVNO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4485-4493, 1997.
- DÖBEREINER J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Research Biology**, v.1, p. 261-272, 1958.
- DOBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 19, p. 251-258, 1959.

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

DONG, Z.; ZELMER, C. D.; CANNY, M. J.; McCULLY, M. E.; LUIT, B.; PAN, B.; FAUSTINO, R. S.; PIERCE, G. N. & VESSEY, J. K. Evidence of protection of nitrogenase from O₂ by colony structure in the aerobic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Microbiology**, v. 148, p. 2293-2298, 2002.

EL BANNA, N.; WINKELMANN, G. Pyrrolnitrin from *Burkholderia cepacia*: antibiotic activity against fungi and novel activities against streptomycetes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 69-78, 1998.

ELLIOTT, G. N., CHEN, W., CHOU, J., WANG, H., SHEU, S., PERIN, L., REIS, V. M., MOULIN, L., SIMON, M. F., JAMES, E. K. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. **New Phytologist**, v. 173, n. 1, p., 2007

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Embrapa Produção de Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412p.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia* a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2790-2798, 2001.

FARIA, S. M. de; LIMA, H. C. de; OLIVARES, F. L.; MELO, R. B.; XAVIER, R. P. Nodulação em espécies florestais, especificidade hospedeira e implicações na sistemática de leguminosas. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS; Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 667-686.

FIORE, A., LAEVEN, S.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; VANDAMME, P.; CHIARINI L. *Burkholderia cepacia* complex: distribution of genomovars among isolates from the maize rhizosphere in Italy. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 137-143, 2001

FRED, E.B. & WAKSMAN, S.A.. 1928. Laboratory Manual of General Microbiology With special reference to the microorganism of the soil. Mc-Graw-hill book company, Inc. New York 145 p.

FUENTES-RAMÍRES, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J., SEPÚLVEDA, J. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, p.117-128, 1999.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov. associated with coffee plants. **Intern. Journal of Syst. and Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 1305-1314, 2001.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus* a endolacetic producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v. 154, p. 145-150, 1993.

- GILLIS, M.; DOBEREINER, I.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autrophicum*. In: Nitrogen fixation (M. Polsinelli, R. Materassi and M. Vicenzi, Eds), pp. 292-294, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1991.
- GILLIS, M.; VANVAN, T.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTENS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia-vietnamiensis* sp-nov for N-2-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 274-289, 1995.
- GOMEZ, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLI, R. C. P.; TORRES, B. B.; BUENO NETTO, C. L.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, L. F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 785-791, 1996.
- GORIS, J.; DEJONGHE, W.; FALSEN, E.; CLERK, E. D. E.; GEERAERTS, B.; WILLEMS, A.; TOP, E. M.; VANDAMME, P.; DE VOS, P. Diversity of transconjugants that acquired plasmid pJP4 or p EMT1 after inoculation of a donor strain in the A- and B- horizon of an agricultural soil and description of *Burkholderia hospita* sp. nov. and *Burkholderia terricola* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 340-352, 2002.
- GORIS, J.; VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.; FALSEN, E.; QUENSEN, J. F.; TIEDJE, J. M.; VANDAMME, P. Classification of the PCB- and biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1677-1681, 2004.
- GRACIOLLI, L. A.; FREITAS, J. R.; RUSCHEL, A. P. Bactérias fixadoras de Nitrogênio nas raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). **Revista de Microbiologia**, v. 14, p. 191-196, 1983.
- GUIMARÃES, S. L. **Seleção de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas para inoculação em três cultivares de arroz inundado**. 2001. 77 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- HEBBAR, K. P.; MARTEL, M. H.; HEULIN, T. Suppression of pre- and post- emergence damping-off in corn by *Burkholderia cepacia*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, p. 29-36, 1998.
- HEYDARI, A.; MISAGHI, I. J. Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. **Plant and Soil**, v. 202, p. 109-116, 1998.
- HUYS, G.; COOPMAN, R.; JANSSEN, P.; KERSTERS, K. High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 46, p. 572-580, 1996.
- JACKSON, M. B. Ethylene in root growth and development. In: MATTO, A. K.; SUTTLE, J. C. (Ed.). **The plant hormone ethylene**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 159-181.
- JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M.; KERSTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, v. 142, n. 1881-1893, 1996.
- JIMENEZ, L. Molecular diagnosis of microbial contamination in cosmetic and pharmaceutical products: a review. **Journal of AOAC International**, p. 671-675, 2001.

- JONES, A. M.; DODD, M. E.; WEBB, A. K. *Burkholderia cepacia*: current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. **European Respiratory Journal**, v. 17, p. 295-301, 2001.
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **Inter. J. System. and Evol. Microbiol.** v. 51, p. 157-168, 2001.
- KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**. v. 5, p.150-163, 2004.
- LADHA, J. K.; BARRAQUIO, W. L.; WATANABE, I. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants **Can. J. Microbiol.**, v. 29, p. 1301–1308, 1983.
- LI, R. & MACRAE, I. C. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **Soil Biology Biochemistry**, v. 24, p. 413-419, 1992.
- LI, W.; ROBERTS, D. P.; DERY, P. D.; MEYER, S. L. F.; LOHRKE, S.; LUMSDEN, R. D.; HEBBAR, K. P. Broad spectrum antibiotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BC-F. **Crop Protection**, v. 21, p. 129-135, 2002.
- LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using ¹⁵N aided nitrogen balance. **Soil Biology Biochemistry**, v. 19, p. 165-170, 1987.
- LOPER, J. E.; SCHROTH, M. N. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, v. 76, p. 386-389, 1986.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. E RANDALL, R. J. Protein measurement with the folim phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 183, p. 265-275, 1951.
- MACK, K.; TITBALL, R. W. The detection of insertion sequences within the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* which have been identified previously in *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 162, p. 69-74, 1998.
- MAHENTHIRALINGAM, E.; BISCHOF, J.; BYRNE, S. K.; RADOMSKI, C.; DAVIES, J. E.; AV-GAY, Y.; VANDAMME, P. DNA-based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3165-3173, 2000.
- MEDEIROS, A. F. A.; POLIDORO, J. C.; REIS, V. M. Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum* spp). **Plant and Soil**, v. 279, p. 141-152, 2006.
- MEYER, J. M.; TRANVAN, V.; STINZI, A.; STEPHAN, H.; BERGE, O.; WINKELMANN, G. Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* e *B. cepacia* (Formerly *Pseudomonas cepacia*). **Biometals**, v. 8, p. 309-317, 1995.
- MIRALLES, I. S.; MACIEL, M. do C.; ALVES, A.; FERREIRA, M. R. *Burkholderia pseudomallei*: a case report of a human infection in Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p. 51-54, 2004.

- MOULIN, L.; CHEN, W. M.; BENA, G.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. *Rhizobia*: the family is expanding. In: FINAN, T.; O'BRIAN, M.; LAYZELL, D.; VESSEY, K.; NEWTON, W. (Ed.). **Nitrogen fixation**: global perspectives. New York: CAB International, 2002. p. 1-65.
- MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN MANSSON, C. Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of proteobacteria. **Nature**, v. 411, 948-950, 2001.
- MOREIRA, F. M. de S., SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**, 2edição revisada e ampliada, Lavras, Editora UFLA, 2006, 279 p.
- MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J.; PERRIERE, G.; NESME, X. A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 52, p. 573-586, 2001.
- MULLAN, A.; QUINN, J. P.;McGRATH, J. W. Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grow under low-pH conditions. **Microbial Ecology**, v. 44, p. 69-77, 2002.
- MUÑOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane and its effect on plant growth. **Microbial Ecology**, v. 46, p. 454-464, 2003.
- MUÑOZ-ROJAS, J.; FUENTES-RAMÍRES, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strain in culture media and in endophytic association. **FEMS Microbiolgy Ecology**, v. 54, p. 57-66, 2005.
- MUTHUKUMARASAMY, R., REVATHI, G. & LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility Soils**, v. 2, p. 7-14, 2006.
- MUTHUKUMARASAMY, R., GOVINDARAJAN, M; VADIVELU, M.; REVATHI, G. N - fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. In micropopagated sugarcane plants. **Microbiological Research**, v. 161, p. 238-245, 1999.
- NCBI-NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=taxonomy>. Acesso em: 20 jan. 2007.
- NIJHUIS, E. H.; MAAT, M. J.; ZEEGERS, I. W. E.; WAALWIJK, C.; VAN VEEN, J. A. Selection of bacteria suitable for introduction into rhizosphere of grass. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 25, p. 885-895, 1993.
- NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; VARGAS, C.; DA SILVA, F. R.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 24, n. 24, p. 199-206, 2001.
- NOGUEIRA, E. M.; OLIVARES, F. L.; JAPIASSU, J.; VARGAS, C.; VINAGRE, F.; BALDANI, J. I.; HEMERLY, A. S. Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. **Plant Science**, v. 169, n. 5, p. 819-832, 2005.
- NORRIS, D.O.; T'MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 29, p. 214-235, 1964.

- NOVAK, J. Benefits of in vitro “biotization” of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 34, p. 122-130, 1998.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.
- OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Colonização do tecido vascular por *Herbaspirillum* spp. em sorgo e cana-de-acucar. **Fitopatologia Brasileira**, Suplemento, v. 18, p. 313, 1993.
- OLIVARES, F.L.; FERREIRA, F.P.; SILVA, L.G.; FAÇANHA, A.R.; RAMOS, A.C.; NETTO, A.T.; CAMPOSTRINI, E.; REIS, V.M. AND MIGUENS, F.C. Physiological changes induced on the host plant during the endophytic interaction between sugar cane and diazotrophic bacteria 9th **International Symposium on Nitrogen Fixation with non legumes**, Leuven, Belgium, 2002.
- OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, suplemento, p. 59-61, 2003.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂ -fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, n. 205-215, 2002.
- OLIVEIRA, E. **Estudo da associação entre bactérias diazotróficas e arroz**. 1992. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- OLIVEIRA, O. C., ALVES, B. J. R. Cromatógrafo Perkin-Elmer GC Auto System e Integrator PE Nelson modelo 1022: Instruções básicas de uso em análise de redução de acetileno (ARA). Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 16 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 82).
- OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Burning cane: the long term effects. **International Sugar Journal**, v. 96, p. 272-75, 1994.
- OLIVEIRA, S. M. de; MENDES DE SOUZA, M. F.; PERIN, L.; PITARD, R. M.; REIS, V. M.; FARIA, S. M. de; STRALIOTTO, R. Eficiência simbiótica de isolados de beta-proteobactérias do gênero *Burkholderia* spp. em associação com feijão e siratro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23., 2005, Santos. **Resumos...** Santos: SBM, 2005. p. 280.
- ORLANDO-FILHO, J.; HAAG, H. P. e ZAMBELLO, E. Jr. **Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função da idade em solos do estado de São Paulo**, Boletim Técnico número 2, Planalsucar, Piracicaba, São Paulo, p. 128, 1980.
- PALLERONI, N. J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R.; DOUDORON, M. Nucleic acid homologs in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 23, p. 333-339, 1973.
- PEIX, A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELASQUEZ, E. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 1927-1935, 2001.

PELLAEZ ABELLAN, I.; de ARMAS URQUIZA, R.; VALADIER, H.-M.; CHAMPIGNY, M.-L. Short-term effect of nitrate on carbon metabolism of two sugarcane cultivars differing in their biomass production. **Phytochemistry**, v. 36, p. 819-823, 1994.

PERIN, L. **Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)** 2003, 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica.

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

PIÑON, D.; CASAS, M.; BLANCH, M.; FONTANIELLA, B.; BLANCO, Y.; VICENTE, C.; SOLAS, M. T.; LEGAZ, M. E. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont produces a bacteriocin against *Xantomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 345-351, 2001.

POLIDORO, J. C. **O Molibdênio na Nutrição Nitrogenada e na Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio Associada à Cultura da Cana-de-açúcar.** 2001. 115 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica.

RADEMAKER, J. L.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 50, p. 665-677, 2000.

RAMETTE, A.; LIPUMA, J. J.; TIEDJE, J. M. Species Abundance and Diversity of *Burkholderia cepacia* Complex in the Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1193-1201, 2005.

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

REIS JUNIOR, F. B. **Ecologia e diversidade do gênero *Azospirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria* spp.** 2002. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo)- Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

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

REIS, V. M. **Aspectos ecológicos e fisiologia da bactéria fixadora de N₂ *Acetobacter diazotrophicus*.** 1991. 119 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

REIS, V. M. **Estudo de infecção e métodos de detecção da bactéria endófito *Acetobacter diazotrophicus* em associação com a cana-de-açúcar.** 1994. 213 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Biological Dinitrogen Fixation in Gramineae and Palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 19, p. 227-247, 2000.

REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.;

- BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.
- RESENDE, A.S. **Efeito da queima e das aplicações de nitrogênio e vinhaça após 16 anos de cultivo de cana-de-açúcar**. 2003. 120 f. Tese (doutorado) – UFRRJ, Seropédica – RJ.
- RIBEIRO, J. D.; RIBEIRO, M. A. G. de O.; RIBEIRO, A. F. controvérsias na fibrose cística-do pediatra ao especialista. **Jornal de Pediatria**, v. 78, p. 171-186, 2002.
- RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAINO, N.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. B.; MARTNEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5217-5222, 2002.
- ROACH, B. T. E DANIELS, J. A. Review of the origin and improvement of sugar cane. In: **Sugarcane Breeding Workshop**, Copersucar, p. 1-33, 1987.
- RODRIGUES, E. P. **Caracterização fisiológica de estirpes de *Azospirillum amazonense* e avaliação dos efeitos da inoculação em plantas de arroz inundado**. 2004, 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo)- Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- RODRIGUES, L. da S. **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado**. 2003, 94 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo)- Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 275 – 284, 2006.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 415, p. 319-339, 1999.
- ROHLF, F.J. **NTSYS-pc – Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. State University for New York, 1994.
- ROSWALL, T. Nitrogen losses from terrestrial ecosystems: global, regional and local considerations. In: International meet **Global Impacts of Applied Microbiology**, v. 5, p. 17-26, 1979.
- RUSCHEL, A P.; VICTORIA, R. L.; SALATI, E.; HENIS, Y. Nitrogen fixation in sugar cane (*Saccharum officinarum*). In: GRANHALL, V. (Ed.) **Enviromental role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria**. Uppsala: Swedish Natural Science Research Council, p. 297-302, 1978.
- SALLES, J. F.; SOUZA, F. A; VAN ELSAS, I. D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. **Applied and Enviromental Microbiology**. v. 68, p.1595-1603, 2002.
- SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolucionary**, v. 4, p. 406-425, 1987.
- SANTOS, C. C. R. DOS; PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Isolamento de *Gluconacetobacter* spp. em diferentes tipos de solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 85-92, 2006.

- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determinação of bacterially derived auxins using a microplate method. **Latters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 282 – 285, 1995.
- SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D.; PENIDO, E. G. C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and roots. **Inter. J. Syst. Bacteriol.**, v. 34, p. 451-456, 1984.
- SESSITSCH, A.; COENYE, T.; SALLES, J. F.; VAN ELSAS, J. D.; STURZ, A. V.; VANDAMME, P.; AIT BARKA, E.; FAURE, D.; REITER, B.; GLICK, B. R.; WANG-PRUSKI, G.; NOWAK, J. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1187-1192, 2005.
- SILVA FILHO, G. N. **Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo**. 1998, 140 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.
- SOARES-RAMOS, J.R.L.; RAMOS, H.J.O; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S. Comparative molecular analyses of *Herbaspirillum* strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. **Genetics Molecular Biology**. v. 26, p. 537-543, 2003.
- SOUCHIE, E. L. **Microrganismos solubilizadores de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares em leguminosas fixadoras de N₂**. 2004, 122 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- SOUTO, S. M.; DOBEREINER, J. Fixação de N atmosférico por *Beijerinckia* na rizosfera do capim elefante (*Pennisetum purpureum*) “elefante pinda”. In: **Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, v. 11, p. 32-34, 1967.
- STACKEBRANDT, E., FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 52, p. 1043-1047, 2002.
- SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; LAJUDIE, P. de; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. *Methylobacterium* nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 214-220, 2001.
- SYLVESTER-BRADLEY, R.; ASKAWA, N.; LATORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 12, n. 1, p. 12-22, 1982.
- TEJERA, N.; ORTEGA, E.; RODES, R.; LLUCH, C. Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: Some implications in the association with endophytes. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 80-85, 2006.
- TIEDJE, J. M.; ASUMING BREMPONG, S.; NUSSLEIM, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, v. 13, p. 109-122, 1999.
- THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, T. Biodiversity of vibrios. **Microbiol Mol Biol Rev** v. 68, p. 403-431, 2004.

- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL-W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 4673-4680, 1994.
- TRAN VAN, V.; BERGE, O.; KE, S. N.; BALANDREAU, J.; HEULIN, T. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnã. **Plant and Soil**, v. 218, p. 273-284, 2000.
- UEDA, T.; SUGA, Y.; NOBUTAKA, Y.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of a *nifH* genes sequences. **American Society for Microbiology**, v. 177, p. 1414-1417, 1995.
- UEDA, T.; SUGA, Y.; NOBUTAKA, Y.; MATSUGUCHI, T. Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of a *nifH* genes sequences. **American Society for Microbiology**, v. 177, p. 1414-1417, 1995.
- URQUIAGA S., CRUZ K. H. S.; BODDEY R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Sci. Soc. Am. Journal**, v. 56, p. 105-114, 1992.
- URQUIAGA S., JANTALIA, C. P.; RESENDE, A. S. DE; ALVES, B. J. R.; BODDEY R. M. Contribuição da FBN na produtividade dos sistemas agrícolas na América latina. Em: **Processos Biológicos no Sistema Solo-Planta**. Aquino, A. M. de e Assis, R. L. (Editores), Embrapa Agrobiologia, Brasília, DF, 368 p., 2005
- VALVERDE, A, VELÁZQUEZ, E., GUTIÉRREZ, C., CERVANTES, E., VENTOSA, A.; IGUAL, J. M. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Inter. J. System. Evol. Microbiol.** v. 53, p. 1979-1983, 2003.
- VAN BERKUM, P.; EARDLY, B. D. Molecular evolutionary systematics of the *Rhizobiaceae*. In: SPAINK, H. P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. (ed.). **The rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria**. Dordrecht: Kluwer, 1998. p. 1-24.
- VAN BORM, S.; BUSCHINGER, A.; BOOMSMA, J. J.; BILLEN, J. Tetraponera ants have gut symbionts related to nitrogen-fixing root-nodule bacteria. **Proceedings of the Royal Society of London**, Series B-Biological Sciences, London, v. 269, p. 2023-2027, 2002.
- VAN OEVELEN, S.; DE WACHTER, R.; VANDAMME, P.; ROBBRECHT, E.; PRINSEN, E. Identification of the bacterial endosymbionts in leaf galls of *Psychotria* (*Rubiaceae*, *angiosperms*) and proposal of 'Candidatus *Burkholderia kirkii*' sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2023-2027, 2002.
- VAN OEVELEN, S.; DE WACHTER, R.; VANDAMME, P.; ROBBRECHT, E.; PRINSEN, E. 'Candidatus *Burkholderia calva*' and 'Candidatus *Burkholderia nigropunctata*' as leaf gall endosymbionts of African *Psychotria*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2237-2239, 2004.
- VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2285-2289, 2004.

- VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; VOS, DE P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 507-512, 2002a.
- VANDAMME, P.; HENRY, D.; COENYE, T.; NZULA, S.; VANCANNEYT, M.; LI PUMA, J. J. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound test results of new molecular diagnostic tools. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 33, p. 143-149, 2002b.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiol. Rev.**, v. 60, p. 407-438, 1996.
- VARGAS, C.; VINAGRE, F.; NOGUEIRA, E. M.; BALDANI, J. I.; DA SILVA, F. R.; FERREIRA, P. C. G.; PADUA, V. L. M.; HEMERLY, A. S. Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: A genomic approach. **Symbiosis**, v. 35, n. 1-3, p. 159-180, 2003.
- VERMA, S. C.; CHOWDHURY, S. P.; TRIPATHI, A. K. Phylogeny based on 16S rDNA and *nifH* sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica*, in India. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 313-322, 2004.
- VERMIS, K.; BRACHKOVA, M.; VANDAMME, P.; NELIS, H. Isolation of *Burkholderia cepacia* complex genomovars from waters. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 595-600, 2003.
- VIALARD, V.; POIRIER, I.; COURNOYER, B.; HAURAT, J.; WIEBKIN, S.; OPHEL, K.; BALANDREAU, J. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizosferic *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinum*, [*Pseudomonas*] *pyrrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathiei* as *Burkholderia*. **International Journal of Systematic and Microbiology**, v. 48, p. 549-563, 1998.
- VINAGRE, F. S. **Caracterização das respostas de cana-de-açúcar da variedade B4362 à infecção por *Herbaspirillum* spp.** 2001, 68 f. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.
- VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K. D.; JAPIASSU, J.; NOGUEIRA, E. M.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂ fixing endophytic bacteria association. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 3, p. 559-569, 2006.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria.** Oxford: Blackwell, 1970. 164p. (IBM Handbook, nº 15).
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VANDELEE, E.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.4407-4414, 1995.
- WANG, J. Y.; HUANG, X. J.; KAO, J. C. M.; STABNIKOVA, O. Removal of heavy metals from kaolin using an upward electrokinetic soil remedial (UESR) technology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, p. 532-541, 2006.
- WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2277-2285, 2000.
- WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v. 210, p. 103-113, 1999.

- WEBER, O. B.; CORREIA, D.; ROCHA, M. W.; ALVEZ, G. C.; OLIVEIRA, E. M.; SÁ, E. G. Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1419-1426, 2003.
- WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; GILLIS, M. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in *Bradyrhizobium*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 51, p. 623-632, 2001.
- WOESE, C.R Bacterial evolution. **Micribiology Reviews**. v. 5, p. 221-271, 1987
- WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic struture of thr procaryotic domain: the primary kingdoms. **Proceedings ofthe National Academy of Sciences**. v. 74, p. 5088-5090, 1977.
- XAVIER, R. P. **Adubação verde em cana-de-açúcar: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita**. 2002. 98 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- XAVIER, R. P. **Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio na Produção Sustentável da Cultura de Cana-de-Açúcar**. 2006. 87 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of 7 species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 36, p. 1251-1275, 1992.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of 2 *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov. proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1986) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 39, p. 897-904, 1995.
- 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**. Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”. Campinas, SP, 1993.
- YANO, D.M.Y., ATTILI, D.S., GATTI, M.S.V., EGUCHI, S.Y., OLIVEIRA, U. M. **Técnicas de microbiologia em controle de qualidade** - Fundação tropical de pesquisas e tecnologia "André Tosello", Campinas, SP, 1991.
- YOO, S. H.; KIM, B. Y.; WEON, H. Y.; KWON, S. W.; GO, S. J.; STACKEBRANDT, E. *Burkholderia soli* sp. Nov., isolated from soil ultivated with Korean ginseng. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 122-125, 2007.
- YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Philogeny of phototrophic strain BT Ai 1 by plymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA segment. **Journal of Bacteriology**. v. 173, p. 2271-2277, 1991.
- ZHANG, H.; HANADA, S.; SHIGEMATSU, T.; SHIBUYA, K.; KAMAGATA, Y.; KANAGAWA, T.; KURANE, R. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from aquifer polluted with TCE. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 743-749, 2000.
- ZHAO, N.; QU, C.; WANG, E., CHEN, W. Phylogenetic evidence for the transfer of *Pesudomonas cocovenerans* (Vandamme et al., 1960) to the genus *Burkholderia* as *Burkholderia cocovenerans* (Vandamme et al., 1960) comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 600-603, 1995.

ANEXO

Solução salina para diluição

K ₂ HPO ₄	sol. 10%	1,0 ml
MgSO ₄	sol. 10%	0,5 ml
NaCl	sol. 10%	0,2 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O	sol. 10%	0,5 ml
FeEDTA	sol. 1,64%	1,0 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		0,5 ml
Ajustar o pH para 6,5 com solução de ácido sulfúrico 5%		
Completar com água destilada para 1000 ml.		

Solução e micronutrientes para meio de cultura

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,200 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,235 g
H ₃ BO ₃	0,280 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,008 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,024 g
Completar o volume para 200 ml com água destilada.	

Solução de vitaminas

Biotina	10 mg
Piridoxol – HCl	20 mg
Dissolver em banho-maria e completar o volume para 100 ml com água destilada e manter a solução em geladeira.	

Meio JMV

Manitol		5 g
K ₂ HPO ₄	10%	6 ml
KH ₂ PO ₄	10%	18 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	10%	2 ml
NaCl	10%	1 ml
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1%	2 ml
Azul de bromotimol, solução 0,5% em 0,2 N de KOH		2 ml
FeEDTA	sol. 1,64%	4 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml
Extrato de levedura		100 mg
Completar para 1000 ml com água destilada.		
Ajustar o pH para 4,2 – 5,4.		
Adicionar o agar 0,16% para semi-sólido e 2,5% para sólido.		
OBS: Para meio líquido adicionar 10 mM de glutamato de sódio (1,87g/l) (indicador opcional).		

Meio LGI

Sacarose		5 g	
K ₂ HPO ₄	Sol.10%	2 ml	
KH ₂ PO ₄	Sol.10%	6mL	
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sol.10%	2 ml	
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sol. 1%	2 ml	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Sol, 0.1%	2 ml	
FeCl ₃ .6H ₂ O	Sol 1%	1 ml	
Azul de bromotimol	0.5% em 0.2 N de KOH		5 ml
vitamina para meio de cultura		1 ml	
Completar para 1000 ml com H ₂ O destilada.			
Ajustar o pH para 6,0 – 6,2 com H ₂ SO ₄ sol. 5%			
Colocar agar por último.			

Meio Dyg's

Glicose	2,0 g
Ácido málico	2,0 g
Peptona bacteriológica	1,5 g
Extrato de levedura	2,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Ácido glutâmico	1,5 g
Água destilada	1000 ml
pH 6,0 para <i>Herbaspirillum</i> .	
pH 6,0 para <i>Gluconacetobacter</i> (menos ácido málico).	
pH 6,8 para <i>Azospirillum</i> .	

Meio BMGM

Manitol	1g
Ácido málico	2 g
Glicose	1 g
K ₂ HPO ₄ (10%)	4 ml
KH ₂ PO ₄ (10%)	4 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O (10%)	2 ml
CaCl ₂ (10%)	2 ml
NaMoO ₄ (10%)	1 ml
FeCl ₃	0,01 g
Azul de bromotimol, solução 0,5% em 0,2 N de KOH	2 ml
FeEDTA sol. 1,64%	4 ml
Completar para 1000 ml com água destilada.	
Ajustar o pH para 6, 2	
Agar 3 g	

Reagente de Lowry

Solução A: 50 g de Na_2CO_3 em 1000 ml de água destilada, 0,47 M

Solução B: 1 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 1000 ml de água, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,08 M,

Solução C: 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 1000 ml de água destilada, 0,04 M

Juntar 50 ml da solução A, mais 1 ml da solução C e 1 ml da solução B, nesta ordem

TAE 1 X

Acrescentar 20 ml de TAE 50 X a 980 ml de água destilada para ter TAE 1 X.

TAE 50x: Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml

Tampão de amostra

0,25% de azul de bromofenol

40% de sacarose em água

A solução foi esterilizada e estocada a 4 °C

MEIO BAz

Ácido azeláico 0,2%

L-citrulina 0,04%*

K_2HPO_4 0,04%

KH_2PO_4 0,04%

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02%

Azul de bromotimol, solução 5% em 0,2 N de H_2O 2 ml

Completar para 1000 ml com água destilada.

pH 5,7 (com KOH em pastilha)

Colocar ágar 1,8% para sólido e 0,23% para semi-sólido.

*L-citrulina: 0,4g em 100 ml de água destilada e distribuir 20 ml para cada 200 ml do meio. Adicionada ao meio após esterilizado, com aproximadamente 50 °C e filtrada em filtro com membrana de 0,2 μm

SSC 20 X

NaCl	175,3 g
Citrato de sódio	88,2 g
Água	1000 ml

MEIO BSE

Succinato	5,0 g
K_2HPO_4	0,4 g
KH_2PO_4	0,4 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Extrato de levedura	0,5 g

Água destilada 1000 ml
Ajustar pH para 6,5

Revelador kodak D79

Metol 3,5 g
Sulfito de sódio 60,0 g
Hidroquinona 9,0 g
Carbonato de sódio 40,0 g
Brometo de potássio 3,0 g
Aquecer 700 ml de água a 50 °C, colocar os reagentes na sequência e completar para 1000 ml.

Meio GL

Glicose 10,0 g
Extrato de levedura 2,0 g
 K_2HPO_4 (10%)* 50 ml
CaCl (10%)* 100 ml
Água destilada 1000 ml
Agar 15 g
Ajustar pH para 5,8

*Soluções esterilizadas separadamente e adicionadas ao meio para produzir fosfato inorgânico $CaHPO_4$.

TBE 10 X

Tris Base 121 g
Ácido bórico 55,6 g
EDTA 9,3 g
Água 1000 ml

Solução para gel

A: Solução de acrilamida – Bisacrilamida (19:1)

Acrilamida 190 g
Bisacrilamida 10 g
Água 500 ml
Aquecer até no máximo 60 °C
Filtrar em papel de filtro

B: Solução para gel

Uréia 450 g
Solução acrilamida – bisacrilamida 112,5 ml
Colocar no máximo 850 ml de água destilada e aquecer, sob agitação, no máximo a 60 °C
TBE 10 X 100 ml
EDTA (0,5 M, pH 8) 4 ml
Completar para 1000 ml com água destilada e filtrar com papel de filtro

Meio 79

Manitol	10 g
K ₂ HPO ₄ (10%)	1 ml
KH ₂ PO ₄ (10%)	4 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O (10%)	2 ml
NaCl (10%)	1 ml
Extrato de levedura	0,4 g
Azul de bromotimol (0.5%) em 0,2 N de KOH	5 ml
Completar para 1000 ml com H ₂ O destilada	
Ajustar pH com KOH (10%) para 6,8 – 7,0	
Agar, 15 g por litro	

Solução nutritiva para vasos de Leonard

(1) KCL	5,96 g
(2) K ₂ HPO ₄	2,00 g
(3) KH ₂ PO ₄	4,00 g
(4) CaSO ₄ .2H ₂ O	13,76 g
(5) MgSO ₄ .7H ₂ O	19,72 g

(6) CuSO ₄ .5H ₂ O	0,15 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,44 g
MnSO ₄ .2H ₂ O	0,40 g
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,02 g
H ₃ BO ₃	1,43 g

Completar para 1000 ml com H₂O destilada.

(7) FeSO ₄ .7H ₂ O	5,0 g
Ácido Cítrico	5,0 g

Completar para 1000 ml com H₂O destilada.

Para 40 litros de água adicionar: (1), (2),(3) e (5) e dissolver.

Tomar 20 ml da (6) e 40 ml da (7) e adicionar

A (4) é adicionada na hora de usar a solução.

Meio LGI-P

Açúcar cristal	100g
K ₂ HPO ₄ (10%)	2 ml
KH ₂ PO ₄ (10%)	6 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O sol. 10%	2 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O sol. 1%	2 ml
FeCl ₃ .6H ₂ O sol. 1%	1 ml
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O sol. 0,1%	2 ml
Vitamina para meio de cultura	1 ml
Azul de bromotimol, solução 0,5% em 0,2 N de KOH	5 ml
Completar para 1000mL com água destilada.	
Ajustar o pH para 5,5 com ácido acético solução1%. Adicionar agar 0,16% para semi-sólido e 2,5% para sólido.	