

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ANALICE PAULA DE SOUSA CAMPELO

**Caracterização de bactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de arroz
selvagem do Pantanal Sul Matogrossense**

Campo Grande – MS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

ANALICE PAULA DE SOUSA CAMPELO

**Caracterização de bactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de arroz
selvagem do Pantanal Sul Matogrossense**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Gecele Matos Paggi – UFMS/CPAN

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Marivaine da Silva Brasil – UFMS/CPAN

Campo Grande – MS

2018

AGRADECIMENTOS

A orientadora Prof.^a Dr.^a Gecele Matos Paggi pela orientação neste trabalho.

A co-orientadora Prof.^a Dr.^a Marivaine da Silva Brasil prontidão em me orientar, pela paciência e ensinamentos.

A Universidade Federal Mato Grosso do Sul e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

Aos professores e colaboradores do mestrado em Biologia Vegetal pelo auxílio na formação.

A Embrapa Agrobiologia pela estrutura para execução da pesquisa e em especial ao Dr. José Ivo Baldani pela colaboração e orientação a este trabalho.

Ao laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia pela estrutura e colaboração dos colegas e técnicos em especial a Nathália Virgínia da S. Ribeiro.

Ao Laboratório de Genética e também ao de Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, *Campus* do Pantanal pela estrutura e a colaboração dos colegas de laboratórios e técnicos.

A Capes pelo subsídio financeiro, por meio de bolsa de estudos.

A toda minha família, em especial a minha mãe Antonia Maria de Sousa, a meu companheiro Silvio do Nascimento Campelo e ao meu filho Daniel de Sousa Campelo pelo respeito, amor, carinho e incentivo.

Aos meus colegas do curso de pós-graduação pela compainha e força na caminhada do mestrado.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram no desenvolvimento e finalização deste trabalho.

A banca examinadora.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	5
1.1. Importância do arroz.....	5
1.2. Caracterização das espécies de arroz em estudo.....	6
1.3. Associação bactérias diazotróficas com arroz.....	7
1.4. Promoção de Crescimento Vegetal.....	8
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo geral.....	11
2.2. Objetivos específicos.....	11
3. CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL ISOLADAS DE ARROZ SELVAGEM DO PANTANAL SUL MATOGROSSENSE.....	12
3.1 Resumo.....	14
3.2 Introdução.....	15
3.3 Material e Métodos.....	17
3.4 Resultados.....	23
3.5 Discussão.....	28
3.6 Agradecimentos.....	34
3.7 Referências Bibliográficas.....	34
3.8 Anexos.....	58
4. Considerações Finais.....	66
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

RESUMO

No Brasil os estudos relacionados à interação de bactérias fixadoras de nitrogênio com gramíneas ainda precisam ser explorados no que tange ao conhecimento da interação dessas bactérias em espécies de plantas nativas. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi registrar a ocorrência e identificar bactérias diazotróficas associadas à *Oryza latifolia* e *O. glumaepatula*, e verificar a sua habilidade para a promoção de crescimento vegetal. Foram coletadas amostras das plantas de estudo na fase de floração, em triplicata. As coletas foram realizadas na margem esquerda do Rio Paraguai em duas áreas. Para a avaliação da ocorrência e número de bactérias diazotróficas nas raízes das plantas foi usado o método do número mais provável usando o meio BMGM sem nitrogênio. Após o crescimento positivo os frascos das maiores diluições positivas foram repicados sucessivamente para meios semissólidos e sólidos semi-específicos (NFb/LGI/JNFb/JMV). A diversidade dos isolados foi avaliada por Box-PCR e os perfis dos amplicons gerados de cada isolado foram agrupados pelo método UPGMA. Características funcionais relacionadas ao potencial biotecnológico dos isolados foram avaliadas: atividade celulolítica, proteolítica, amilolítica, produção de sideróforo e ácido indol acético (AIA) e, solubilização de fosfato de cálcio e zinco. O sequenciamento do gene 16S rRNA para construção da árvore filogenética foi realizado utilizando o cálculo do algoritmo *Neighbor-Joining*. Foram selecionados 33 isolados para o experimento de inoculação em casa de vegetação com as duas espécies de arroz, avaliadas para o acúmulo de biomassa fresca e a massa seca aos 52 dias após a semeadura. As duas espécies de arroz selvagem apresentaram elevado número de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas às suas raízes nas duas áreas de coleta: *Oryza latifolia* (Serra do Amolar: $1,55 \times 10^7$ e Corixo Bracinho: $1,71 \times 10^7$ bactérias/g de raiz) e *O. glumaepatula* ($1,01 \times 10^7$ e $0,68 \times 10^7$ bactérias/g de raiz). Foram isoladas um total de 201 bactérias diazotróficas nas duas espécies de arroz. Os isolados bacterianos apresentaram alta diversidade fenotípica e genotípica. Do total, 80% apresentaram algum tipo de atividade enzimática, 66% proteolítica, 21% amilolítica, 16% celulolítica; a produção de siderofóros foi observada em 55% dos isolados, e 40% dos isolados apresentaram produção de (AIA), sendo a solubilização de fosfato de cálcio e zinco observada em 52% e 50% dos isolados, respectivamente. Foram identificados isolados pertencentes aos gêneros: *Pantoea*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* e *Bacillus*. Em *Oryza latifolia*, os tratamentos com os isolados 110CAL, 153CAL e 59CAL aumentaram em até 59% o peso da massa fresca; e com o isolado 110CAL houve um aumento de até 214% de massa seca. Já em *O. glumaepatula*, o tratamento com o isolado 180CAG aumentou em até 54% o peso de massa fresca; e com os isolados 180CAG, 132CAG e 163CAG houve um aumento de até 266% de massa seca. Os tratamentos com os isolados 110CAL e 180CAG do gênero *Pantoea*, se destacaram por aumentarem tanto massa fresca, quanto a massa seca em *Oryza latifolia* e *O. glumaepatula*, respectivamente. Assim os isolados que apresentaram características funcionais relacionadas ao potencial biotecnológico podem possivelmente estimular o crescimento vegetal nas plantas nas duas espécies de arroz selvagem.

Palavras-chave: *Oryza latifolia*, *Oryza glumaepatula*, FBN, Box-PCR.

ABSTRACT

In Brazil, the studies related to the interaction of nitrogen fixing bacteria with grasses still need to be explored regarding the interaction of these bacteria in native plant species. Therefore, the objective of this work was to record the occurrence and to identify diazotrophic bacteria associated with *Oryza latifolia* and *O. glumaepatula*, and verify its ability to promote plant growth. Samples were collected from the study plants in the flowering phase, in triplicate. The collections were carried out on the left bank of the Paraguay River in two areas. For the evaluation of the occurrence and number of diazotrophic bacteria in the roots of the plants the most probable number method was used using the BMGM medium without nitrogen. After the positive growth, the vials of the highest positive dilutions were successively repeated for semi-solid and semi-solid media (NFb / LGI / JNFb / JMV). The diversity of the isolates was evaluated by Box-PCR and the profiles of the amplicons generated from each isolate were grouped by the UPGMA method. Functional characteristics related to the biotechnological potential of the isolates were evaluated: cellulolytic activity, proteolytic, amylolytic, siderophore and indole acetic acid (AIA) and solubilization of calcium phosphate and zinc. Sequencing of the 16S rRNA gene for phylogenetic tree construction was performed using the *Neighbor-Joining* algorithm. 33 isolates were selected for the inoculation experiment in greenhouse with the two rice species, evaluated for the increase of fresh biomass and the dry mass at 52 days after sowing. The two wild rice species showed a high number of nitrogen-fixing bacteria associated with their roots in the two collection areas: *Oryza latifolia* (Serra do Amolar: 1.55×10^7 and Corixo Bracinho: 1.71×10^7 bacteria / g root) and *O. glumaepatula* (1.01×10^7 and 0.68×10^7 bacteria / g root). A total of 201 diazotrophic bacteria were isolated in the two rice species. The bacterial isolates presented high phenotypic and genotypic diversity. Of the total, 80% presented some type of enzymatic activity, 66% proteolytic, 21% amylolytic, 16% cellulolytic; the production of siderophores was observed in 55% of the isolates, and 40% of the isolates presented AIA production. The calcium and zinc phosphate solubilization was observed in 52% and 50% of the isolates, respectively. Isolates belonging to the genera *Pantoea*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* and *Bacillus* were identified. In *Oryza latifolia*, treatments with the isolates 110CAL, 153CAL and 59CAL increased up to 59% the weight of the fresh mass; and with the 110CAL isolate there was an increase of up to 214% in dry mass. In *O. glumaepatula*, the treatment with the 180CAG isolate increased by up to 54% of fresh weight; and with the isolates 180CAG, 132CAG and 163CAG there was an increase of up to 266% of dry mass. The treatments with the isolates 110CAL and 180CAG of the genus *Pantoea*, were distinguished by increase both fresh mass and dry mass in *Oryza latifolia* and *O. glumaepatula*, respectively. Thus the isolates that presented functional characteristics related to the biotechnological potential may possibly stimulate plant growth in the plants in the two wild rice species.

Keywords: *Oryza latifolia*, *Oryza glumaepatula*, FBN, Box-PCR

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância do Arroz

O arroz é uma monocotiledônea pertencente à família Poaceae (Barnhart), e ao gênero *Oryza* L. (Chang, 1976). O gênero *Oryza* L. é composto por duas espécies de arroz cultivadas asiática (*O. sativa*) e africana (*O. glaberrima* Steud.) e 21 espécies selvagens (Khush, 1997). Dessas nove espécies nativas são tretapóides. Dentre essas espécies *O. latifolia*, *O. alta* e *O. grandiglumis* têm genoma (CCDD, $2n = 48$), encontradas apenas na América do Sul (Harland, 1971; Buso, 1998). Já as espécies cultivadas de arroz asiática (*O. sativa*) e africana (*O. glaberrima* Steud.) e outras seis espécies selvagens (*O. rufipogon* Griff., *O. nivara* Sharma & Shastri, *O. barthii* A. Chev, *O. longistaminata* A. Chev. & Roehr., *O. glumaepatula* Steud. e *O. meridionalis* Ng) são categorizadas como espécies diplóides genoma AA (Khush, 1997).

A ampla adaptabilidade do arroz, aliada à sua habilidade de produzir em diversas regiões e ao continuado esforço da pesquisa em todo o mundo, assegura que o seu grão seja um produto amplamente consumido pelo homem (Terres *et al.*, 2004). A espécie *Oryza sativa* L., é um dos cereais mais cultivados e importantes para a alimentação humana, sendo superado apenas pelo trigo. É um dos cereais que se caracteriza como principal alimento de mais da metade da população mundial, e é a base da alimentação brasileira a qual consome cerca de 25kg de arroz por ano (Brasil, 2015).

O arroz é uma excelente fonte de energia, devido à alta concentração de amido, fornecendo também proteínas, vitaminas e minerais, além de possuir baixo teor de lipídios (Kennedy *et al.*, 2002), contribuindo assim na alimentação diária da população mundial, especialmente de países em desenvolvimento (Santos *et al.*, 2006). Este grão fornece em média, 715 kcal per capita por dia, 27% dos carboidratos, 20% das proteínas e 3% dos lipídios da alimentação. No Brasil, o consumo per capita é de 108g por dia, fornecendo 14% dos carboidratos, 10% das proteínas e 0,8% dos lipídios da dieta (Kennedy *et al.*, 2002).

O maior produtor mundial de arroz é a China, representando aproximadamente 30% da produção mundial, seguido da Índia e Indonésia (USDA, 2016). O Brasil é um dos maiores produtores de arroz da América Latina (Embrapa, 2016), sendo o nono maior produtor do mundo (FAO, 2016). O Mercosul é o nono maior produtor mundial de arroz e 75% dessa produção é brasileira (USDA, 2016). No Centro-Oeste, terceira maior região produtora, predomina o cultivo em sequeiro (CONAB, 2017). O grande aumento

na produção deste cereal tem estimulado a procura de alternativas que produzam menor impacto ambiental e aumento no rendimento desta cultura, de forma a reduzir seu custo de produção e aumentar a produtividade (Chouldhury & Kennedy, 2004).

1.2 Caracterização das espécies *Oryza glumaepatula* e *O. latifolia*

No Brasil são encontradas quatro espécies silvestres de arroz, *Oryza alta* Swallen, *O. grandiglumis* Döll, *O. latifolia* Desv. e *O. glumaepatula* Steud. Segundo Pott e Pott (2000), *O. alta* tem uma ampla distribuição, incluindo a parte oriental da bacia Amazônica, algumas pequenas bacias no Nordeste do Brasil e alguns locais na Floresta Tropical Atlântica, nos estados do Sudeste; *O. grandiglumis* só é encontrada na parte oeste da Amazônia e nas bacias hidrográficas dos rios Solimões, Negro, Japurá, Purus e Madeira; *O. latifolia* e *O. glumaepatula* ocorrem em áreas extensas da planície de inundação do rio Paraguai e têm ampla distribuição desde o México até o Paraguai e Brasil, principalmente na Amazônia e Pantanal.

Oryza glumaepatula é uma espécie perene, com hábito de crescimento em forma de touceiras, com panículas abertas, espiguetas com cerca de 6,6 a 11 mm de comprimento e 1,9 a 2,5 de largura, com aristas de 6 a 16 cm de comprimento e anteras geralmente de 2 a 5 mm de comprimento ocupando 3/4 da espiguetas (Irri, 2005). Na região amazônica é observado que seu crescimento pode atingir uma média de 3,0 m fora da lâmina da água e uma profundidade de 2,7 a 2,8 m (Rubim, 1994). Essa espécie tem ampla distribuição, e está localizada em todas as regiões onde outras três espécies ocorrem (Rubim, 1995; Sindarro, 2000; Prochnow, 2002).

A espécie *Oryza latifolia* (*latis*- largo e *folium*- folha, alusão à grande largura da folha em relação a outras espécies do gênero) é classificada como erva aquática emergente (Pott & Pott, 2000), tolerante à inundação e tem vasta ocorrência nos campos inundáveis do Pantanal (Bertazzoni & Damasceno-Júnior, 2011). É caracterizada por ser uma espécie perene, estival, sem rizomas, chegando até a 6,5 m de comprimento (em época de cheia), com panícula típica laxa, presença de lígula membranosa, aurículas pilosas vistosas, lema com arista apical, fruto do tipo cariopse. Seu crescimento varia de acordo com a sazonalidade do Pantanal, sendo que o período reprodutivo é concentrado em uma pequena faixa de tempo, entre os meses de maio e junho, coincidindo com o início da vazante do rio (Bertazzoni & Damasceno-Júnior, 2011).

Estudos de Pott e Pott (2000) apontam o potencial de aproveitamento de *O. latifolia* e *O. glumaepatula*, como alimento para ribeirinhos, bovinos, equinos, suínos,

bem como mais uma fonte de alimento para de herbívoros silvestres do Pantanal. Enrich-Prast (1998) estudou a utilização de *O. glumaepatula* na aceleração da recuperação de algumas regiões da área impactada por rejeito de bauxita no lago Batata na Amazônia, demonstrando sua importância também para recuperação de áreas degradadas. Além disso, essas espécies têm sido usadas em estudos de melhoramento genético de espécies cultivadas, como a *O. sativa* (Morais *et al.*, 2006).

Vale ressaltar que os valores nutricionais encontrados em espécies arroz nativas são maiores quando comparados ao *Oryza sativa*. Em estudos com a espécie de arroz nativo *Oryza latifolia*, foi observada qualidade nutricional com elevado teor de proteínas e carboidratos, maiores que a espécie *O. sativa* (Pascual, 2009; Daniel, 2012).

1.3 Associação de bactérias diazotróficas com plantas de arroz

Nos países da região tropical, o nitrogênio é o principal elementolimitante da cultura do arroz, que interfere no seu crescimento e na produtividade (Fageria & Stone, 2003). A fixação biológica de N₂ da atmosfera (FBN) é responsável pela incorporação do N atmosférico em sistemas naturais e agrícolas, talvez sendo o processo microbiano relacionado à agricultura mais bem estudado e explorado tecnologicamente (Santos *et al.*, 2008). De todo o nitrogênio sintético utilizado para a produção das culturas, apenas 50% do nitrogênio aplicado é absorvido pelas plantas, o restante é perdido no sistema solo-planta-atmosfera, elevando os custos de produção, causando efeitos negativos ao meio ambiente, como acidificação de solos cultiváveis, contaminação das águas superficiais e do lençol freático, devido à mobilidade no solo, através do fluxo de massa e perdas por volatilização, desnitrificação e lixiviação (Videira, 2009). Além disso, o uso de fertilizantes nitrogenados em excesso para suprir essa carência pode resultar em impacto negativo ambiental (Biswas *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2004).

Uma das alternativas para reverter o quadro de impacto ambiental provocado pela adubação na cultura do arroz é o uso de bactérias que se associam a essa planta e fazem a FBN, estas bactérias são denominadas diazotróficas. Nesse processo, mediado pelas bactérias, há a conversão de N₂, um gás inerte presente em grande quantidade na atmosfera, em NH₃. Essa ação fornece compostos nitrogenados diretamente para as plantas por meio de associações, ou quando os organismos morrem e os liberam no ambiente, fornecendo o nitrogênio necessário para o desenvolvimento vegetal (Lindermann & Glover, 2003).

Estudos relatam que as bactérias diazotróficas dos gêneros *Burkholderia* sp. e *Herbaspirillum seropedicae*, quando inoculadas em arroz promoveram aumento de até 54% na produção de grãos (Guimarães *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2011). É importante salientar que as taxas de fixação biológica de nitrogênio são condicionadas a abundância e diversidade de bactérias diazotróficas e de sua distribuição espacial (Reed *et al.*, 2008).

Outras pesquisas relatam a associação de várias espécies de bactérias diazotróficas com espécies de arroz como: *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* e *Nitrospirillum* sp. (Baldani *et al.*, 1997; Cardoso *et al.*, 2010), *A. amazonense* (Baldani, 1984, Cardoso *et al.*, 2010), *A. irakense* (Khammas *et al.*, 1989), *A. oryzae* (Cheng-Hui & Yokota, 2005), *Herbaspirillum* sp. (Rodrigues *et al.*, 2006), *Azoarcus* sp. (Engelhard *et al.*, 2000), *Sphingomonas* sp. (Videira *et al.*, 2009), *Enterobacter* sp. (Souza *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2013), *Pseudomonas* sp. (Verma *et al.*, 2001), *Burkholderia* sp. (Rodrigues *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2013) e *Pantoea* sp. (Costa *et al.*, 2013; Megías *et al.*, 2017). E diversos microrganismos fixadores de nitrogênio foram isolados da rizosfera de plantas de arroz cultivadas em condições de sequeiro e irrigado (Baldani, 1997), como as espécies de *Azospirillum* sp. (Baldani & Döbereiner, 1980), *Klebsiela* sp. (Ladha *et al.*, 1982) e *Alcaligenes* sp. (You & Zhou, 1989).

1.4 Promoção do crescimento vegetal

Além da fixação biológica de nitrogênio, as bactérias diazotróficas exercem outros efeitos benéficos para a planta hospedeira como a estimulação do crescimento das plantas por produção de hormônios (Peng *et al.*, 2002; Guimarães & Baldani, 2013), principalmente auxinas, que estimulam o crescimento das plantas (Boiero *et al.*, 2007). O ácido indolacético (AIA) é produzido por diversos micro-organismos incluindo as bactérias e é um dos mais importantes fitormônios capaz de coordenar diferentes processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Khalid *et al.*, 2004; Ahemad & Kibret, 2014). A produção deste fitormônio já foi relatada em *Azospirillum* sp., *Herbaspirillum* sp. (Mariosa, 2014), *Pseudomonas* sp. (Oliveira, 2015; Peñafiel-Jaramillo *et al.*, 2016 e Li *et al.*, 2017), *Pantoea* sp. (Souza *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2016), *Bacillus* sp. (Pedrinho *et al.*, 2010; Araújo & Guerreiro, 2010; Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2014), *Burkholderia* sp. (Souza *et al.*, 2013; Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2014) e *Enterobacter* sp. (Shoebitz *et al.*, 2009 Souza *et al.*, 2013).

Além disso, essas bactérias podem estimular o crescimento das plantas pelo aumento na atividade de nitrato redutase (Cassán *et al.*, 2008), e solubilização de fosfato (Marra *et al.*, 2012), podendo ainda aumentar a velocidade da germinação, quando inoculadas nas sementes de arroz (Araújo *et al.*, 2010). Diversas bactérias foram identificadas como solubilizadores de fosfato inorgânico *Bacillus* sp., *Achromobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Micrococcus* sp., *Aerobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Erwinia* sp. (Rodrigues & Fraga, 1999), *Azospirillum* sp. (Hungria *et al.*, 2010), *Herbaspirillum* sp. e *Burkholderia* sp. (Estrada *et al.*, 2013), dentre outras.

Outra atividade que estimula o crescimento de plantas é a captação de ferro via sideróforo disponibilizando nutrientes ou auxiliando no biocontrole de patógenos (Beneduzi *et al.*, 2013). Esta atividade já foi registrada em *Azospirillum* sp. (Novakowski *et al.*, 2011), *Burkholderia* sp. (Jiang *et al.* 2008), *Pseudomonas* sp. (Fagotti, 2012; Souza *et al.*, 2013), *Pantoea* sp. (Luz, 2001; Fagotti, 2012), *Enterobacter* sp., *Sphingomonas* sp. (Loaces *et al.*, 2011) e *Bacillus* sp. (Fagotti, 2012; Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2014).

Bactérias diazotróficas também degradam celulose, um polímero mais abundante na natureza e importante fonte de energia do solo (Kansoh *et al.*, 1999). A celulose não é encontrada na sua forma pura no solo, sendo necessários outros grupos de microrganismos na ciclagem da matéria orgânica, como os microrganismos amilolíticos, proteolíticos e transformadores de N, acelerando a decomposição de matéria orgânica presente no solo (Coelho e França, 1995). Além disso, a atividade celulolítica dos isolados bacterianos pode estar relacionada com a capacidade de penetração nas plantas, apresentando assim um importante papel ecológico na interação com plantas (Cho *et al.*, 2007). Bactérias diazotróficas já foram descritas como capazes de degradar celulose, entre elas estão: *Bacillus* sp. (Cho *et al.*, 2007), *Azoarcus* sp. (Reinhold-Hurek *et al.*, 1993), *Enterobacter* sp. e *Pantoea* sp. (Rodrigues *et al.*, 2016), *Stenophomonas* sp. (Yan *et al.*, 2008), *Burkholderia* sp. e *Stenophomonas* sp. (Szilagyi-Zecchin *et al.*, 2014).

Já a atividade amilolítica foi registrada em diazotróficas como *Bacillus* sp. (Castro *et al.*, 2014), *Azospirillum* sp. (Ningsih *et al.*, 2010), *Herbaspirillum seropedicae* (Jesus *et al.*, 2013), *Bacillus coagulans*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* e *Pseudomonas stutzeri* (Carrim *et al.*, 2006).

A produção de protease pode estar relacionada na atividade antagonística contra os fungos e bactérias patogênicas, em estudo com *B. subtilis* avaliaram o controle

biológico desta estirpe contra fungos de importância econômica em casa de vegetação (Basurto-Cadena *et al.* 2011). Outros estudos já descreveram bactérias diazotróficas produtoras de protease, como espécies de *Bacillus* sp. (Beg & Gupta, 2003), *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas* sp. e *Streptomyces* sp. (Thangam & Rajkumar, 2000).

No Brasil os estudos relacionados à interação de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas é bem consolidado, sendo que atualmente há formulações de inoculantes com bactérias diazotróficas que são recomendadas para trigo, milho e braquiárias (Silva *et al.*, 2009; Hungria *et al.*, 2010 e 2016; Megías *et al.*, 2017). Em estudo com bactérias diazotróficas oriundos de arroz cultivado (*Oryza sativa* L.), Estrada *et al.*, (2013) demonstrou que bactérias diazotróficas solubilizadoras de fósforo inorgânico, independente da fonte de fósforo utilizada, aumentaram a produção de grãos e a sua qualidade, as estirpes testadas em casa de vegetação apresentaram potencial de uso como biofertilizantes para experimentação e seleção a campo.

Apesar das muitas pesquisas baseadas nessa interação, há pouco conhecimento da associação dessas bactérias em espécies de plantas nativas. Alguns estudos mostram a ampla interação bacteriana em isolados de gramíneas nativas, com *Oryza glumaepatula* no Amazonas (Fernandes-Júnior *et al.*, 2013) e com *Tripogon spicatus* na Caatinga (Fernandes-Júnior *et al.*, 2015).

O presente estudo contribuirá para ampliar o conhecimento de bactérias diazotróficas associadas às raízes das espécies de arroz selvagem *Oryza glumaepatula* e *O. latifolia* encontradas às margens do Rio Paraguai que banha o Pantanal Sul Matogrossense. Em adição, serão obtidas informações sobre a interação planta/microrganismos e potencial de promoção de crescimento vegetal como uma alternativa de uso biotecnológico sustentável para o manejo de plantas nativas na região do Pantanal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar e Caracterizar bactérias promotoras de crescimento vegetal associada a duas espécies de arroz selvagem do Pantanal.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a população de bactérias diazotróficas cultiváveis associadas à *Oryza latifolia* e *O. glumaepatula*;
- Isolar e caracterizar fenotipicamente as bactérias diazotróficas isoladas de ambas as espécies;
- Avaliar a diversidade dos isolados bacterianos diazotróficos;
- Classificar taxonômicamente as bactérias isoladas;
- Avaliar características biotecnológicas dos isolados;
- Avaliar a promoção de crescimento vegetal proporcionada pela inoculação dos isolados bacterianos em plantas de arroz das espécies estudadas.

3. Artigo

Caracterização de bactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de arroz selvagem do Pantanal Sul Matogrossense

Artigo a ser submetido à revista Plant and Soil

Caracterização de bactérias promotoras de crescimento vegetal isoladas de arroz selvagem do Pantanal Sul Matogrossense

**Analice Paula de Sousa Campelo^{1,2}, José Ivo Baldani³, Gecele Matos Paggi^{1, 2, 4},
Marivaine da Silva Brasil^{2, 4}**

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biociências,
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CEP 79070-900, Campo Grande, MS,
Brasil

²Laboratório de Microrganismos, Ciências Biológicas, *Campus* do Pantanal,
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CEP 79304-902, Corumbá, MS, Brasil

³Embrapa Agrobiologia, CEP 23890-000, Seropédica, RJ, Brasil

⁴Laboratório de Genética, Ciências Biológicas, *Campus* do Pantanal, Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, CEP 79304-902, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil

*E-mail para correspondência: marivaine.brasil@ufms.br.

Abstract

Aims Record the occurrence, identify and verify the plant growth promotion of nitrogen fixing bacteria (BNF) associated to *Oryza latifolia* and *O. glumaepatula*.

Methods: The BFN number of roots: most likely number, BMGM medium. The 16S rRNA sequencing for phylogenetic tree (Neighbor-Joining). The characteristics biotechnological analysed were: cellulolytic, proteolytic, amylolytic activities, siderophore production, Indol acetic acid (AIA) and solubilization of calcium inorganic and zinc oxide. Thirthy isolates were selected for the greenhouse inoculation experiment containing, (substrate: sand, vermiculite and commercial vegetable substrate).

Results BFN number: *O. latifolia* (1.55×10^7 and 1.71×10^7 bacteria/g root) and *O. glumaepatula* (1.01×10^7 and 0.68×10^7 bacteria/g root). In total, 201 FBN were isolated. 66% proteolytic activity 21%, amylolytic 16%, siderophores 55%, 40% AIA production, solubilizing calcium phosphate 52% and 50% zinc. Identified genera: *Pantoea*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* and *Bacillus*. The inoculation of isolate 110 CAL in *O. latifolia* increased up to 59% the fresh biomass the increased 214% the dry masss. In of *O. glumaepatula* the inoculation of isolate 180 CAG increased up to 54% the fresh biomass the increased 260% the dry masss.

Conclusions Thus the isolates that presented functional characteristics related to the biotechnological potential may possibly stimulate plant growth in the plants in the two wild rice species.

Keywords *Oryza latifolia*, *Oryza glumaepatula*, FBN, Box-PCR

Nomenclatura

AIA Ácido Indol Acético

DNA ácido desoxirribonucleico

FBN Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

IE índices enzimáticos

PCR reação em cadeia da polimerase

RNAr RNA ribossômico

Introdução

Oryza sativa L. é um dos cereais mais cultivados e importantes para a alimentação humana (Brasil 2015). No Brasil são encontradas quatro espécies silvestres de arroz, *Oryza alta* Swallen, *O. grandiglumis* Döll, *O. latifolia* Desv. e *O. glumaepatula* Steud.). As espécies *O. latifolia* e *O. glumaepatula* ocorrem em áreas extensas da planície de inundação do rio Paraguai e têm ampla distribuição desde o México até o Paraguai e Brasil, principalmente na Amazônia e Pantanal (Pott e Pott, 2000).

Porém, nos países da região tropical, o nitrogênio é o principal nutriente limitante da cultura do arroz, que interfere no seu crescimento e na produtividade (Fageria e Stone 2003). O uso de fertilizantes nitrogenados pode ser uma alternativa para suprir essa carência; no entanto, seu uso em excesso pode resultar em impacto ambiental (Biswas et al. 2000; Kennedy et al. 2004). Uma das alternativas para reverter este quadro é a Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), utilizando bactérias denominadas diazotróficas (Guimarães e Baldani 2013).

Estudos relatam que as bactérias diazotróficas dos gêneros *Burkholderia* e *Herbaspirillum seropedicae*, quando inoculadas em arroz promoveram aumento de até 54% na produção de grãos (Ferreira et al. 2011; Guimarães et al. 2007). Outras pesquisas relatam a associação de diferentes espécies de bactérias diazotróficas com espécies de arroz como: *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* (Baldani et al. 1997; Cardoso et al. 2010), *A. amazonense* (Baldani 1984, Cardoso et al. 2010), *A. irakense* (Khammas et al. 1989), *A. oryzae* (Cheng-Hui e Yokota 2005), *Herbaspirillum* sp. (Rodrigues et al. 2006), *Azoarcus* sp. (Engelhard et al. 2000), *Sphingomonas* sp. (Videira et al. 2009), *Enterobacter* sp. (Costa et al. 2013; Souza et al. 2013), *Pseudomonas* sp. (Verma et al. 2001), *Burkholderia* sp. (Costa et al. 2013; Rodrigues et al. 2006) e *Pantoea* sp. (Costa et al. 2013; Megías et al. 2017).

Além da fixação biológica de nitrogênio, as bactérias diazotróficas exercem outros efeitos benéficos para a planta hospedeira como a estimulação do crescimento das plantas pela produção de hormônios (Guimarães e Baldani 2013; Peng et al. 2002), principalmente auxinas, que estimulam o crescimento das plantas (Rodrigues 2001). Sendo um dos mais importantes, o ácido indolacético (AIA), por coordenar diferentes processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Ahemad e Kibret 2014; Khalid et al. 2004).

Foram propostas alguns mecanismos de ação relacionados ao aumento do crescimento em plantas associadas às bactérias diazotróficas. Um deles é através da solubilização de fosfato (Araújo et al. 2010; Estrada et al. 2013; Hungria et al. 2010; Marra et al. 2012) e a captação de ferro via sideróforo disponibilizando nutrientes ou auxiliando no biocontrole de patógenos (Beneduzi et al. 2013; Fagotti 2012; Luz 2001; Loaces et al. 2011; Szilagyi-Zecchin et al. 2014; Novakowski et al. 2011; Souza et al. 2013).

Além da atividade amilolítica já foi registrada em diazotróficas (Castro et al. 2014; Carrim et al. 2006; Jesus et al. 2013; Ningsih et al. 2010). E a produção de protease pode estar relacionada na atividade antagonística contra os fungos e bactérias patogênicas (Basurto-Cadena et al. 2011; Beg e Gupta 2003; Thangam e Rajkumar 2000). E a atividade celulolítica dos isolados bacterianos pode estar envolvida com capacidade de penetração nas plantas, apresentando assim um importante papel ecológico na interação com plantas (Cho et al. 2007; Szilagyi-Zecchin et al. 2014; Rodrigues et al. 2016; Yan et al. 2008).

No Brasil os estudos relacionados à interação de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas é bem consolidado, sendo que atualmente há formulações de inoculantes com bactérias diazotróficas que são recomendadas para trigo, milho e braquiária (Silva et al. 2009; Hungria et al. 2010 e 2016; Megías et al. 2017). Apesar das muitas pesquisas baseadas nessa interação, há pouco conhecimento da associação dessas bactérias em espécies de plantas nativas. Alguns estudos mostram a ampla interação bacteriana em isolados de gramíneas nativas, com *Oryza glumaepatula* no Amazonas (Fernandes-Júnior et al. 2013) e com *Tripogon spicatus* na Caatinga (Fernandes-Júnior et al. 2015). Em estudo com bactérias diazotróficas oriundos de arroz cultivado (*Oryza sativa* L.), Estrada et al. (2013) demonstrou que bactérias diazotróficas solubilizadoras de fósforo inorgânico, independente da fonte de fósforo utilizada, aumentaram a produção de grãos e a sua qualidade, as estirpes testadas em casa de vegetação apresentaram potencial de uso como biofertilizantes para experimentação e seleção a campo.

Diante do exposto o objetivo desse trabalho foi registrar a ocorrência e identificar bactérias diazotróficas associadas à *Oryza latifolia* e *O. glumaepatula*, e verificar o potencial de promoção de crescimento vegetal dos isolados obtidos. Assim, este estudo contribuirá para ampliar o conhecimento de bactérias diazotróficas associadas às raízes das espécies de arroz selvagem *Oryza glumaepatula* e *O. latifolia*

encontradas às margens do Rio Paraguai que banha o Pantanal Sul Matogrossense. Em adição, serão obtidas informações sobre a interação planta/microrganismos e potencial de promoção de crescimento vegetal como uma alternativa de uso biotecnológico sustentável para o manejo de plantas nativas na região do Pantanal.

Material e métodos

Amostragens das plantas no Pantanal

As amostras de arroz silvestre das espécies *Oryza latifolia* e *O. glumaepatula*, foram coletadas em triplicata em cada ponto, os indivíduos inteiros, durante a fase de floração. As coletas foram realizadas na margem esquerda do Rio Paraguai em seis pontos distribuídos em duas áreas de campo inundado: 1- Serra do Amolar (18°1'35,53"S 57°28'53,34"O; 18°12'06,4"S 57°28'34,9"O e 18°00'59,18"S 57°29'10,29"O) e 2- Corixo Bracinho (19°00'8,9"S 57°33'10,3"O; e 18°58'49,3"S, 57°33'5,8"O e 18°57'44,0"S e 57°37'4,7"O) em Corumbá, MS (Figura 1).

Levantamento da ocorrência e isolamento de bactérias diazotróficas

As amostras de plantas de cada espécie de arroz, foram separadas em parte aérea e sistema radicular, para avaliação da ocorrência de bactérias diazotróficas nas raízes das plantas, segundo a metodologia proposta por Baldani et al. (2014). As raízes foram lavadas em água corrente, 1g de raiz foi pesado e macerado em solução salina (0,5%) e diluída serialmente até 10^{-6} . Uma alíquota de 1mL dessas diluições foi transferida para o meio semissólido isento de nitrogênio BMGM (com glicose, manitol e ácido málico) (Estrada de Los Santos et al. 2001) e incubada por 7 dias a 30°C. Após esse período o crescimento positivo de bactérias diazotróficas foi avaliado pela presença de uma película em forma de véu. O resultado da contagem do número mais provável (NMP) foi analisado no Teste *t*-Student ($p < 0,05$) no programa R versão 3.3.1. Posteriormente, foi feito o isolamento das bactérias a partir da obtenção de colônias puras nos semi-específicos NFb e JNFB com ácido málico, LGI com açúcar cristale JMV com manitol (Döbereiner *et al.*, 1995) no qual os frascos das maiores diluições positivas foram repicados sucessivamente para meios semissólidos e sólidos semi-específicos.

Em cada repique foram observadas características da película formada em meio semissólido e em meio sólido a morfologia das colônias (Baldani et al. 2014).

Caracterização dos isolados

Caracterização morfológica dos isolados

Os isolados foram analisados quanto à morfologia colonial (margem, tamanho, textura, elevação da margem, coloração, brilho) e, posteriormente foram agrupados fenotipicamente pelo método UPGMA, no programa Past.exe v 2.17.

Diversidade dos isolados

Para a análise de diversidade por BOX-PCR dos isolados bacterianos primeiramente foi realizada a extração do DNA total, segundo o protocolo de Sambrook e Russel (2001). A eficiência extração e a quantificação do DNA das amostras foram analisadas em gel de agarose (0,8% em tampão TEB 1X) seguido da coloração com SyberGreen (Invitrogen).

A análise da diversidade dos isolados foi realizada através da amplificação de regiões conservadas e repetitivas do DNA com o primer BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al. 1994). A reação de amplificação foi conduzida com os seguintes volumes: água milli-Q estéril, 18 µL; dNTPs, 0,75 µL estoque com 10 pmol µL⁻¹ de cada base; tampão 10X (1X), 2,5 µL; MgCl₂, 1,5 µL (3nM); oligonucleotídeo, 1,0 µL (2 pmol µL⁻¹); DNA, 1,0 µL (10 ng. µL⁻¹); Taq DNA polimerase, 0,25 µL (5 U µL⁻¹), em um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 10 min; 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min 53°C) e extensão (8 min a 65°C); 1 ciclo de extensão final a 65°C por 16 min; manutenção final a 4°C, com o uso do termociclador. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 60 V em gel de agarose a 2%, em tampão TBE 1 X, por 6 horas e corado com SyberGreen (Invitrogen). Os produtos de PCR foram analisados pelo programa BioNumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, Versão 1.01) e, para a análise de agrupamento, foi usado o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

Características funcionais relacionadas ao potencial biotecnológico

Solubilização de fosfato de cálcio

A capacidade de solubilização de fosfato de cálcio foi testada em meio de cultura GL sólido (Sylvester – Bradley et al. 1982), contendo 10,0 g de glicose, 2,0 g de extrato de levedura e 5,0 g de ágar para 1L pH 5,8. Depois de esterilizado e ainda no estado líquido, foram adicionados 200 mL de meio, 50,0 mL de K_2HPO_4 (10%) e 100mL de $CaCl_2$ (10%) para a formação de precipitado insolúvel de $CaHPO_4$. O meio foi então cuidadosamente distribuído em placas de Petri a fim de evitar a formação de bolhas que dificultam a visualização no halo de solubilização

Previamente a análise de solubilização de fósforo os isolados foram crescidos em meio Dygs, por 24h, em agitação constante de 150 rpm. Em seguida, 20µL foi inoculado em placa Petri contendo meio cultura, descrito acima, com quatro repetições. O resultado positivo foi verificado através da formação de uma área translúcida em torno da colônia após sete dias.

Atividade celulolítica

A atividade celulolítica dos isolados bacterianos foi avaliada utilizando-se o método de iodine conforme descrito por Kasana et al. (2008). Alíquotas de 0,50 µL de cultura foi crescida por 24h em 5mL meio Dygs; após esse período, 10 µL foram distribuídos em placas de Petri em quadriplicada no meio CMC ágar contendo, 0,2% de $NaNO_3$, 01% de K_2HPO_4 , 0,05% de $MgSO_4$, 0,5% de KCl, 0,2% de CMC 0,02% de peptona e 1,7% de ágar. As placas foram incubadas a 30°C pelo o período de dois dias. Após a incubação, as placas foram inundadas com solução de Iodine (2,0 g de KI, 1,0 g de iodo diluído em 300 mL de água destilada) durante 3 minutos. O excesso de solução foi drenado e a presença de halo ao redor das colônias bacterianas indicou resultado positivo para a atividade celulolítica.

Atividade proteolítica

A atividade proteolítica das bactérias foi analisada adotando o protocolo descrito por Saran et al. (2007). As estirpes bacterianas foram crescidas por 24h em 5mL de meio Dygs. Alíquotas 10 µL de suspensão bacteriana foram plaqueada em quadriplicada em 20 mL de meio de cultura. O meio de cultura foi preparado pela combinação dos seguintes componentes: 20 g de ágar dissolvidos em 200 mL de água destilada; 20 g de

leite desnatado dissolvidos em 200 mL de água destilada e 600 mL de solução de K_2HPO_4 0,2 M, pH 7,0 (ajustado com KOH). Todos os componentes do meio foram autoclavados separadamente antes do uso para evitar a coagulação e carbonização do leite devido à presença de sais (Saran et al. 2007). As placas inoculadas foram incubadas a 30°C por 48h. A atividade proteolítica foi verificada pela presença da formação de um halo ao redor da colônia bacteriana.

Atividade amilolítica

As estirpes foram cultivadas em 5mL de meio líquido Dygs por 24h, em seguida foi alíquota 10µL em quatro pontos distribuídos uniformemente em placas de Petri contendo meio de cultura YMA (extrato de levedura-manitol-ágar) modificado pela substituição do manitol por amido como única fonte de carbono e sem a adição do azul de bromotimol (Oliveira et al. 2007). As culturas foram incubadas a 30°C por sete dias. Após esse período, foi adicionada solução de iodine em toda a placa, sendo detectada a atividade amilolítica pela a formação de um halo transparente ao redor das colônias.

Os índices enzimáticos (IE) dos todos os testes fisiológicos foram obtidos a partir da razão do diâmetro do halo de solubilização ($\emptyset HS$) pelo diâmetro da colônia ($\emptyset C$) por meio da fórmula: $IS = \emptyset H / \emptyset C$. As linhagens foram classificadas em três grupos em relação ao índice enzimático: Baixo ($IS < 2$); Médio ($2 < IS < 4$); e alto ($IS > 4$) (Berraquero et al. 1976).

Quantificação de auxina

Para quantificação das auxinas o método utilizado foi de Salkowski em microplaca (Sarwar e Kremer, 1995). Primeiramente as estirpes foram cultivadas em meio líquido Dygs por 24h. Posteriormente as bactérias foram cultivadas em meios líquidos específicos (NFb, LGI, JNFb e JMV) sem azul de bromotimol e com 1g/L de sulfato de amônia, acrescido de 100ug de L-troptofano a 10mg/mL, durante 72h a 30°C e 180rpm no escuro. Em seguida a cultura crescida foi agitada e 1ml do sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5mL e centrifugados por 15 minutos a 5000 rpm por cinco minutos e alíquotas de 150 µL do sobrenadante foram transferidas para microplacas de poliestireno de 96 poços.

Em cada poço, contendo o sobrenadante da cultura, foram adicionados 100 µL do reagente Salkowski (1 mL de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 0,5M + 50mL de $HClO_4$ (35%)) (Gordon e Weber 1951). A reação foi mantida no escuro durante 30 minutos a temperatura

ambiente e para cada amostra foram feitas três repetições. A produção de ácido indolacético (AIA) foi considerada positiva nas reações que mostraram mudanças na coloração da reação, sendo positiva (rosa) e negativa (transparente). A leitura da absorbância foi realizada com auxílio de espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm para quantificação da produção de indóis. Como padrão foi utilizada auxina sintética (Sigma) (Sarwar e Kremer, 1995).

Análise qualitativa de solubilização de fosfato e zinco

As estirpes que apresentaram melhor desempenho nos testes anteriores de solubilização de fosfato de cálcio, atividade amilolítica, proteolítica, celulolítica e produção de auxinas foram selecionadas para realização dos testes de solubilização de fosfato, produção de sideróforos e o sequenciamento do gene 16S rRNA. No total foram selecionadas 90 estirpes.

Para avaliar a capacidade das estirpes em solubilizar zinco e fosfato inorgânico *in vitro* as bactérias foram inoculadas em 5mL de meio líquido Dygs e incubadas por 24h a 180rpm. Após esse período, 10 µl das culturas bacterianas em triplicata foram inoculados em placas de Petri contendo 20 mL de meio NBRIP sólido (10 g de glicose; 5 g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0,25 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(NH_4)SO_4$ e 15 g.L⁻¹ de ágar adicionados a 1000 mL de água destilada). O teste de solubilização de fosfato foi realizado na presença de 5 g.L⁻¹ de $Ca_3(PO_4)_2$ (pH 6,0), e o de solubilização de zinco foi feito na presença de 1,2 g.L⁻¹ de ZnO (pH 6,0) conforme descrito por Nautiyal (1999). Todas as amostras foram incubadas a 30°C por 15 dias. Os testes de solubilização de zinco e de fosfato foram considerados positivos quando as estirpes formaram halos ao redor da colônia. Após o período de incubação o diâmetro do halo formado e da colônia foram medidos, utilizando paquímetro digital, e os dados utilizados para calcular o índice de solubilização.

Análise qualitativa de síntese de sideróforos

Para quantificação da síntese de sideróforos foi utilizado o método desenvolvido por Schwyn e Neilands (1986). As estirpes foram cultivadas em 5mL de meio líquido Dygs por 24h a 30°C e 180rpm. Após esse período uma alíquota de 20 µl foi transferida para o meio específico da estirpe (NFb, LGI, JNFb e JMV sem a presença de ferro e sem azul de bromotimol acrescido de 1g/L sulfato de amônia) incubadas por até 72h a 30°C e 180rpm. Após esse período uma alíquota de 10 µl foi transferida em triplicata para

placa de Petri com 20mL contendo da mistura de solução 15% de CAS (composto por 73mg de CTAB adicionado a 40mL de água deionizada; 60,4mg de CAS em 40ml de água deionizada: mistura e acrescentar 10mL de FeCl₃ HCl a 10%) com meio sólido específico da estirpe (NFb, LGI, JNFb e JMV com 1g/L sulfato de amônia e isento de ferro e azul de bromotimol) e incubadas a 30°C por 72h. A formação de halos ao redor das colônias caracteriza o resultado positivo, os diâmetros dos halos e das colônias foram mensurados para calcular o índice enzimático (Berraquero et al. 1976). Todas as vidrarias usadas para preparo dos meios, soluções para o crescimento das estirpes foram tratadas com ácido clorídrico 10% para retirada de resíduos de ferro.

Sequenciamento de produtos da PCR

Após a extração, o gene 16S rRNA foi amplificado por meio de reações em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os iniciadores 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTCAG-3') (Furushita et al. 2003) e Amp2 (5'-AAG GAG GTG ATC CAR CCG CA-3') (Wang et al. 1996). A reação ocorreu nas seguintes condições: água ultrapura 14,38 µL, Tampão 5X (1X) 5 µL, MgCl₂ 25mM (1,75mM) 1,75 µL, dNTP 10mM (0,25mM) 0,63 µL, 27F 10uM (0,20uM) 0,50 µL, Amp2 10uM (0,20uM) 0,50 µL, Taq DNA polimerase (5U. µL⁻¹) 500U (1,25U) 0,25 µL e 2 µL de DNA em um volume final de 25 µL.

A reação de amplificação foi conduzida com as seguintes temperaturas, ciclos e tempo: temperatura de desnaturação de 94°C por 3 minutos, seguida de 29 ciclos (94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento de 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos) e temperatura de extensão final de 72°C por 5 minutos.

O fragmento amplificado foi analisado em gel de agarose 0,7% e a amostra amplificada foi sequenciada no sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied BiosystemR) do Laboratório de Genômica da Embrapa Agrobiologia. Posteriormente foram alinhadas e comparadas com sequências depositadas no banco de dados do Genbank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o programa BLAST-N (Altschul et al. 1997) editando a busca para sequências depositadas no banco de dados de 16S rRNA. Após a comparação das sequências com o banco de dados, foi realizada a construção da árvore filogenética utilizando o cálculo do algoritmo *Neighbor-Joining (NJ)* com o programa MEGA V6.

Experimento de inoculação em casa de vegetação

Trinta e três estirpes foram selecionadas a partir dos resultados anteriores e inoculadas na espécie da planta da qual foi isolada. Foram utilizados quatro tratamentos: 1) planta com a inoculação das estirpes selecionadas, 2) controle (não inoculado), 3) com inoculante comercial e 4) inoculado com a estirpe ZAE94 – *Herbaspirillum seropedicae*. Para preparo do inoculante, sacos com 7g de turfas foram vedados e autoclavados duas vezes com intervalo de 24h para certeza da eliminação de fungos. Posteriormente as estirpes foram incubadas em 5ml meio Dygs, por até 48h a 30°C a 180rpm, sendo transferidos 3ml para a turfa e incubadas por 48 horas. Após esse período as sementes foram umedecidas com água e misturadas à turfa. As sementes foram transferidas para caixas de isopor que foram coladas em bandejas com água para manter a irrigação por inundação. Em cada célula foram adicionadas seis sementes. Posteriormente foi feito o desbaste deixando uma muda por célula, sendo seis repetições por tratamento. O substrato usado foi uma composição de areia, vermiculita e substrato de hortaliças, na proporção 1:1:1. Aos 52 dias após a semeadura as plantas foram analisadas em relação ao acúmulo da matéria fresca mantida por 24h na sombra e massa seca em estufa a 62°C. As médias dos tratamentos variaram entre quatro e seis repetições, sendo a maioria com seis repetições. Foi aplicado o teste estatístico Tukey a 5% de probabilidade, no programa Sisvar 5.6 para análise de comparação das médias.

Resultados

Ocorrência e diversidade fenotípica de isolados bacterianos nas espécies nativas de arroz

Oryza latifolia e *O. glumaepatula* apresentaram elevado número de bactérias diazotróficas, nas duas áreas de coletas, Serra do Amolar e Corrixo do Bracinho (Tabela 1). O número de bactérias diazotróficas associadas às duas espécies de arroz, não apresentou diferença significativa tanto entre as áreas de coleta (Figura 2A), como também entre as espécies de plantas (Figura 2B). No total foram isoladas 201 bactérias diazotróficas da raiz, sendo o número de isolados nas duas espécies similar, 103 para *Oryza latifolia* e 98 para *O. glumaepatula*. O meio de cultivo com maior

representatividade nas duas espécies foi o NFb, outros meios apresentaram praticamente o mesmo número de isolados no total (Tabela 2).

O dendrograma de diversidade fenotípica dos isolados bacterianos associados a *Oryza glumaepatula* apresentou cinco grandes grupos. O primeiro grupo apresenta uma maior diversidade fenotípica composto por isolados que cresceram em todos os tipos de meio de cultivo, os grupos dois, três e cinco apresentam isolados que apresentam crescimento do meio de cultivo NFb e o grupo quatro com isolados crescidos no meio JMV (Figura 3). O dendrograma dos isolados bacterianos associados a *Oryza latifolia*, também apresentou cinco grandes grupos, sendo que os grupos um e dois representam isolados principalmente provenientes do meio NFb e os grupos três e cinco do meio JMV; no grupo quatro, o maior grupo, há representantes principalmente originados do meio LGI (Figura 4).

No Box-PCR os dendrogramas das duas espécies de arroz apresentam em sua maioria isolados do mesmo meio de cultivo. Os agrupamentos das duas espécies de arroz apresentaram quatro grandes grupos, porém os grupos de *Oryza glumaepatula* (Figura 5) são mais diversos do que os isolados de *O. latifolia* (Figura 6).

O dendrograma de *O. glumaepatula* apresenta nos grupos um, três e quatro maior representatividade dos isolados do meio de cultivo NFb e perfil polimórfico próximo a espécie *Azospirillum lipoferum*, sendo o grupo dois mais diverso com estirpes de todos tipos de meio de cultivos (NFb, LGI, JMV e JNFb), onde estão agrupados os perfis polimórfico das espécies *Herbaspirillum seropedica* e *Burkholderia silvatlantica*, *Nitrospirillum amazonense* (Figura 5), cujo nome antigo era *Azospirillum amazonense*.

No dendrograma de *O. latifolia* os grupos um e três apresentam maior representatividade de isolados oriundos do meio de cultivo NFb e o grupo quatro do meio JMV, sendo o grupo dois o mais diverso e que apresenta isolados de todos os tipos de meio de cultivo utilizados nesse estudo (Figura 6). Todos os grupos das duas espécies de arroz mostraram diversidade semelhante entre os meios de cultivo, porém com destaque para o NFb que apresentou representantes em todos os grupos, sendo portando o meio de cultivo com maior diversidade (Figura 5 e 6).

Características biotecnológica dos isolados bacterianos

Em relação as atividades enzimáticas, 80% dos isolados analisados apresentaram algum tipo de atividade, com índice que variaram de baixo a médio (Tabela suplementar 1). A

atividade proteolítica foi identificada em 66% dos isolados (Figura 8), desses mais da metade apresentou índice enzimático médio, o isolado com maior atividade foi o 145CAG (3,97 mm), originado de *Oryza glumaepatula*, a qual teve o maior número de representantes nessa atividade (Tabela 3 e Tabela suplementar 1). A presença de atividade amilolítica, foi observada em 21% dos isolados com índice enzimático médio, sendo o que apresentou maior atividade foi o isolado 63CAL (2,85 mm); 16% dos isolados apresentaram a atividade celulolítica (Figura 7), sendo a maioria com índice enzimático médio, o representante com maior atividade foi o 74CAG (3,8 mm), com predominância dos isolados originados de *O. latifolia* (Tabela 3 e Tabela suplementar 1). A solubilização de fosfato de cálcio foi observada em 13% dos isolados com o mesmo número de representantes nas duas espécies de arroz selvagem, com índice de solubilização médio e o isolado com maior capacidade de solubilização foi 103CAG (2,7 mm; Tabela 3 e Tabela suplementar 1).

Aproximadamente 47% dos isolados apresentaram atividade enzimática em pelo menos dois dos testes analisados e 19% em três dos testes estudados (Tabela suplementar 1). Dos isolados que apresentaram atividade de solubilização de fósforo em sua maioria foram oriundos do meio LGI e JMV, as atividade proteolítica e amilolítica tiveram representações de número de isolados praticamente similares entre os meios de cultivo NFB, JNFB e JMV, já para atividade celulolítica a maioria dos isolados foram originados do meio de cultivo JNFB (Tabela 3).

A produção do hormônio ácido indolacético (AIA) foi observada em 40% dos isolados, com a maioria das estirpes pertencentes aos meios de cultivo NFb (32) e JNFb (32), e isoladas de *Oryza glumaepatula*, assim como o isolado 180CAG (271,4 mm) com a maior capacidade de produção deste hormônio (Tabela suplementar 1).

As estirpes que apresentaram melhor desempenho nos testes anteriores foram selecionadas para avaliar a capacidade da solubilização de cálcio, zinco e produção de sideróforos, foram 90 estirpes no total. Dessas 52% dos isolados apresentaram capacidade de solubilizar de fosfato de cálcio, que são representados principalmente por estirpes cultivadas nos meios de cultivo JNFb e NFb. Os isolados 153CAG (2,64mm) e 193CAL (2,56mm) os que apresentaram maior índice de solubilização nessa atividade fisiológica. Cerca de 50% são solubilizadores de fosfato de zinco e a maioria dos isolados são provenientes do meio JNFb e de *Oryza glumaepatula*, as melhores performances foram encontradas nas bactérias 133CAG (3,61mm) e 155CAG (3,02mm). Além disso, 55% dos isolados produziram sideróforo, quase todos oriundos

do meio JNFb e NFb e com maior produção nas estirpes 12CAG (2,7mm) e 187CAL (2,05mm; Tabela 3 e Tabela suplementar 2).

Identificação taxonômica dos isolados de arroz selvagem

Os isolados com maior desempenho nas características biotecnológicas analisadas foram selecionados (Tabela suplementar 2) para serem classificados taxonomicamente pelo sequenciamento parcial do gene do 16S rRNA (Tabela suplementar 3), levando em consideração o mínimo de 97% de similaridade. As bactérias associadas às duas espécies de arroz selvagem apresentaram alta diversidade, sendo a maioria do filo Proteobacteria pertencentes principalmente aos gêneros *Pantoea*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (Tabela suplementar 3).

Dessas 23 foram analisados filogeneticamente constituindo quatro grupos (Figura 9) com baixa silimiridade com as sequencias do banco de dados. O maior grupo (I) é composto por oito bactérias, sendo os isolados 29CAL, 138CAL, 156CAL, 171CAL e 177CAL provenientes de *Oryza latifolia* e os isolados 47CAG, 62CAG e 144CAG de *Oryza glumaepatula*. Estas espécies apresentam 91% similaridade de sequências com o gênero *Stenotrophomonas* (29CAL 138CAL e 171CAL e 177CAL) e 54% a 100% com o gênero *Pseudomonas* (62CAG, 144CAG e 156CAL). O grupo (II) apresenta os isolados 16CAG e 131CAG associados a *O. glumaepatula* e o 1CAL a *O. latifolia* com similaridade de até 100% ao gênero *Achromobacter*. No grupo III os isolados 173CAL (*O. latifolia*) e 5CAG (*O. glumaepatula*) demonstram 100% de similaridade ao gênero *Enterobacter* e os isolados 65CAG, 96CAG, 133CAG e 155CAG (*O. glumaepatula*) e 2CAL, 110CAL e 116CAL (*O. latifolia*) até 95% de similaridade ao gênero *Pantoea*. E no grupo IV com os isolados 128CAG e 132CAG (*O. glumaepatula*) e 19CAL (*O. latifolia*) com até 100% de similaridade ao gênero *Bacillus*.

Outros isolados, apesar de não terem sido analisados filogeneticamente, por não apresentaram número suficientes de pares de bases ou dispor do sequenciamento de apenas um dos primers utilizados, foi possível identificar o gênero: *Achromobacter* (25CAG, 182CAL), *Acinetobacter* (12CAG), *Burkholderia* (169CAL, 183CAG), *Bacillus* (73CAG, 83CAG, 129CAG), *Enterobacter* (15CAG, 32 CAL, 104CAL), *Pantoea* (79CAG, 98CAL, 99CAG, 100CAL, 101CAG, 180CAG), *Paenibacillus* (121CAL), *Phytobacter* (59CAL), *Pseudomonas* (97CAG), *Stenotrophomonas*

(30CAG, 64CAL, 109CAG, 135CAL, 143CAG, 163CAG, 168CAG) e *Staphylococcus* (75CAL, 187CAG) (Tabela suplementar 3).

Promoção de crescimento em espécies de arroz selvagem

A partir dos dados das características morfológicas, bitecnológicas e perfil polimórfico foram selecionados 33 isolados (1CAL, 18CAL, 57CAL, 59CAL, 110CAL, 153CAL, 156CAL, 168CAL, 170CAL, 171CAL, 173CAL, 174CAL, 179CAL, 182CAL, 190CAL e 7CAG, 15CAG, 29CAG, 30CAG, 47CAG, 96CAG, 132CAG, 145CAG, 152CAG, 155CAG, 163CAG, 169CAG, 177CAG, 180CAG, 185CAG, 187CAG), para verificar a capacidade da promoção de crescimento vegetal proporcionada pelos isolados bacterianos em plantas de arroz das espécies estudadas (Tabela 4).

Em *Oryza latifolia*, todos os tratamentos com diferentes isolados aumentaram a produção de matéria fresca em até 59% se comparado ao tratamento com inoculante comercial. Dez (10) dos 17 tratamentos com inoculados apresentaram aumento no acúmulo de matéria fresca de até 25% em relação ao tratamento não inoculado. Nove tratamentos tiveram um aumento de até 18% comparado à testemunha ZAE94-*Herbaspirillum seropedicae*. Os tratamentos com os isolados 110CAL, 153CAL e 59CAL apresentaram valores mais significativos estatisticamente no aumento da matéria fresca, proporcionando um aumento de 59, 25 e 18% (110CAL); 58, 24 e 18% (153CAL) e 54, 21 e 14% (59CAL) em relação à testemunha do inoculante comercial, ao controle e ao tratamento com ZAE94-*Herbaspirillum seropedicae*, respectivamente. Com relação à produção de matéria seca, todos os tratamentos com diferentes isolados aumentaram a produção até 214% em comparação ao inoculante comercial. Nove dos 17 tratamentos demonstraram aumento da matéria seca em comparação às testemunhas sem inoculante e com ZAE94, com destaque para o tratamento com 110CAL que apresentou os maiores aumentos de 214, 78 e 62% em relação às testemunhas inoculante comercial, controle e ZAE94, respectivamente (Tabela 4).

Em *Oryza glumaepatula*, a inoculação de todos os diferentes isolados aumentou a produção de matéria fresca se comparado às testemunhas com inoculante comercial e não inoculado. Dos 16 tratamentos inoculados, 14 apresentaram aumento na matéria fresca comparados à testemunha de referência ZAE94. O tratamento com 180CAG apresentou valores mais significativos no aumento da matéria fresca proporcionando um

aumento de 54, 56 e 32% em comparação às testemunhas do inoculante comercial, ao controle e ao tratamento com ZAE94, respectivamente. Os tratamentos com 180CAG, 132CAG e 163CAG apresentaram valores mais significativos no aumento da matéria seca, porém não se diferenciando entre si, proporcionando um aumento de 260, 117 e 104% (180CAG); 236, 108 e 91% (132CAG) e 266, 121 e 108% (163CAG) em comparação à testemunha do inoculante comercial, ao controle e ao tratamento com ZAE94, respectivamente (Tabela 4).

Discussão

Diversidade de isolados bacterianos em espécies arroz

As duas espécies de arroz selvagem estudadas apresentaram elevado número de bactérias diazotróficas associadas às suas raízes (Tabela 1), corroborando com os resultados dos estudos realizados com arroz comercial cultivado (*Oryza sativa* L.), os quais encontraram organismos diazotróficos entre 10^2 e 10^7 células por g/raiz (Silva 2014; Rodrigues et al. 2006; Viana et al. 2012; Videira et al. 2012).

O meio de cultivo NFb, semiseletivo para bactérias do gênero *Azospirillum*, promoveu crescimento de maior número de isolados em comparação aos outros meios de cultivo (LGI, JNFb e JMV) (Tabelas 1 e 2). Bactérias pertencentes a esse gênero colonizam gramíneas em populações que variam entre 10^4 a 10^7 células g⁻¹ de matéria fresca (Baldani e Baldani, 2005). Apesar dos meios NFb, JNFb, LGI e JMV serem semiseletivos para *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Nitrospirillum amazonense* e *Burkholderia*, respectivamente (Döbereiner et al. 1995), bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* já foram isoladas utilizando esses meios de cultivo (Baldani et al. 2014; Chalita 2016; Ferreira et al. 2014; Oliveira et al. 2015), bem como no nosso estudo com espécies de arroz selvagem (Figura 9).

O agrupamento genético realizado pelo Box-PCR nesse estudo mostrou que possivelmente além das espécies usadas como referências podem existir outras espécies. Em estudo realizado com o arroz *Oryza glumaepatula* os isolados diazotróficos também apresentaram grande diversidade genética, com diferentes níveis de variação genética entre os isolados, 0,010 a 1,0 (Fernandes-júnior et al. 2012). Corroborando com os dados encontrados em trabalho com arroz nativo, no qual os isolados apresentaram perfis de amplificação únicos, sendo diferenciados entre si e com similaridade entre os

isolados com as referências para os gêneros *Burkholderia*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (Fernandes-Júnior et al. 2013). Diferente do trabalho com capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) em que os isolados bacterianos apresentaram 70% de similaridade entre os perfis e que apresentou maior diversidade no meio JMV se comparado ao NFb (Videira et al. 2012).

A maioria dos isolados sequenciados é pertencente ao Filo *Proteobacteria* (Tabela suplementar 3), um dos filos compostos por um grande número de representantes de bactéria fixadoras de nitrogênio atmosférico (Raymond et al. 2004; Zehr et al. 2003). As bactérias associadas às duas espécies de arroz selvagem apresentaram alta diversidade e similaridade com espécies pertencentes principalmente aos gêneros *Pantoea*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (Figura 9).

Outros estudos com gramíneas também obtiveram isolados identificados a partir da análise da sequência do 16S rRNA resultando nos mesmos gêneros de bactérias associados as duas espécies de arroz selvagem deste estudo (Tabela Suplementar 3). De forma semelhante o trabalho de Souza et al. (2013) observou em *Oryza sativa* L. bactérias dos gêneros *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Pantoea* e *Stenotrophomonas*.

Diversos trabalhos identificaram *Bacillus*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* associados às plantas de milho (Abreu et al. 2017; Montañez et al. 2012; Ogut et al. 2010; Silva et al. 2016). Na pesquisa de Pedrinho et al. (2010) em raízes do milho, os autores classificaram bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia* e *Pantoea*. Ainda com plantas de milho, Szilagyi-Zecchin et al. (2014) identificou isolados pertencentes aos gêneros *Achromobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*.

Características funcionais relacionadas ao potencial biotecnológico

Em estudo realizado com a espécie *Oryza glumaepatula*, no Amazonas, Fernandes-júnior et al., (2012) observaram que 22% dos isolados diazotróficos apresentaram a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio. E no trabalho de Souza et al. (2013) com *Oryza sativa* L. os autores constataram que 30% dos isolados foram capazes de solubilizar fosfato. Número superior se comparados aos resultados desse trabalho quando utilizado o meio GL sólido e inferior quando em relação ao teste com o meio

NBRIP (Tabela 3 e Tabela suplementar 2). Essa diferença pode ser explicada pelo fato da solubilização de fosfatos em meios sólidos serem influenciados pela fonte de carbono utilizada e geralmente os maiores halos de solubilização são obtidos com a glicose (Silva-Filho e Vidor 2000). Os nossos resultados corroboram com os de Silva et al. (2012) em trabalho com cana-de-açúcar em que 50% apresentaram dos isolados com capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, sendo a maioria (48%) com índice enzimático entre 1,15 e 1,86 mm, inferior aos encontrados nas espécies de arroz selvagem em que 26% dos isolados solubilizadores de fosfato de cálcio apresentaram índice de solubilização (IS) de $IS < 2$ (Tabela 6). O maior índice de solubilização de cálcio encontrado foi o isolado 103CAG (2,7 mm; Tabela suplementar 1) valor superior ao encontrado por Ogut et al. (2010) de $IS = 2$, porém menor se comparado aos observados por Marra et al. (2012), $IS = 3,55$, e por Silva et al. (2012) com $IS = 3,79$.

Trabalhos com gramíneas também apresentam bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Pantoea* capazes de solubilizar fosfato corroborando com os resultados desse trabalho (Tabela suplementar 1 e Figura 9), como o de Procópio et al. (2012) e Souza et al. (2013) com arroz (*Oryza sativa* L.). Além do trabalho de Pedrinho et al. (2010) com milho, que detectaram bactérias solubilizadoras de fosfato dos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Pantoea*. E ainda com milho, Abreu et al. (2017) observou a capacidade de solubilizar fosfato em *Enterobacter*, *Bacillus* e *Burkholderia*.

Os resultados da atividade proteolítica corroboram com os encontrados por, Sanomiya e Nahas (2013) em experimento com *Brachiaria ruziziensis* que apresentou um elevado número de bactérias com atividade proteolítica (69,9%). Nossos resultados ainda apresentaram valores superiores aos observados por Martins et al. (2016) com 21% de isolados com atividade proteolítica e por Oliveira et al. (2006) com 36% de isolados com atividade proteolítica.

O maior índice enzimático de solubilização de cálcio encontrado foi no isolado 145CAG (3,97 mm), valor superior ao encontrado por Silva et al. (2012) (2,54 mm). Outros trabalhos com gramíneas também apresentaram bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* com capacidade de sintetizar enzimas proteolíticas (Beg e Gupta 2003; Ferreira et al. 2014; Szilagyi-Zecchin et al. 2014; Pant et al. 2015; Thangam e Rajkumar 2000)

A celulose é um polissacarídeo abundante presente na formação dos vegetais. Os microrganismos com capacidade de degradar a celulose exercem importante papel no

ciclo de carbono (Silva et al. 2015), enriquecendo a matéria orgânica do solo. Além disso, a atividade celulolítica contribuir para interação do microrganismo com a planta, facilitando sua penetração na hospedeira. Neste trabalho *Achromobacter*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Stenophomonas* e *Burkholderia* apresentaram atividade de degradação de celulose (Tabela suplementar 1 e Figura 9). Outros estudos também demonstraram essa atividade nesses gêneros de bactérias (Cho et al. 2007; Szilagyi-Zecchin et al. 2014; Megías et al. 2017; Rodrigues et al. 2016). Estudos com gramíneas apresentaram números de isolados com atividade celulolítica superiores aos encontrados nas espécies de arroz selvagem (Tabela 3), Naher et al. (2013) obteve 55% dos isolados com capacidade de degradar celulose e Sanomiya e Nahas (2003), com braquiária encontrou 86,8% das bactérias com esta atividade. Porém, alguns fatores físico-químicos, como o pH e a temperatura podem influenciar tanto no número como na atividade enzimática dos microrganismos (Sudharhsan et al. 2007).

O amido é a principal reserva dos vegetais e sua fonte principal de energia, um carboidrato comum no solo, composto por amilase e amilopectina, degradado por fungos e bactérias (Alariya et al. 2013), sendo as amilases enzimas essenciais na germinação de grãos e no crescimento microbiano (Hizukuri 1996). Assim como em isolados das espécies *Oryza glumaepatula* e *O. latifolia*, essa atividade já foi registrada também para *Bacillus* (Castro et al. 2014; Carrim et al. 2006), *Herbaspirillum seropedicae* (Jesus et al. 2013). Em estudo com braquiárias, Sanomiya e Nahas (2003) encontraram bactérias com atividade amilolítica (26,6%) em valores próximos ao encontrado nas espécies de arroz selvagem (Tabela 3).

O ácido indol-acético (AIA) é um dos mais importantes fitormônios por coordenar diferentes processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Ahemad e Kibret 2014). Em estudo com a espécie *Oryza glumeapatula*, Fernandes-júnior et al. (2012) encontrou um número inferior de isolados com potencial para produzir ácido indol-acético (15%) ao observado nesse trabalho (40%) (Tabela 3). Outros trabalhos com gramíneas encontraram valores superiores com 57% do isolados produzindo auxina (Lin et al. 2012), 71% encontrados por Beneduzi et al. (2013) e 98% observados por Cavalcanti (2016). A maior produção desse hormônio foi pelo isolado 180CAG (Tabela suplementar 1), resultado semelhante ao encontrado por Beneduzi et al. (2013) com maior produtor de auxina, com $264 \mu\text{g mL}^{-1}$ em trabalho com cana-de-açúcar. Kaur e Reddy (2014) também observaram em estudos com milho a maior produção de AIA em um isolado do gênero *Pantoea* ($113,57 \mu\text{g mL}^{-1}$), assim como o

180CAG do mesmo gênero (Tabela suplementar 1 e Figura 9). Este resultado foi superior aos encontrados por Lin et al. (2012) com maior produção de auxina ($139,21 \mu\text{g ml}^{-1}$) em cana-de-açúcar, e os observados por Arruda et al. (2013) no qual o isolado de milho com maior atividade produziu $130,27 \mu\text{g ml}^{-1}$ de AIA. Alguns gêneros de bactérias encontrados associado às espécies de arroz selvagem *Oryza latifolia* e *O. glumaepatula* que apresentaram produção de AIA (Tabela suplementar 1 e Figura 9), corroboram com os descritos em diversos trabalhos com arroz, milho e cana-de-açúcar, como as *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Stenophomona*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Achromobacter* (Arruda et al. 2013; Ferreira et al. 2014; Szilagyi-Zecchin et al. 2014; Li et al. 2017; Megías et al. 2017; Pedrinho et al. 2010; Souza et al. 2013; Peñafiel-Jaramillo et al. 2016).

Os sideróforos podem promover crescimento vegetal por bactérias associadas às plantas, a partir do controle biológico por competição de nutrientes e indução de resistência sistêmica (Ramamoorthy et al. 2001). A produção desse composto foi registrada em isolados presentes nas duas espécies de arroz selvagem *Pantoea*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Enterobacter* e *Burkholderia*, como observado em outros trabalhos (Arruda et al. 2013; Fagotti 2012; Szilagyi-Zecchin et al. 2014; Souza et al. 2013). Em estudo com milho, Arruda et al. (2013) encontrou 42% de isolados capazes de produzir sideróforos; também com milho Cavalcanti (2016) observou 19% dos isolados produzindo sideróforos, e Chaiarn et al. (2009) registraram 23% capazes de produzir esse composto.

Promoção de crescimento em espécies de arroz selvagem

Características funcionais relacionadas ao potencial biotecnológico detectadas nos isolados das espécies de arroz selvagem (Tabela suplementar 1 e 2) inclusive nos gêneros identificados (Figura 9), já foram relatadas como promotoras do crescimento vegetal. A produção de AIA relacionada ao estímulo de crescimento vegetal em bactérias tais como *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pantoea* e *Pseudomonas*, entre outras que ocorrem em associação com plantas já está bem fundamentada na literatura (Costacurta e Vanderleyden 1995; Lata et al. 2006; Patten e Glick 2002). Os isolados 59CAL pertencente ao gênero *Phytobacter* e 153CAL (gênero não identificado) proporcionaram aumento da massa fresca quando inoculados em *Oryza latifolia* e os isolados 132CAG do gênero *Bacillus* e 163CAG do

gênero *Stenotrophomonas* proporcionaram aumento da massa seca quando inoculados em *Oryza glumaepatula*, quando comparado aos tratamentos de referências e aos outros tratamentos (Tabela 4).

Porém o isolado 110CAL inoculado em *Oryza latifolia* e 180CAG em *Oryza glumaepatula*, ambos identificados como *Pantoea*, se destacaram por proporcionarem aumento tanto de massa seca quanto de massa fresca. Estudos com esse gênero demonstraram o seu potencial como promotoras de crescimento vegetal (Santos e Varavallo 2011; Silva et al. 2016). Megías et al. (2017) inoculando *Pantoea* em diferentes espécies vegetais observou um aumento da produção de biomassa e /ou grãos de 10 até 60% em leguminosas (alfafa, *Medicago sativa*), pastagens (*Urochloa brizantha*), vegetais (tomate, *Solanum lycopersicum*) e cereais (arroz). Em trabalho com trigo (*Triticum aestivum*), Luz et al. (2001) promoveu aumento da altura da planta pela ação da resistência a patógenos. Em milho (*Zea mays* L.), Kaur e Reddy (2014) observou maior aumento na área foliar (77,7%). Além de aumento da matéria seca vegetal e aumento de proteínas de resistência em cana-de-açúcar (Quecine et al. 2012). Já em trigo proporcionou maior comprimento de raiz (29,3%) e peso fresco (20,8%) observados nas plantas em condições normais e em estresse hídrico, as quais apresentaram aumento de 17,1, 41,8 e 112% no comprimento da parte aérea, comprimento da raiz e massa fresca total da planta, respectivamente, em relação ao controle (Chen et al. 2017). Esse gênero também apresentou destaque quanto à promoção de crescimento em trabalho com *Tripogon spicatus* (Fernandes-junior et al. 2015).

Assim, os isolados obtidos neste trabalho apresentaram alta diversidade e apresentaram características funcionais relacionadas ao potencial biotecnológico podem possivelmente estimular o crescimento vegetal nas plantas nas duas espécies de arroz selvagem. Portanto o estudo dessas bactérias pode ser uma alternativa aos fertilizantes químicos e pesticidas por meio de aumento da produção de alimentos sem prejuízo ao meio ambiente. Com a vantagem de não interferirem no equilíbrio ecológico, por serem bactérias nativas, possibilitando deste modo, uma agricultura sustentável. Contribuindo para o conhecimento da biodiversidade microbiana no pantanal Sul Matogrossense.

Agradecimentos Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo apoio financeiro ao projeto.

Referências Bibliográficas

- Abreu CS, Figueiredo JEF, Oliveira CA, Santos VL, Gomes EA, Ribeiro VP, Barros BA, Lana UGP and Marriel IE (2017) Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genet Mol Res* 16:01-13.
- Ahemad M and Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *JKSUS* 26:1-20.
- Alariya SS, Sethi S, Gupta S, Gupta BL (2013) Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. *Archives of Applied Science Research*, 5:15-24,
- Alstchul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang, J (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25,3389 – 3402.
- Amamoorthy V, Raguchander T, Samiyappan R (2002) Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. *Plant Soil* 239(1):55-68.
- Antonio CS (2010) Ocorrência de bactérias endofíticas associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas nos estados: Alagoas e Pernambuco. Dissertação de Mestrado, Unverisdade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica.
- Apine OA and Jadhav JP (2011) Optimization of medium for indole-3-acetic acid production using *Pantoea agglomerans* strain PVM. *J Appl Microbiol* 110:1235-1244.
- Araújo AES, Rossetto CAV, Baldani VLD, Baldani, JI (2010) Rice seed germination and vigour as affected by the inoculation with diazotrophic bacteria. *Ciênc Agrotec* 34(4):932-939.
- Araujo FF and Guerreiro RT (2010) Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. *Ciênc Agrotec* 34:837-844.
- Arruda LM, Silva AB, Martins AF, Lisboa BB, Nania CL, Bertolo FOA, Passaglia LMP and Vargas LK (2013) Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Appl Soil Ecol* 63:15-22.
- Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plant and other organisms. *Annu Rev Plant Biology* 57:233-266.
- Baldani JI and Baldani VLD (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Acad Bras Ciênc* 77(3):549-579.
- Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Döbereiner J (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov.: a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int J Syst Evol Bacteriol* 36:86-93.
- Baldani JI, Caruso LV, Baldani VLD, Goi SR, Dobereiner J (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem* 29:911-922.
- Baldani JI, Pot TB, Kirchhof G, Falsen E, Baldani VLD, Olivares FL, Hosr B, Kersters K, Hartmann A, Gillis M, Döbereiner J (1996) Emended description of *Herbaspirillum*: a mild plant patogen, as *Herbaspirillum rubrisibalbicans* comb. nov. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int J Syst Evol Bacteriol* 46:802-810.

- Baldani JI, Reis VM, Videira SS, Boddey LH, Baldani VLD (2014) The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. *Plant Soil* 384:413-431.
- Baldani JL, Azevedo MS, Reis VM, Teixeira KRS, Olivares FL, Gois SR, Baldani VLD, Döbereiner J (1999) Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: Siqueira JO, Moreira FMS, Lopes AS, Carvalho JG eds. *Inter-relações fertilidade, biologia e nutrição de plantas*. Viçosa, SBCS/UFLA/DCS 621-666p. .
- Baldani VLD (1996) 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. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- Baldani VLD and Döbereiner J (1980) Host-plant especificity in infection of cereal with *Azospirillum* spp. *Soil Biol Biochem* 12:433-440.
- Barroso CB and Nahas E (2005) The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphate. *Appl Soil Ecol* 29(1):73-83.
- Beg QK and Gupta R (2003) Purification and characterization of an oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme Microb Tech* 32:294-304.
- Beneduzi A, Costa PB, Moreira F, Passaglia LMP (2013) Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Appl Soil Ecol* 63(1):94-104.
- Beneduzi A, Peres D, Vargas LK, Bodanese-Zanattini MH, Passaglia LMP (2008) Evalutaion of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Appl Soil Ecol* 39:311-320.
- Benite AMC and Machado SP (2002) Sideróforos: “Uma resposta dos Microrganismos”. *Quím Nova* 25(6B):1155-1164.
- Bergamaschi C (2006) Ocorrência de Bactérias diazotróficas associadas a raízes e colmos de cultivares de sorgo. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- Berraquero FR, Baya AM, Cormenzana AR (1976) Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Acta Pharm* 17:399-406.
- Biswa JC, Ladha JK, Dazzo FB (2000) Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of Lowland rice. *Soil Sci Soc Am J* 64:1644-1650.
- Boddey RM, Boddey LH, Urquiaga S (1990) A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio. Itaguaí: Editora Universidade Rural (EMBRAPA-CNPBS), 37p.
- Boiero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassán F, Luna V (2007) Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl Microbiol Biotech* 74:874-880.
- Brasil (2015) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mercado Interno. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/cultura/arroz>. Acesso em: janeiro, 2018.
- Brasil SM (2005) Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em variedades de arroz. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Seropédica.

- Cardoso AA (2014) Caracterização Polifásica de Isolados Bacterianos obtidos de Nódulos de Feijoeiro-Comum. Dissertação de Mestrado, da Universidade Federal de Goiás. Goiânia.
- Cardoso ICMC, Klauberg Filho O, Mariotto JR, Miquelluti DJ, Vicente D, Neves AN (2010) Ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em arroz irrigado no estado de Santa Catarina. Revista Ciênc Agrovet 9(2):178-186.
- Carrim AJI, Barbosa EC, Vieira JDG (2006) Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). Braz Arch Biol Tech 49(3):353-359.
- Carvalho EA (2002) Avaliação agrônômica da disponibilização de feijão sob sistema de semeadura direta. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba.
- Castro RA, Quecine MC, Lacava PT et al (2014) Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacterial associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. Springerplus 3:382.
- Cavalcanti MIP (2016) Seleção de bactérias promotoras de crescimento em milho cultivado no Semiárido obtidos por diferentes estratégias de isolamento. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba. Campina Grande.
- Chaiharn M, Chunhaleuchanon S, Lumyong S (2009) Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. World J Microb Biot 25:1919-1928.
- Chalita PB (2016) Diversidade fenotípica e genotípica de bactérias endofíticas isoladas de raízes de castanheira do Brasil (*Bertholletia excelsa* H; B; K) em três municípios de Roraima. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Roraima. Boa Vista.
- Chen C, Xin K, Liu H, Cheng J, Shen X, Wang Y, Zhang L (2017) *Pantoea alhagi*, a novel endophytic bacterium with ability to improve growth and drought tolerance in wheat. Sci Rep 7:41564.
- Cheng-Hui X and Yokota A (2005) *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. Int J Syst Evol Bacteriol 55:1435-1438.
- Cho KM, Hong SY, Lee SM, Kim YH, Kahng GG, Lim YP, Kim H, Yun HD (2007) Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. Microb Ecol 54:341-351.
- Choudhary DK, Prakash WAV, Johri BN (2009) Insights of the *fluorescent pseudomonads* in plant growth regulation. Curr Sci 97:170-179.
- Costa PBC, Beneduzi A, Souza R et al (2013) The effects of different fertilization conditions on bacterial plant growth promoting traits Guidelines for directed bacterial prospection and testing. Plant Soil 368:267-280.
- Costacurta A and Vanderleyden J (1995) Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. Crit Rev Microbiol 21:1-18.
- Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JJ (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI 60p.

- Engelhard M, Hurek T, Reinhold-Hurek B (2000) Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environ Microbiol* 2:131-141.
- Estrada de Los Santos P, Bustillos-Cristales R, Caballero-Mellado J (2001) Burkholderia, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. *Appl Environ Microbiol* 67(6):2790-2798.
- Estrada GA, Baldani VLD, Oliveira DM, Urquiaga S, Baldani JI (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil*, 369:115-129.
- Fageria NK and Stone LF (2003) Manejo do nitrogênio. In: Fageria NK, Stone LF, Santos AB Manejo da fertilidade do solo para o arroz irrigado. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão.
- Fagotti DSL (2012) Bactéria diazotróficas e pó de rochas em sistemas agroecológicos de produção familiar. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina. Londrina.
- Fernandes-júnior PI, Aida ST, Morgante CV, Gava CAT, Zilli JE, Souza LSB, Marinho RCN, Nóbrega RSA, Brasil MS, Seido SL, Martins LMV (2015) The resurrection plant *Tripogon spicatus* (poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern brazilian Caatinga. *Rev Bras Ciên solo* 39:993-1002.
- Fernandes-Júnior PI, Pereira GMD, Perin L, Silva LMS, Baraúna ACB, Alves FM, Passos SR, Zilli JÉ (2013) Diazotrophic bacteria isolated from wild rice *Oryza glumaepatula* (Poaceae) in the Brazilian Amazon. *Rev Biol Trop* 61(2):991-999.
- Ferreira EPB, Knupp AM, Martin-Didonet CCC (2014) Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. *Bioscience J* 30(3):655-665.
- Ferreira JS, Guimarães SL, Baldani VLD (2011) Produção de grãos de arroz em função da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. *Enciclopédia Biosfera* 7(13):826-833.
- Furushita M, Shiba T, Maeda T, Yahata M, Kaneoka A, Takahashi Y, Trii K, Hasegawa T, Ohta M (2003) Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. *Appl Environ Microbiol* 69(9):5336-5342.
- Gordon SA and Weber RP (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiol* 26(1):192-195.
- Guimarães SG and Baldani VLD (2013) Produção de arroz inoculado com bactérias diazotróficas marcadas com resistência induzida ao antibiótico estreptomicina. *Rev Bras Ciênc Agrárias* 56(2):125-132.
- Guimarães SL, Baldani JI, Baldani VLD, Jacobneto J (2007) Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. *Pesq Agropec Bras* 42(3):393-398.
- Hizukuri S (1996) Starch: analytical aspects. In: Eliasson A-C. Carbohydrates in food. New York: Marcel Dekker; 347-429p.
- Hungria M, Campos RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331:413-425.

- Hungria M, Nogueira MA, Araujo RS (2016) Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agric Ecosyst Environ* 221:125-131.
- Hurek T and Reinhold-Hurek B (2005) Molecular ecology of N₂-fixing microbes associated with gramineous plants: hidden activities of unknown bacteria 173-198p. In D. Wearner & W.E. Newton (eds.). Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment. Springer, Dordrecht, Netherlands.
- Jesus JA (2013) Potencial biotecnológico de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para o crescimento de plantas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campus dos Goytacazes, Rio de Janeiro.
- Jiang C, Sheng X, Qian M, Wang Q (2008) Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal- contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere* 72:157-164.
- Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A (2008) A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. *Cur Microbiol* 57:503-507.
- Kaur G and Reddy MS (2014) Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocational sites. *Eur J Soil Biol* 61:35-40.
- Kavamura VN, Taketani RG, Lançon MD, Andreote FD, Mendes R, Melo IS (2013) Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiol Res* 168(4):183-191.
- Kennedy G, Burlingame B, Nguyen VN (2002) Nutritional Contribution of rice impact of biotechnology and biodiversity in rice-consuming countries. Bangkok: the International Rice Commission - Twentieth Session.
- Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecskés ML (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol Biochem* 36:229-244.
- Khalid A (2004) Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere vs. non-rhizosphere soil. *Aust J Soil Res* 42:921-926.
- Khammas KM, Ageron E, Grimont PAD, Kaiser P (1989) *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res Microbiol* 140:679-693.
- Kuss AV (2006) Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado. 109p. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria.
- Lata H, Li XC, Silva B (2006) Identification of IAA producing endophytic bacteria from micropropagated echinacea plants using 16S rRNA sequencing. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 85:353-359.
- Li HB, Singh RK, Singh P, Song Q, Xing Y, Yang L, Li Y (2017) Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. *Front Microbiol* 8:1268.

- Lin L, Li Z, Hu C, Zhang X, Chang S, Yang L, Li Y, An Q (2012) Plant growth-promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. *Microbes Environ* 27(4):391-398.
- Loaces I, Ferrando L, Scavino AF (2011) Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microb Ecol* 61(3):606-18.
- Luz W (2001) Evaluation of Plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. *Fitopatol Bras* 26(3):597-600.
- Mariosa TN (2014) Potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.) inoculadas com rizobactérias. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Itajubá. Itajubá.
- Marra ML, Soares CRFS, Oliveira SM, Ferreira PAA, Soares BL, Carvalho RF, Lima JM, Moreira FMS (2012) Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant Soil* 357:289-307.
- Martins SRO, Abreu JO, Santos DR, Carvalho FCT, Rebouças RH, Vieira RSHF, Sousa OV (2016) Atividade proteolítica em bactérias isoladas do solo da Caatinga. *Rev Biotecnol Ciência* 5(1):25-35.
- Medany MA, Hegazy AK, Kabiell HK, Maez MM (2007) Prediction of side germination and seeding growth of four crop plants as affected by root zone temperature. *WJAS* 3:714-720.
- Megías E, Reis Junior FB, Ribeiro RA, Ollero FJ, Megías M, Hungria M (2017) Genome Sequence of *Pantoea ananatis* Strain AMG 501, a Plant Growth-Promoting Bacterium Isolated from Rice Leaves Grown in Paddies of Southern Spain. *Genome Announc* 5(34):e00848-17.
- Montañez A, Blanco AR, Barlocco C, Beracochea M, Sicardi M (2012) Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. *Appl Soil Ecol* 58: 21-28.
- Naher UA, Othman R, Latif MA, Panhwar QA, Amaddin PAM, Zulkifli HS (2013) Biomolecular Characterization of Diazotrophs Isolated from the Tropical Soil in Malaysia. *Int J Mol Sci* 14:17812-17829.
- Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol* 170:(1)265-270.
- Ningsih DR, Asnani A, Fatoni A (2010) Pembuatan dekstrin dari pati ubi kayu menggunakan enzim amilase dari *Azospirillum* sp. JG3 dan karakterisasinya. *Molekul* 5(1):15-21.
- Novakowski JH, Sandini IE, Falbo MK, Cheng NC (2011) Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. *Semina: Ciênc Agrárias* 32:1687-1698.
- Ogut M, Er F, Kandemir N (2010) Phosphate Solubilization Potentials of *Acinetobacter* Strains and their Relations with Soil Properties. *Eurasian Chemico-Technological J* 12:231-239
- Oliveira AN, Oliveira LA, Andrade JS, Chagas Júnior AF (2007) Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. *Ciênc Tecnol Aliment* 27(1):61-66.
- Oliveira AR, Oliveira LA, Andrade JS, Chagas Júnior AF (2006) Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. *Ciênc. Tecnol. Aliment* 26(1): 204-210.

- Oliveira MA, Zucareli C, Ferreira AS, Domingues AR, Spolaor LT, Neves CSVJ (2015) Phosphate fertilizer and inoculation with *Pseudomonas fluorescens* in agronomic performance of corn. Rev Ciênc Agrárias 38(1):18-25.
- Pant G, Prakash A, Pavani JVP, Bera S, Deviram GVNS, Kumar A, Panchpuri M, Prasuna, RG (2015) Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. J Taibah Univ Sci 9(1):50-55.
- Patten CL and Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. Appl Environ Microbiol 68:3795-3801.
- Pedrinho EAN, Galdiano Júnior RF, Campanharo JC, Alves LMC, Lemos EGM (2010) Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. Bragantia 69(4):905-911.
- Peñafiel-Jaramillo MF, Torres-Navarrete ED, Barrera-Álvarez EA, Prieto-Encalada GH, Carriel JM, Canchignia-Martínez FH (2016) Production of indole-3-acetic acid by *Pseudomonas veronii* R4 and root formation in vine leaves “Thompson Seedless” *in vitro*. Cienc Tecnol 9(1):31-36.
- Peng S, Biswas JC, Ladha JK (2002) Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield. Pott VJ and Pott A (2000) Plantas aquáticas do Pantanal. Brasília: Embrapa, 404p.
- Procópio ARL, Procópio REL, Pizzirani-Kleiner AA, Melo IS (2012) Diversity of propanil-degrading bacteria isolated from rice rhizosphere and their potential for plant growth promotion. Genet Mol Res 11(3): 2021-2034.
- Quecine MC, Araujo WL, Rossetto PB, Ferreira A, Tsui S, Lacava PT, Mondin M, Azevedo JL and Pizzirani-Kleiner AA (2012) Sugarcane Growth Promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. Appl Environ Microbiol 78:7511-7518.
- Ramamoorthy V, Viwanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. Crop Protection 20:1-11.
- Raymond J, Siefert JL, Staples CR, Blankenship RE (2004) The natural history of nitrogen fixation. Mol Biol Evol 21:541-554.
- Reis Junior FB, Machado CTT, Machado AT, Sodek L (2008) Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. Rev Bras Ciênc Solo 32:1139-1146
- Reis Junior FB, Silva MF, Teixeira KRS, Urquiaga S, Reis VM (2004) Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. Rev Bras Ciênc Solo 28:103-113.
- Reis Júnior FB, Machado CTT, Machado AT, Mendes IC, Mehta A (2008) Isolamento, caracterização e seleção de estirpes de *Azospirillum amazonense* e *Herbaspirillum seropedicae* associadas a diferentes variedades de milho cultivadas no Cerrado. Bol Pesq desenvolv 206 - Embrapa Cerrado, 36p.
- Richardson AE and Hadobas PA (1997) Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. Can J Microbiol 43:509-16.
- Rodrigues AA, Forzani MV, Soares RS, Sibov ST, Vieira JDG (2016) Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. Pesq Agrop Tropical 46(2):149-158.

- Rodrigues LS, Baldani VLD, Reis VM and Baldani JI (2006) Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. *Pesq agrop bras* 41(2):275-284.
- Rodríguez H, Goire I, Rodríguez M (1996) Caracterización de cepas de *Pseudomonas* solubilizadoras de fósforo. *Revista ICIDCA sobre derivados de cana-de-açúcar*, 30:47-54.
- Sambrook J and Russel DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2100p.
- Sanomiya LT and Nahas E (2003) Hydrolases producers microorganisms involved in the soil carbon and nitrogen cycling. *Ciênc Rural* 33:835-842.
- Santos JS, Viana TO, Jesus CM, Baldani VLD, Ferreira JS (2015) Inoculation and Isolation of plant growth-Promoting bacteria in maize grown in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. *Rev Bras Ciênc Solo* 39(1):78-85.
- Santos TT and Varavallo MA (2011) Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciênc Biol Saúde* 32(2):199-212.
- Saran S, Isar J, Saxena RK (2007) A modified method for the detection of microbial 58 proteases on agar plates using tannic acid. *J Biochem Biophys Methods* 70:697-699.
- Sarwar M and Kremer RJ (1995) Determination of bacterially derived auxins using amicroplate method. *Lett Appl Microbiol* 20:282-285.
- Shoebitz M, Ribaudo CM, Pardo MA, Cantone ML, Ciampi L, Curá JA (2009) Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perennerhizosphere*. *Soil Biol Biochem* 41(9):768-1774.
- Shwyn B and Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochesm* 160:47-60.
- Silva E (2014) Isolamento e seleção de bactérias diazotróficas em cultivares de arroz recomendadas para plantio no Estado do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- Silva K, Cassetari AS, Lima AS, Brandt E and Pinnock E (2012) Diazotrophic *Burkholderia* species isolated from the Amazon region exhibit phenotypical, functional and genetic diversity. *Syst appl microbiol* 35(4):253-262.
- Silva Filho GN and Vidor C (2000) Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Rev Bras Ciênc Solo* 24:311-329.
- Silva K, Perin L, Gomes ML, Baraúna AC, Pereira GMD, Mosqueira CA, Costa IB, Graham O'hara G, Zilli JÈ (2016) Diversity and capacity to promote maize growth of bacteria isolated from the Amazon region. *Acta Amaz* 46(2):111-118.
- Silva LM (2010) Isolamento e caracterização de bactérias diazotróficas em arroz Selvagem (*Oryza glumaepatula* Steud) no Estado de Roraima. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista.
- Silva MF, Oliveira PJ, Xavier GR, Rumjanek NG, Reis VM (2009) Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. *Pesq Agropec Bras* 44: 1437-1443.

- Silva VMA, Martins CM, Martins SCS (2015) Atividade Celulolítica de Actinobactérias de Região Semiárida do Ceará. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico Conhecer 11: 2026-2036.
- Souza R, Beneduzi A, Ambrosini A, Costa PB, Meyer J, Vargas LK, Schoenfeld R, Passaglia LMP (2013) The effect of olant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant Soil* 366:585-603.
- Sudharhsan S, Senthilkumar S, Ranjith K (2007) Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. *Afr J Biotechnol* 6:430-435.
- Sylvester-Bradley R, Asakawa N, Latorraca S, Magalhães FMM, Oliveira LA, Pereira RM (1982) Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amaz* 12:15-22.
- Szilagyi-Zecchin V, Ikeda A, Hungria M, Adamoski D, Kava-Cordeiro V, Glienke C and Galli-Terasawa L (2014) Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express* 4:26.
- Thangam EB and Rajkumar GS (2000) Studies on the production of extracellular protease by *Alcaligenes faecalis*. *J Microbiol Biotechnol* 16: 663-666.
- Thongekkaew J, Ikeda H, Masaki K, Iefuji H (2008) An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 60(2):140-6.
- Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J Biotechnol* 91(2-3):127-41.
- Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Mol Cell Biol* 5:25-40.
- Viana TO (2012) Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista – BA. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Vitória da Conquista .
- Videira SS (2012) Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas associadas a planta de Capim-Ellefante. Tese (Doutorado m Ciências). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.
- Videira SS, Araujo JL, Rodrigues LS, Baldani VL, Baldani JI (2009) Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. *FEMS Microbiol Lett* 293(1):11-9.
- Wang H, Cao W, Cerniglia CE (1996) Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. *Int J Syst Bacteriol* 46(1):341-343.
- Yan Y, Yang J, Dou Y, Chen M (2008) Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proc Natl Acad Sci* 105:7564-7569.
- Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF (2003) Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5:539-554.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1. Localização da área de estudo, Serra do Amolar (área 1) e Corixo Bracinho (área 2) no município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Figura 2. Número de bactérias diazotróficas por área (A) e o número de bactérias diazotróficas por espécies de arroz selvagem (B), coletadas no Pantanal Sul Matogrossense em duas localidades no Corixo do Bracinho e na Serra do Amolar. O número de bactérias diazotróficas associadas às duas espécies de arroz, não apresentou diferença significativa tanto entre as áreas (Figura 2A), como também entre as espécies de plantas (Figura 2B).

Figura 3. Dendrograma de similaridade fenotípica das bactérias associadas ao arroz Selvagem *Oryza glumaepatula*. Agrupados pelo método UPGMA.

Figura 4. Dendrograma de similaridade fenotípica das bactérias associadas ao arroz Selvagem *Oryza latifolia*. Agrupados pelo método UPGMA.

Figura 5. Dendrograma de similaridade do Box-PCR, com isolados da espécie de arroz *Oryza glumaepatula*. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

Figura 6. Dendrograma de similaridade do Box-PCR dos isolados da espécie de arroz *Oryza latifolia*. Análise realizada com algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

Figura 7. Exemplos de estirpes que apresentaram atividade celulolítica. (A) 74CAG; (B) 95CAG; (C) 134CAL e (D) 82CAG.

Figura 8. Exemplos de estirpes que apresentaram atividade proteolítica. (A) 54CAG; (B) 20CAL; (C) 7CAG e (D) 100CAL.

Figura 9. Árvore filogenética baseada nas sequências 16S RNAr das estirpes bacterianas isoladas das duas espécies de arroz selvagem *Oryza latifolia* e *O.*

glumaepatula, calculada pelo algoritmo Neighbor-Joining (NJ), fornecido pelo programa MEGA V6.0.

Tabela 1. Contagem da população de bactérias, pelo número mais provável (NMP), das diazotróficas associadas às raízes das espécies de arroz no meio semisólido BMGM.

Espécies de arroz	Nºcélulas 10 ⁷ g/raiz	
	Serra do Amolar	Corixo do Bracinho
<i>Oryza latifolia</i>	1,55	1,71
<i>Oryza glumaepatula</i>	1,01	0,68

Tabela 2. Número de isolados bacterianos associado às espécies de arroz e sua distribuição em meios de cultivo semi-específico

Espécies de Arroz	NFB	JNFB	LGI	JMV	Total
<i>Oryza glumaepatula</i>	31	19	24	24	98
<i>Oryza latifolia</i>	29	27	21	26	103
Total	60	46	45	50	201

Tabela 3. Atividades biotecnológicas com respectivos índices enzimáticos, concentrações de AIA e representante com maior capacidade, detectadas nos isolados bacterianos nos meios de cultivo específicos NFb, JNfb, LGI e JMV das espécies de arroz selvagem *Oryza latifolia* e *O. glumaepatula* do Pantanal Sul Matogrossense.

Atividades Fisiológicas	Representatividade	Espécie de arroz Selvagem mais representativa	Meio de Cultivo mais representativo
Atividade Proteolítica	66% dos isolados	<i>Oryza glumaepatula</i>	NFb, JNfb e JMV
Atividade amilolítica	21% dos isolados	<i>Oryza latifolia</i>	NFb, JNfb e JMV
Atividade celulolítica	16% dos isolados	<i>Oryza latifolia</i>	JNfb
Solubilização de fosfato de cálcio	13% dos isolados	<i>Oryza latifolia</i> e <i>O. glumaepatula</i>	LGI e JMV
Produção de Ácido Indol Acético	40% dos isolados	<i>Oryza glumaepatula</i>	JNfb e NFb
Solubilização de Fosfato de Zinco	50% dos isolados	<i>Oryza glumaepatula</i>	JNfb
Solubilização de Fosfato de Cálcio (NBRIP)	52% dos isolados	<i>Oryza latifolia</i> e <i>O. glumaepatula</i>	JNfb e NFb
Produção de Sideróforo	55% dos isolados	<i>Oryza latifolia</i> e <i>O. glumaepatula</i>	JNfb e NFb

Tabela 4. Acumulo de Massa fresca e seca (mg) das espécies de arroz selvagem *Oryza latifolia* e *O. glumaepatula* do Pantanal inoculadas com estirpes selecionadas nas caracterisicas biotecnológicas e cultivadas em casa-de-vegetação .

<i>Oryza latifolia</i>			<i>Oryza glumaepatula</i>		
Tratamentos	Massa Fresca	Massa Seca	Tratamentos	Massa Fresca	Massa Seca
1CAL	27,6 ab	0,417167 abc	7CAG	24,73 abcde	0,286000 ab
18CAL	23,35 ab	0,386667 abc	15CAG	24,2 bcde	0,233167 ab
57CAL	27,36 ab	0,318500 abc	29CAG	28,68 abc	0,312500 ab
59CAL	28,78 a	0,367000 abc	30CAG	25,2 abcde	0,288500 ab
110CAL	29,72 a	0,489500 a	47CAG	25,7 abcde	0,338167 ab
153CAL	29,58 a	0,338400 abc	96CAG	26,82 abcde	0,315000 ab
156CAL	25,92 ab	0,438833 ab	132CAG	26,47abcde	0,376833 a
168CAL	25,22 ab	0,336167 abc	145CAG	20,7 cde	0,273333 ab
170CAL	20,54 ab	0,210000 bc	152CAG	24,87 abcde	0,307000 ab
171CAL	25,3 ab	0,317500 abc	155CAG	28,83 abc	0,320500 ab
173CAL	22,07 ab	0,199667 bc	163CAG	28,72 abc	0,410000 a
174CAL	23,57 ab	0,232833 abc	169CAG	27,87 abcd	0,308500 ab
179CAL	22,68 ab	0,196167 bc	177CAG	30,03 ab	0,338000 ab
182CAL	25,07 ab	0,177500 bc	180CAG	32,0 a	0,403500 a
190CAL	24,18 ab	0,237000 abc	185CAG	31,2 ab	0,333500 ab
191CAL	25,8 ab	0,226000 abc	187CAG	26,68 abcde	0,351000 ab
193CAL	22,38 ab	0,258000 abc	Inoc. com.*	20,65 de	0,112000 b
Inoc. com.*	18,62 b	0,155500 c	Sem Inoc.**	20,48 e	0,185500 ab
Sem Inoc.**	23,77ab	0,273500 abc	ZAE94	24,17 bcde	0,197000 ab
ZAE94	25,03 ab	0,302000 abc	-	-	-
CV (%)	17,3	28,38		13,4	27,72

Médias seguidas de letras minúsculas nas colunas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

CAL=Campelo Arroz Latifolia; CAG=Campelo Arroz Glumaepatula

ZAE94- *Herbaspirillum seropedicae*; *Inoculante Comercial; ** Sem inoculante

Coleta realizada 52 dias após a semeadura em caixas de isopor contendo substrato orgânico, areia e vermiculita.

Fig 1

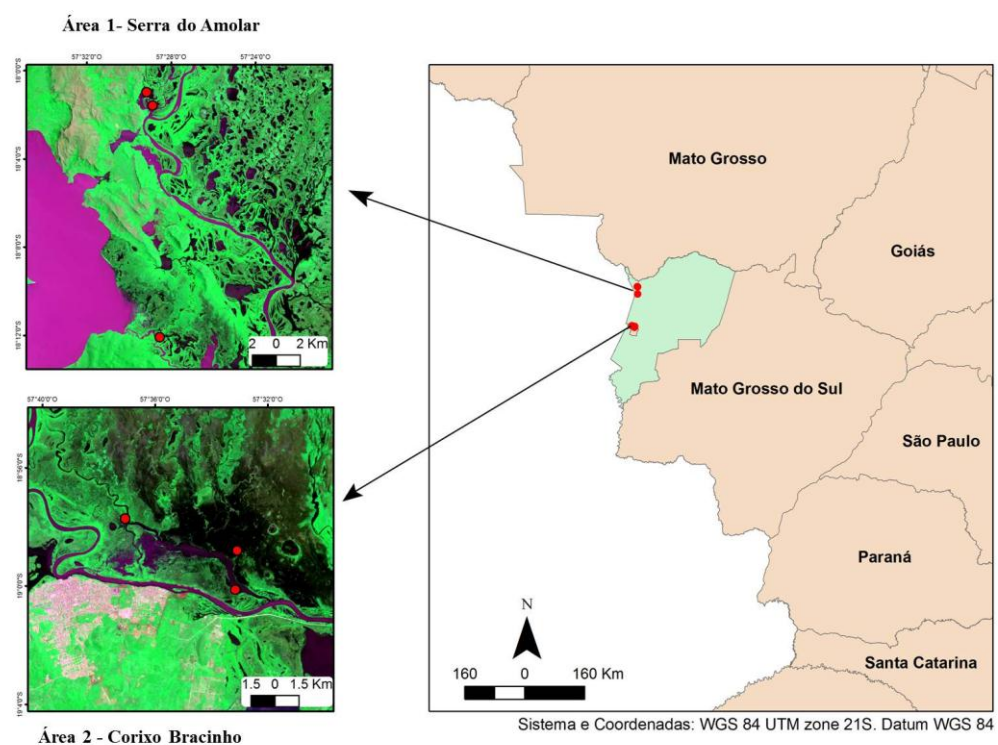


Fig. 2

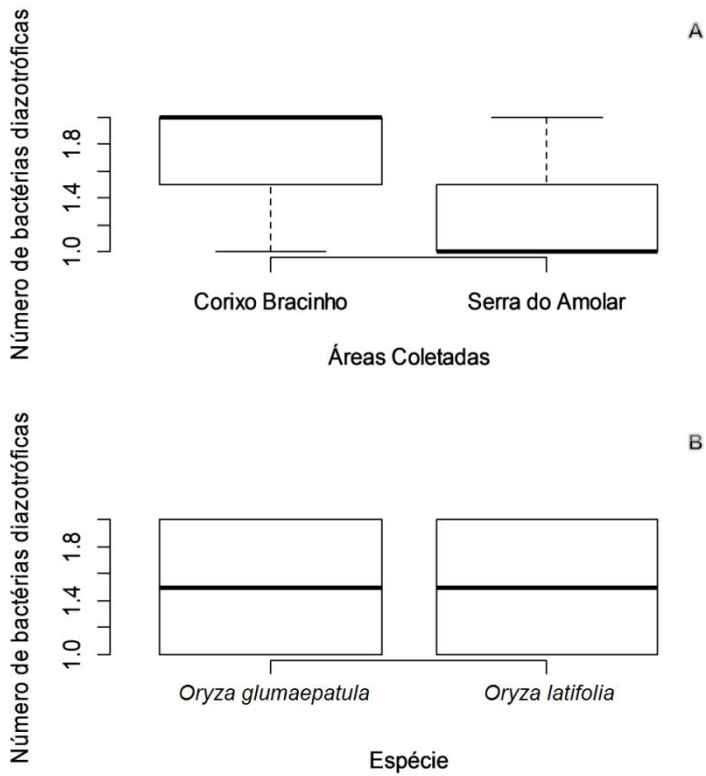


Fig. 3

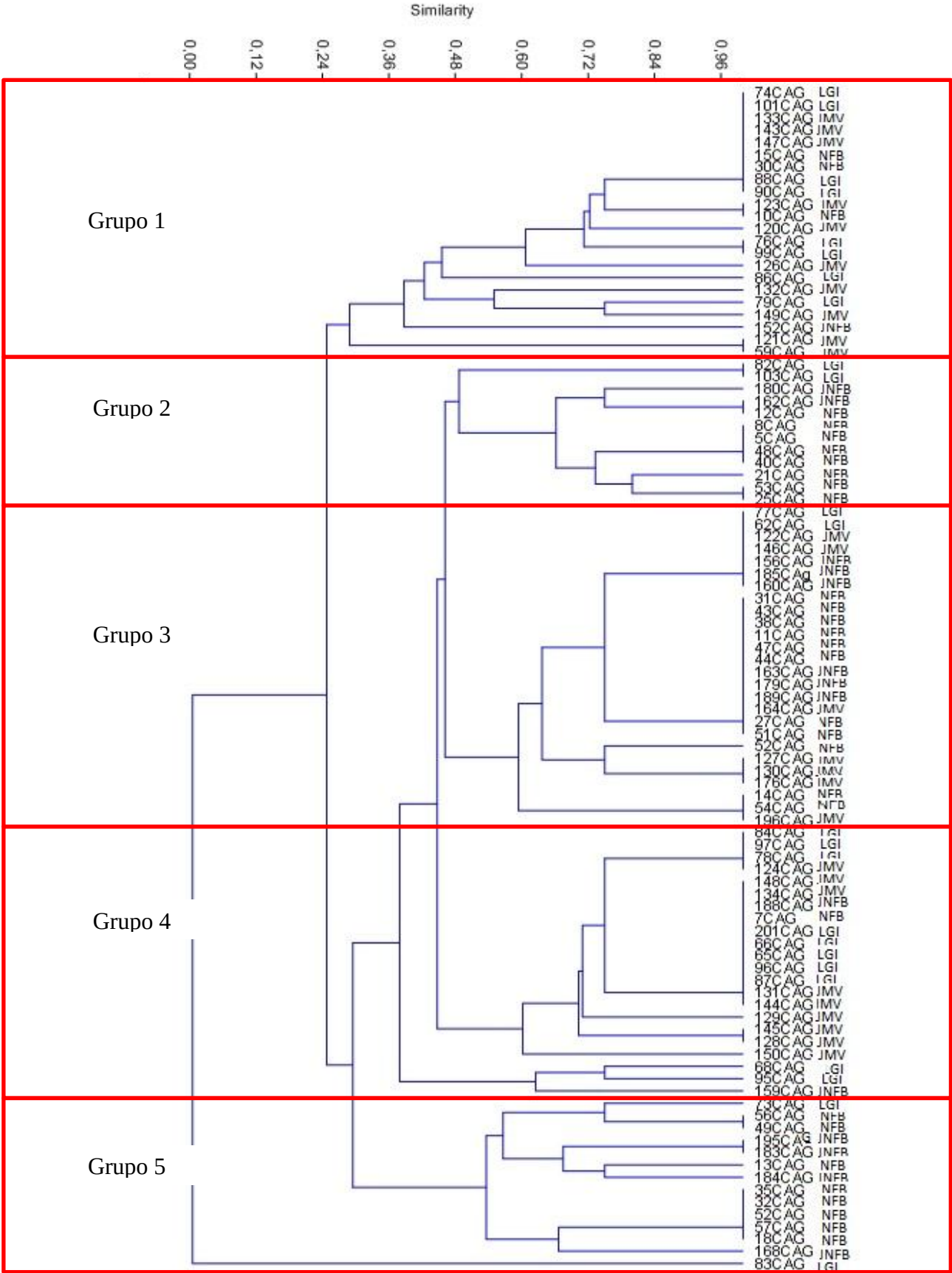
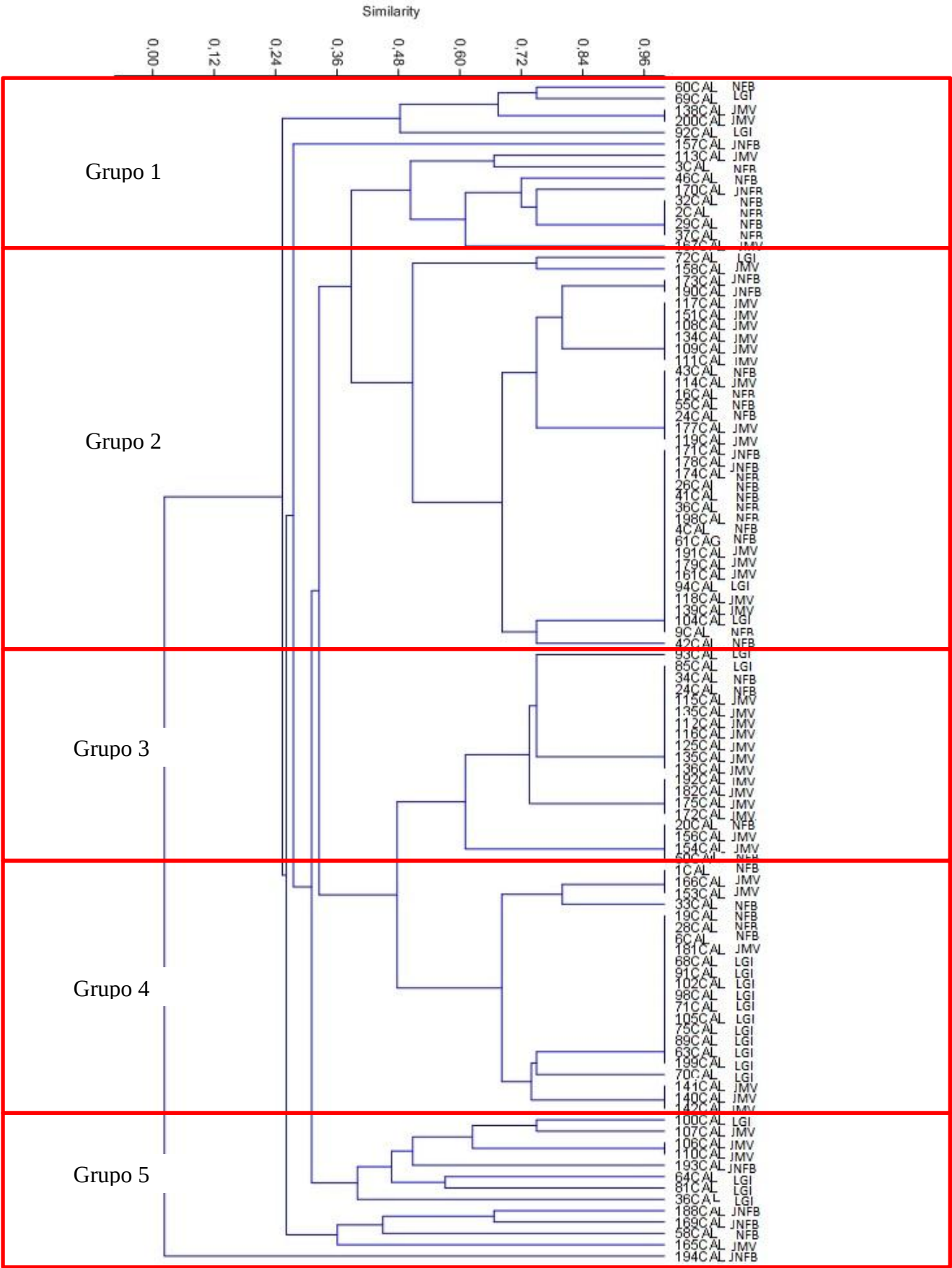
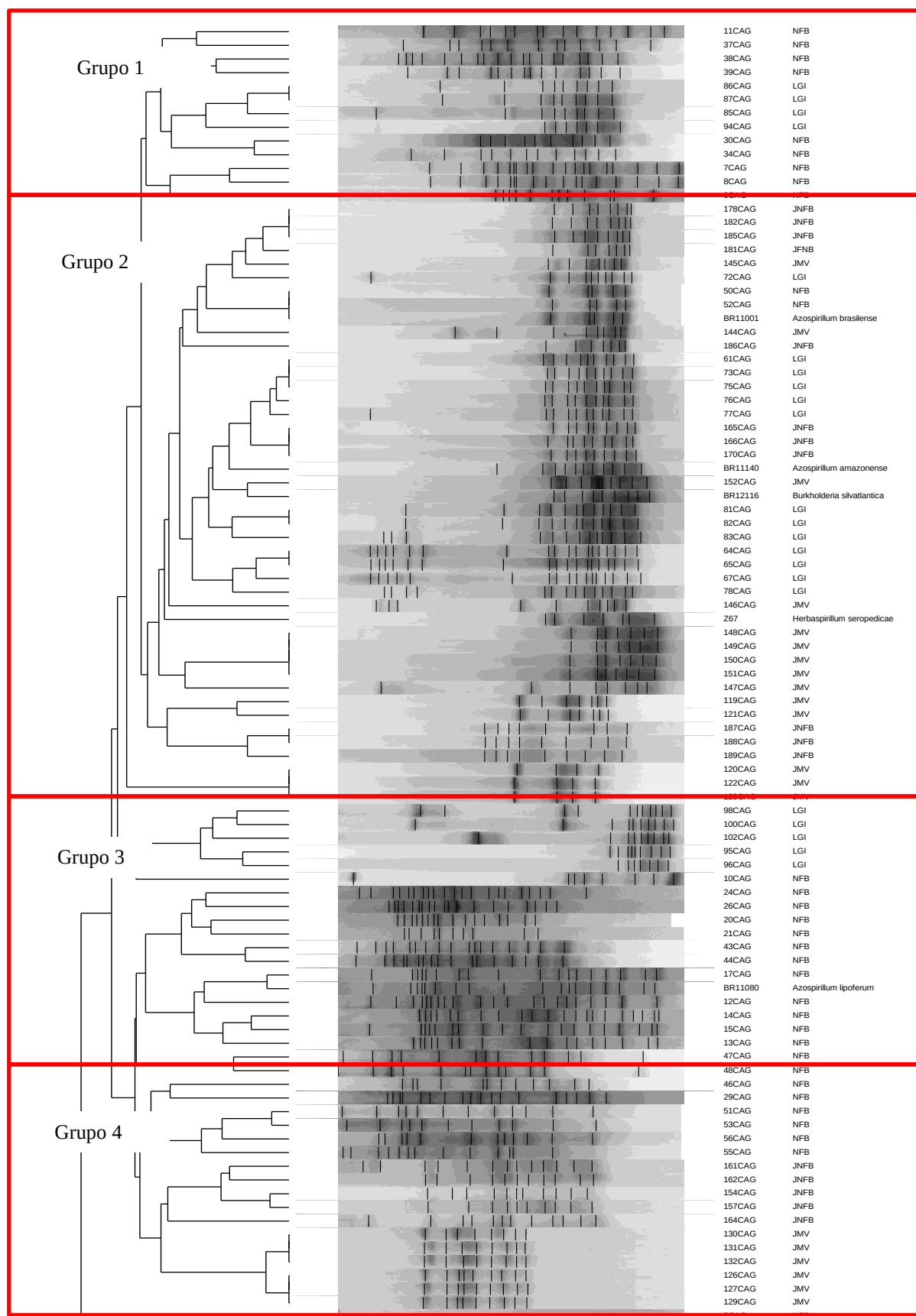


Fig. 4





Fig, 5

Fig. 6

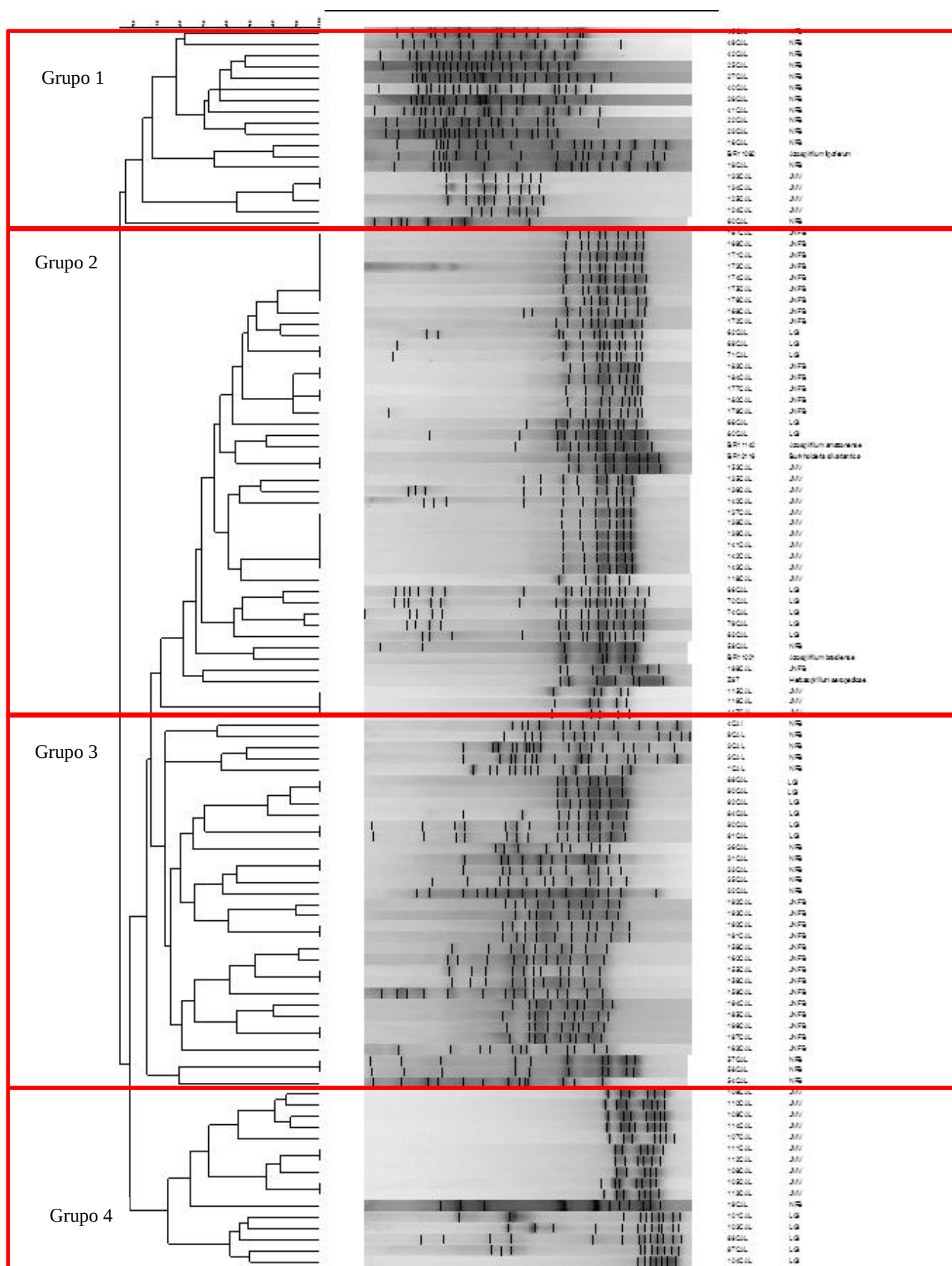


Fig. 7

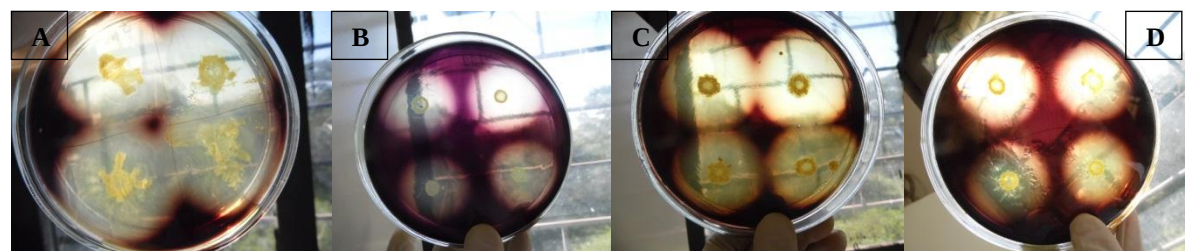


Fig. 8

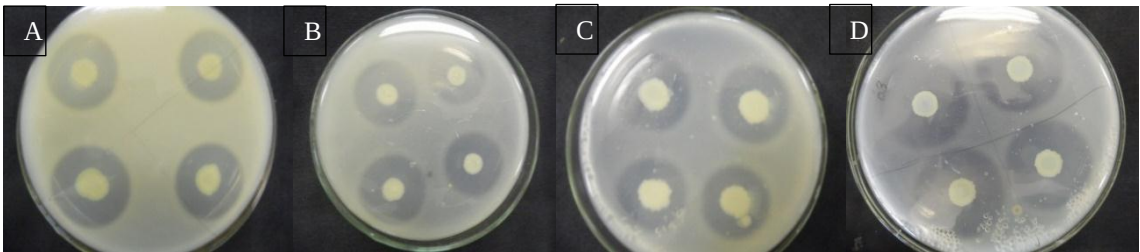
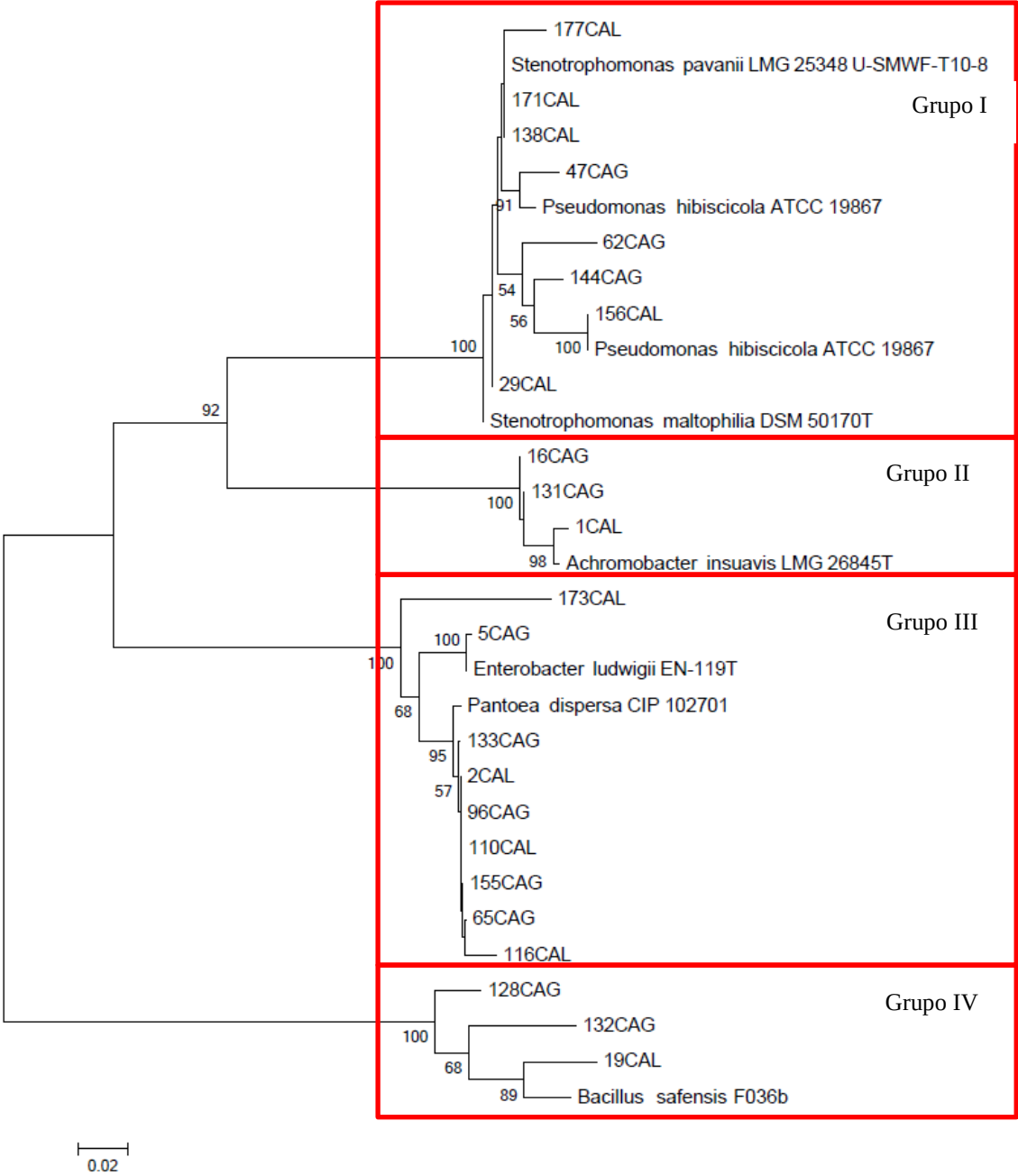


Fig. 9



Anexos

Tabela suplementar 1. Índice enzimático (mm) e produção de ácido indol acético ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) detectadas nos isolados bacterianos das espécies de arroz selvagem *Oryza latifolia* e *O. glumaepatula* do Pantanal Sul Matogrossense.

Identificação dos Isolados	Meio de Cultivo	Solubilização de Fosfato	Atividade proteolítica	Atividade amilolítica	Atividade celulolítica	Produção de ácido indol acético
1CAL	NFb	nd	2,31	Nd	2,13	nd
2CAL	NFb	nd	nd	1,87	nd	nd
5CAG	NFb	nd	2	nd	nd	9,65
6CAL	NFb	nd	2,1	nd	nd	nd
7CAG	NFb	nd	2,32	nd	nd	4,57
8CAG	NFb	nd	2,32	nd	nd	nd
9CAG	NFb	nd	2,93	nd	nd	nd
12CAG	NFb	nd	2,02	2,08	nd	nd
13CAG	NFb	nd	2,77	nd	nd	243,54
14CAG	NFb	nd	nd	2,01	nd	196,1
15CAG	NFb	nd	1,82	nd	nd	85,21
16CAG	NFb	nd	2,1	nd	nd	79,4
17CAL	NFb	nd	1,91	nd	1,84	149,5
18CAG	NFb	nd	2,12	nd	nd	126,8
19CAL	NFb	nd	nd	2,08	nd	nd
20CAL	NFb	nd	2,47	2,1	nd	nd
21CAG	NFb	nd	2,4	nd	nd	nd
22CAG	NFb	nd	1,83	nd	nd	54,57
23CAL	NFb	nd	nd	nd	nd	144,74
24CAL	NFb	nd	nd	nd	nd	123,3
25CAG	NFb	nd	2,07	2,09	nd	nd
26CAL	NFb	nd	nd	nd	nd	nd
27CAG	NFb	nd	1,82	nd	nd	167,59
28CAL	NFb	nd	nd	nd	nd	15,45
29CAG	NFb	nd	nd	nd	nd	45,19
30CAG	NFb	nd	1,91	nd	nd	145,45
31CAG	NFb	nd	nd	nd	2,26	9,48
32CAL	NFb	nd	2,17	nd	nd	5,97
33CAL	NFb	nd	2,14	2,02	nd	17,54
34CAL	NFb	nd	1,72	nd	nd	nd
35CAG	NFb	nd	2,03	nd	nd	nd
36CAL	NFb	nd	1,68	nd	nd	nd
38CAG	NFb	nd	2,01	nd	nd	nd
39CAL	NFb	nd	nd	1,69	nd	nd
40CAG	NFb	nd	1,55	nd	nd	nd
41CAL	NFb	nd	1,8	nd	1,97	9,73
43CAL	NFb	nd	1,51	2	nd	23,85

44CAG	NFb	nd	1,77	2,04	nd	51,86
45CAG	NFb	nd	1,8	1,97	nd	78,76
46CAL	NFb	1,83	nd	nd	nd	136,84
47CAG	NFb	nd	2,8	2,04	nd	167,07
48CAG	NFb	nd	1,87	nd	nd	nd
49CAG	NFb	nd	2,15	nd	nd	nd
50CAL	NFb	nd	1,65	2,09	nd	78,75
51CAG	NFb	nd	2,02	nd	2,37	43,15
52CAG	NFb	nd	2,93	nd	nd	118,07
53CAG	NFb	nd	1,76	nd	nd	43,16
54CAG	NFb	nd	1,98	nd	nd	Nd
56CAG	NFb	nd	1,57	nd	nd	nd
57CAG	NFb	nd	1,78	nd	nd	nd
58CAL	NFb	nd	2,24	nd	nd	103,68
59CAL	NFb	nd	1,79	nd	nd	31,69
60CAL	NFb	nd	nd	2,03	nd	nd
61CAG	LGI	nd	1,85	nd	nd	nd
62CAG	LGI	1,26	nd	nd	nd	13,79
63CAL	LGI	nd	nd	2,85	nd	10,21
64CAL	LGI	nd	2,01	nd	nd	nd
65CAG	LGI	2,1	2,83	nd	nd	nd
66CAG	LGI	2,14	2,57	nd	nd	nd
67CAL	LGI	nd	2,33	nd	nd	nd
68CAG	LGI	nd	2,4	nd	nd	nd
70CAL	LGI	nd	2,33	nd	nd	nd
71CAL	LGI	1,71	2,31	nd	nd	nd
72CAL	LGI	1,14	nd	nd	nd	nd
73CAG	LGI	1,47	2,41	nd	nd	nd
74CAG	LGI	nd	2,31	2,8	3,8	nd
75CAL	LGI	2,04	3,1	nd	nd	nd
76CAG	LGI	nd	2,43	nd	nd	nd
77CAG	LGI	nd	2,52	nd	nd	nd
78CAG	LGI	nd	1,76	nd	nd	nd
79CAG	LGI	nd	3,4	nd	nd	18,59
80CAL	LGI	nd	2,76	nd	nd	nd
81CAL	LGI	nd	2,53	nd	nd	96,88
82CAG	LGI	1,47	2,03	nd	2,2	nd
83CAG	LGI	nd	1,87	nd	nd	nd
84CAG	LGI	nd	2,06	1,91	nd	nd
85CAL	LGI	1,38	2,2	1,51	nd	11,75
87CAG	LGI	1,18	nd	1,68	nd	nd
90CAG	LGI	2,02	1,91	nd	nd	nd
92CAL	LGI	nd	2,3	1,61	nd	17,71
93CAL	LGI	1,82	nd	nd	nd	nd
94CAG	LGI	nd	nd	nd	nd	75,61
95CAG	LGI	nd	2,56	2,24	3,1	nd

96CAG	LGI	nd	1,7	nd	nd	79,97
97CAG	LGI	2,03	nd	nd	nd	31,07
98CAL	LGI	nd	3,14	nd	nd	nd
99CAG	LGI	1,49	2,65	nd	nd	nd
100CAL	LGI	nd	3,28	nd	nd	nd
101CAG	LGI	nd	2,7	nd	nd	nd
102CAL	LGI	1,54	2,57	nd	nd	nd
103CAG	LGI	2,7	1,9	nd	nd	nd
104CAL	LGI	1,7	nd	nd	nd	nd
105CAL	LGI	1,67	nd	2,01	nd	nd
108CAL	JMV	1,62	2,35	nd	nd	nd
109CAL	JMV	nd	nd	2,27	nd	nd
110CAL	JMV	nd	3,5	nd	nd	108,07
114CAL	JMV	1,78	nd	nd	nd	nd
115CAL	JMV	Nd	1,85	nd	nd	nd
117CAL	JMV	Nd	2,31	2,07	nd	nd
120CAG	JMV	Nd	1,85	nd	nd	nd
122CAG	JMV	Nd	2,37	nd	nd	nd
124CAG	JMV	Nd	2,8	1,45	nd	nd
125CAL	JMV	Nd	2,23	nd	1,57	nd
126CAG	JMV	nd	1,93	nd	nd	nd
129CAG	JMV	nd	3,9	nd	nd	nd
130CAG	JMV	1,67	nd	nd	1,74	nd
131CAG	JMV	nd	2,4	nd	nd	nd
132CAG	JMV	nd	2,18	nd	nd	19,4
133CAG	JMV	nd	nd	2,76	nd	135,02
134CAL	JMV	nd	2	1,8	2,2	5,72
135CAL	JMV	nd	nd	1,9	nd	nd
136CAL	JMV	nd	2,54	nd	nd	nd
137CAL	JMV	nd	1,55	1,8	nd	nd
138CAL	JMV	2,07	2,04	nd	nd	nd
140CAL	JMV	nd	2,09	nd	nd	nd
142CAL	JMV	nd	1,6	nd	nd	nd
143CAG	JMV	2,09	nd	nd	nd	nd
144CAG	JMV	1,23	nd	nd	nd	nd
145CAG	JMV	nd	3,97	nd	nd	nd
146CAG	JMV	nd	2	nd	nd	nd
147CAG	JMV	nd	2,65	nd	nd	nd
149CAG	JMV	nd	2,35	2,3	nd	nd
150CAG	JMV	nd	2,6	2,48	nd	nd
151CAG	JMV	nd	2,3	nd	nd	nd
152CAG	JMV	nd	2,15	nd	nd	117,36
153CAL	JMV	nd	nd	nd	nd	177,56
154CAL	JNFb	nd	1,86	1,95	1,74	nd
155CAG	JNFb	nd	2,22	nd	nd	156,64
156CAL	JNFb	1,68	2,26	2,15	2,48	1,51

157CAL	JNFb	nd	1,85	2,01	1,59	Nd
158CAL	JNFb	nd	1,84	nd	nd	Nd
159CAG	JNFb	nd	1,78	nd	nd	108,07
160CAG	JNFb	nd	2,28	nd	nd	124,02
161CAL	JNFb	nd	nd	nd	nd	205,69
162CAG	JNFb	nd	nd	nd	nd	87,2
163CAG	JNFb	nd	2,12	1,86	nd	176,64
164CAG	JNFb	nd	nd	nd	nd	104,39
165CAL	JNFb	nd	1,24	1,85	1,84	nd
166CAL	JNFb	nd	nd	nd	nd	151,93
167CAL	JNFb	nd	1,9	nd	nd	nd
168CAG	JNFb	nd	2,35	nd	1,67	243,78
169CAL	JNFb	1,41	2,14	nd	1,73	161,16
170CAL	JNFb	nd	nd	nd	nd	149,98
171CAL	JNFb	nd	1,81	nd	3,07	160,45
172CAL	JNFb	nd	2,05	nd	nd	nd
173CAL	JNFb	nd	2,19	nd	1,78	144,21
174CAL	JNFb	nd	2,38	nd	nd	173,07
175CAL	JNFb	nd	2,05	nd	nd	nd
176CAG	JNFb	nd	2,01	nd	nd	88,59
177CAL	JNFb	nd	1,88	1,92	1,48	169,12
178CAL	JNFb	nd	1,78	nd	nd	133,34
179CAG	JNFb	nd	2,25	nd	2,43	206,88
180CAG	JNFb	nd	nd	nd	nd	271,4
182CAL	JNFb	nd	2,45	nd	1,69	161,64
183CAG	JNFb	nd	2,24	nd	1,52	nd
184CAG	JNFb	nd	2,06	1,91	nd	nd
185CAG	JNFb	nd	1,77	2	1,83	145,61
187CAG	JNFb	nd	2,8	1,97	nd	168,07
188CAL	JNFb	nd	1,9	nd	1,62	205,45
189CAL	JNFb	nd	2,25	nd	2,43	122,38
190CAL	JNFb	nd	2,61	nd	1,94	171,05
191CAL	JNFb	nd	2,16	nd	1,72	209,5
192CAL	JNFb	nd	2,01	2,03	3	nd
193CAL	JNFb	nd	1,5	nd	1,7	119,64
194CAL	JNFb	nd	2,4	1,8	1,74	139,74
195CAG	JNFb	nd	1,86	nd	1,73	nd
196CAG	JNFb	nd	1,8	nd	2,4	nd
197CAG	JNFb	nd	1,88	nd	nd	135,02
200CAL	JMV	nd	1,87	nd	nd	nd
201CAG	JMV	nd	2,54	nd	nd	nd
BR11101	NFB	-	1,8	1,7	2,7	65,21
BR11192	LGI	-	2,5	2,1	1,87	18,07
BR 11175	LGI	-	2,21	1,9	2,52	20,36

CAL=Campelo Arroz Latifolia; CAG=Campelo Arroz Glumaepatula; “nd” = Nenhuma atividade enzimática detectada. BR 11175- *Herbaspirillum seropedicae*; BR11101- *Azospirillum brasiliense*; BR11192- *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Tabela suplementar 2. Solubilização de Cálcio, Zinco e produção de sideróforo dos isolados bacterianos que foram selecionados para o experimento na casa de vegetação, das espécies de arroz selvagem *Oryza latifolia* e *O. glumaepatula* do Pantanal.

Identificação Isolados	Área de Coleta	Meio de Cultivo	Solubilização de cálcio (NBRIP)	Solubilização de Zinco	Produção de Sideróforo
1CAL	Bracinho	NFb	nd	2,28	1,58
5CAG	Bracinho	NFb	nd	nd	nd
7CAG	Bracinho	NFb	2,22	2,32	nd
9CAG	Bracinho	NFb	nd	nd	1,41
12CAG	Amolar	NFb	1,5	2,26	1,92
15CAG	Amolar	NFb	nd	2,57	2,7
16CAG	Bracinho	NFb	nd	nd	nd
17CAL	Bracinho	NFb	nd	nd	nd
18CAG	Amolar	NFb	nd	nd	nd
19CAL	Bracinho	NFb	1,47	1,68	1,8
25CAG	Bracinho	NFb	1,78	nd	1,67
27CAG	Bracinho	NFb	1,97	nd	nd
29CAL	Bracinho	NFb	nd	1,43	nd
30CAG	Amolar	NFb	1,37	nd	nd
32CAL	Bracinho	NFb	1,87	2,91	1,74
37CAL	Bracinho	NFb	nd	nd	nd
44CAG	Amolar	NFb	1,3	2,25	1,59
46CAG	Bracinho	NFb	1,52	nd	nd
47CAG	Amolar	NFb	1,44	2,7	nd
51CAG	Bracinho	NFb	1,3	nd	1,43
52CAG	Amolar	NFb	nd	1,57	1,84
53CAG	Bracinho	NFb	nd	nd	nd
57CAG	Amolar	NFb	2,03	2,49	1,89
59CAL	Amolar	NFb	1,8	nd	1,83
62CAG	Amolar	LGI	nd	nd	nd
64CAL	Amolar	LGI	nd	1,69	nd
65CAG	Bracinho	LGI	2,35	nd	nd
73CAG	Amolar	LGI	nd	2,04	nd
74CAL	Amolar	LGI	2,01	nd	nd
75CAL	Bracinho	LGI	nd	2,15	1,77
78CAG	Bracinho	LGI	nd	1,61	Nd
79CAL	Bracinho	LGI	nd	nd	nd
81CAL	Amolar	LGI	nd	1,89	nd
83CAG	Amolar	LGI	1,23	1,85	nd
84CAG	Amolar	LGI	1,25	2,23	nd
94CAL	Bracinho	LGI	nd	1,88	nd
96CAG	Bracinho	LGI	1,48	nd	nd
97CAL	Bracinho	LGI	nd	1,72	nd
98CAL	Bracinho	LGI	1,86	nd	nd

99CAL	Amolar	LGI	1,44	nd	nd
100CAL	Amolar	LGI	nd	nd	nd
101CAG	Amolar	LGI	nd	nd	nd
104CAL	Amolar	LGI	2,5	nd	nd
107CAL	Amolar	JMV	1,53	nd	nd
109CAL	Amolar	JMV	1,54	nd	nd
110CAL	Amolar	JMV	nd	nd	nd
116CAL	Bracinho	JMV	nd	nd	nd
121CAG	Amolar	JMV	nd	nd	nd
128CAG	Amolar	JMV	nd	nd	nd
129CAG	Amolar	JMV	nd	nd	nd
130CAG	Amolar	JMV	1,92	nd	1,82
131CAG	Amolar	JMV	2,37	nd	nd
132CAG	Amolar	JMV	2,25	3,61	nd
133CAG	Amolar	JMV	nd	nd	nd
134CAL	Amolar	JMV	nd	nd	nd
135CAL	Bracinho	JMV	nd	nd	nd
138CAL	Bracinho	JMV	1,98	nd	nd
143CAG	Amolar	JMV	2,02	1,81	nd
144CAG	Amolar	JMV	nd	nd	1,73
145CAG	Amolar	JMV	nd	1,91	nd
149CAG	Bracinho	JMV	1,68	nd	nd
152CAG	Amolar	JMV	1,36	1,8	nd
153CAL	Bracinho	JMV	2,64	3,02	1,49
155CAG	Amolar	JNFb	nd	1,84	nd
156CAL	Bracinho	JNFb	1,89	1,71	nd
163CAG	Bracinho	JNFb	1,76	2,17	1,8
168CAL	Bracinho	JNFb	1,35	2,2	1,57
169CAL	Amolar	JNFb	nd	nd	nd
170CAL	Amolar	JNFb	1,31	nd	nd
171CAL	Amolar	JNFb	1,5	1,79	nd
172CAL	Bracinho	JNFb	nd	1,84	nd
173CAL	Amolar	JNFb	1,4	1,96	2,1
174CAL	Amolar	JNFb	nd	1,86	nd
177CAG	Bracinho	JNFb	nd	Nd	1,53
179CAL	Bracinho	JNFb	1,49	1,85	1,9
180CAG	Bracinho	JNFb	1,81	Nd	1,74
182CAL	Bracinho	JNFb	nd	1,83	1,67
183CAL	Amolar	JNFb	1,6	1,52	1,6
185CAG	Amolar	JNFb	2,44	2	1,37
187CAG	Bracinho	JNFb	nd	1,87	2,01
188CAG	Amolar	JNFb	nd	Nd	nf
189CAL	Bracinho	JNFb	nd	1,98	2,05
190CAL	Amolar	JNFb	1,75	1,54	1,98
191CAL	Bracinho	JNFb	nd	Nd	1,54
193CAL	Amolar	JNFb	2,56	2,98	1,93

195CAL	Amolar	JNFb	1,58	2,01	1,65
SP59	-	-	1,67	2	1,87
BR11363	-	-	2,06	2,14	nd
Z94	-	-	2,01	1,8	1,79

CAL=Campelo Arroz Latifolia; CAG=Campelo Arroz Glumaepatula; “nd” = Nenhuma atividade enzimática detectada. Z94- *Herbaspirillum seropedicae*; SP59- *Azospirillum lipoferum*; BR11363- *Burkholderia tropica*

Tabela suplementar 3. Similaridade filogenética das estirpes bacterinas isoladas das duas espécies de arroz selvagem *Oryza glumaepatula* e *O. latifolia* do Pantanal Sul Matogrossense.

Identificação dos Isolados	Similaridade fisiológica das estirpes com base nas sequências de 16S rRNA			
	Similaridade	E Value	Identidade (%)	Número de Acesso
1CAL	<i>Achromobacter insuavis</i> strain LMG 26845 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	NR_11770 6.1
2CAL	<i>Pantoea dispersa</i> strain DSM 30073 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	NR_11679 7.1
5CAG	<i>Enterobacter ludwigii</i> strain EN-119 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	99	NR_14666 7.2
12CAG*	<i>Acinetobacter soli</i> strain B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98	NR_04445 4.1
15CAG*	<i>Enterobacter tabaci</i> strain YIM Hb-3 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	98	NR_14666 7.2
16CAG	<i>Achromobacter insuavis</i> strain LMG 26845 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98	NR_11770 6.1
19CAL	<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC 100820 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	97	NR_11394 5.1
25CAG*	<i>Achromobacter insolitus</i> strain LMG 6003 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99	NR_02568 5.1
29CAL	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain IAM 12423 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	99	NR_04157 7.1
30CAG**	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i> strain MK06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	97	NR_11740 6.1
32CAL**	<i>Enterobacter tabaci</i> strain YIM Hb-3 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	97	NR_14666 7.2
47CAG	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain LMG 958 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	99	NR_11922 0.1
59CAL**	<i>Phytobacter diazotrophicus</i> strain LS 8 16S ribosomal RNA, partial sequence	0.0	97	NR_11586 9.1
62CAG	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> strain LMG 25348 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98	NR_11800 8.1

64CAL**	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> strain LMG 25348	0.0	98	NR_11800
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			8.1
65CAG	<i>Pantoea dispersa</i> strain DSM 30073	0.0	99	NR_11679
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			7.1
73CAG**	<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC 100820	0.0	98	NR_11394
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			5.1
75CAL**	<i>Staphylococcus warneri</i> strain AW 25	0.0	98	NR_02592
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			2.1
79CAG**	<i>Pantoea dispersa</i> strain DSM 30073	0.0	98	NR_11679
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			7.1
83CAG**	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> strain MCCC 1A08372	0.0	99	NR_14878
	16S ribosomal RNA, partial sequence			6.1
96CAG	<i>Pantoea dispersa</i> strain DSM 30073	0.0	99	NR_11679
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			7.1
97CAG**	<i>Pseudomonas luteola</i> strain NBRC 103146	0.0	98	NR_11421
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			5.1
98CAL*	<i>Pantoea dispersa</i> strain DSM 30073	0.0	99	NR_11679
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			7.1
99CAG**	<i>Pantoea dispersa</i> strain DSM 30073	0.0	98	NR_11679
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			7.1
100CAL**	<i>Pantoea dispersa</i> strain DSM 30073	0.0	97	NR_11679
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			7.1
101CAG*	<i>Pantoea dispersa</i> strain DSM 30073	0.0	98	NR_11679
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			7.1
104CAL*	<i>Enterobacter tabaci</i> strain YIM Hb-3	0.0	98	NR_14666
	16S ribosomal RNA, partial sequence			7.2
109CAG**	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> strain LMG 25348	0.0	98	NR_11800
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			8.1
110CAL	<i>Pantoea dispersa</i> strain DSM 30073	0.0	99	NR_11679
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			7.1
116CAL	<i>Pantoea dispersa</i> strain DSM 30073	0.0	98	NR_11679
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			7.1
121CAL*	<i>Paenibacillus tyrfis</i> strain MSt1	0.0	97	NR_13725
	16S ribosomal RNA, partial sequence			5.1
128CAG	<i>Bacillus cereus</i> strain CCM 2010	0.0	99	NR_11571
	16S ribosomal RNA, partial sequence			4.1
129CAG**	<i>Bacillus safensis</i> strain NBRC 100820	0.0	98	NR_11394
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence			5.1
131CAG	<i>Achromobacter insuavis</i> strain LMG 26845	0.0	99	NR_11770

	16S ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>6.1</u>
132CAG	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581 16S	0.0	99		<u>NR_11747</u>
	ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>3.1</u>
133CAG	<i>Pantoea dispersa</i> strain DSM 30073 16S	0.0	98		<u>NR_11679</u>
	ribosomal RNA gene, partial sequenc				<u>7.1</u>
135CAL**	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i> strain MK06	0.0	98		<u>NR_11740</u>
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>6.1</u>
138CAL	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> strain LMG 25348	0.0	99		<u>NR_11800</u>
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>8.1</u>
143CAG*	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain IAM	0.0	98		<u>NR_04157</u>
	12423 16S ribosomal RNA, partial sequence				<u>7.1</u>
144CAG	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> strain LMG 25348	0.0	98		<u>NR_11800</u>
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>8.1</u>
155CAG	<i>Pantoea dispersa</i> strain DSM 30073 16S	0.0	99		<u>NR_11679</u>
	ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>7.1</u>
156CAL	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> strain ATCC 19867	0.0	99		<u>NR_02470</u>
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>9.1</u>
163CAG*	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain IAM	0.0	98		<u>NR_04157</u>
	12423 16S ribosomal RNA, partial sequence				<u>7.1</u>
168CAG**	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> strain LMG 25348	0.0	97		<u>NR_11800</u>
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>8.1</u>
169CAL**	<i>Burkholderia rinojensis</i> strain A396 16S	0.0	98		<u>NR_11770</u>
	ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>6.1</u>
171CAL	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> strain LMG 25348	0.0	99		<u>NR_11800</u>
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>8.1</u>
173CAL	<i>Pantoea dispersa</i> strain LMG 2603 16S	0.0	97		<u>NR_04388</u>
	ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>3.1</u>
177CAL	<i>Stenotrophomonas pavanii</i> strain LMG 25348	0.0	98		<u>NR_11800</u>
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>8.1</u>
180CAG	<i>Pantoea dispersa</i> strain LMG 2603 16S	0.0	98		<u>NR_11675</u>
	ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>5.1</u>
182CAL	<i>Achromobacter insuavis</i> strain LMG 26845	0.0	99		<u>NR_11770</u>
	16S ribosomal RNA gene, partial sequence				<u>6.1</u>
183CAG	<i>Burkholderia kururiensis</i> subsp. <i>thiooxydans</i>	0.0	99		<u>NR_11600</u>
	strain ATSB13 16S ribosomal RNA gene,				<u>7.1</u>
	partial sequence				
187CAG**	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain NBRC	0.0	100		<u>NR_11395</u>
	100911 16S ribosomal RNA gene, partial				<u>7.1</u>
	sequence				

*Analise a partir da sequencia do primers Amp2 ; **Analise a partir da sequencia do primers 27f

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As duas espécies de arroz selvagem estudadas apresentam alta associação com bactérias diazotróficas em suas raízes. Os isolados bacterianos obtidos das duas espécies têm alta diversidade morfológica e genética. As bactérias isoladas das duas espécies apresentam potencial para degradação de celulose, amido e proteína. Além da capacidade de solubilizar de fosfato de zinco e de cálcio e produzir de sideróforos. A produção de ácido indol acético esteve presente em quase metade dos isolados. A partir da análise do sequenciamento parcial do gene 16s foram identificados isolados pertencentes aos gêneros: *Pantoea*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* e *Bacillus*. Os tratamentos com os isolados 110CAL inoculada na espécie de arroz *O. latifolia* e 180CAG na *O. glumaepatula*, bactérias pertencentes ao gênero *Pantoea*, se destacaram aumentaram tanto a massa fresca e quanto a massa seca, apresentando potencial para estimular o crescimento vegetal nas plantas nas duas espécies de arroz selvagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahemad, M. & Kibret, M. (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science*, 26:1-20.
- Araújo, A.E.S; Rossetto, C.A.V.; Baldani, V.L.D. & Baldani, J.I. (2010) Rice seed germination and vigour affected by the inoculation with diazotrophic bacteria. *Ciência agrotecnologia*, Lavras 34(4):932-939.
- Araujo, F.F. & Guerreiro, R.T. (2010) Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. *Ciência e Agrotecnologia*, 34:837-844.
- Baldani, J.I. (1984) Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz. 110 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

- Baldani, J.I.; Caruso, L.V.; Baldani, V.L.D.; Goi, S.R. & Dobereiner, J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 29:911-922.
- Baldani, V.L.D. & Döbereiner, J. (1980) Host-plant especificity in infection of cereal with *Azospirillum* spp. *Soil Biology & Biochemistry* 12:433-440.
- Beg, Q.K. & Gupta, R. (2003) Purification and characterization of an oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*. *Enzyme Microbiology Technology*, 32:294-304.
- Beneduzi, A.; Costa, P.B.; Moreira, F. & Passaglia, L.M.P. (2013) Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecology*, 63(1):94-104.
- Bertazzoni, E.C. & Damasceno-Junior, G.A. (2011) Aspecto da biologia e fenologia de *Oryza latifolia* Desv. (Poaceae) no Pantanal Sul-mato-grossense. *Acta Botanica Brasilica* 2:476-486.
- Biswas, J.C.; Ladha, J.K. & Dazzo, F.B. (2000) Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of Lowland rice. *Soil Scientific Society American*, Madison, 64:1644-1650.
- Boiero, L.; Perrig, D.; Masciarelli, O.; Penna, C.; Cassán, F. & Luna, V. (2007) Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74: 874-880.
- Brasil (2015) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mercado Interno. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/cultura/arroz>. Acesso em: janeiro, 2018.
- Brasil, S.M. (2005) Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em variedades de arroz. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Seropédica.
- Buso, G.S.C.; Rangel, P.H. & Ferreira, M.E. (1998) Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology*, 7(1): 107-117.
- Cardoso, I.C.M.C.; Klauberg Filho, O.; Mariotto, J.R.; Miquelluti, D.J.; Vicente, D. & Neves, A.N. (2010) Ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em arroz irrigado no estado de Santa Catarina. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. Lages, 9(2):178-186.

- Carrim, A.J.I.; Barbosa, E.C. & Vieira, J.D.G. (2006) Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, 49(3):353-359.
- Cassán, F.D. & Garcia De Salamone, I. (2008) (Ed.) *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología 268p.
- Castro, R.A.; Quecine, M.C.; Lacava, P.T.; Batista, B.D.; Luvizotto, D.M.; Marcon, J.; Ferreira, A.; Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (2014) Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacterial associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. SpringerPlus, 3:382.
- Chang, T.T. (1976) The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asian and African rices. Euphytica, 25:425-441.
- Cheng-Hui, X. & Yokota, A. (2005) *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55:1435-1438.
- Cho, K.M.; Hong, S.Y.; Lee, S.M.; Kim, Y.H.; Kahng, G.G.; Lim, Y.P.; Kim, H. & Yun, H.D. (2007) Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. Microbial Ecology, 54:341-351.
- Chouldhury, A.T.M.A. & Kennedy, I.R. (2004) Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. Biology and Fertility of Soils, 39(4):219-227.
- CONAB. Companhia Nacional De Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileiro – grãos: Nono levantamento, 2016. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento (2017) Disponível em: <<https://www.conab.gov.br>> . Acesso em: maio 2018.
- Costa, P.B.C.; Beneduzi, A.; Souza, R.; Schoenfeld, R.; Vargas, L.K. & Passaglia, L.M.P. (2013) The effects of different fertilization conditions on bacterial plant growth promoting traits Guidelines for directed bacterial prospection and testing. Plant Soil, 368:267-280.
- Daniel, B.M. (2012) Qualidade nutricional do arroz nativo (*Oryza latifolia*) da Região Pantanal do Estado de Mato Grosso do Sul, Parboilizado. 53p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

- Elbetagy, A.; Nishioka, K.; Sato, T.; Suzuki, H.; Ye, B.; Hamada, T.; Isawa, T.; Mitsui, H. & Minamisawa, K. (2001) Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied Environmental Microbiology*, 67(11):5285-5293.
- Embrapa Arroz e Feijão. Dados de conjuntura da produção de arroz (*Oryza sativa* L.) no Brasil (1985-2013) (2016) Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Acesso em: Janeiro de 2018.
- Engelhard, M., Hurek, T. & Reinhold-Hurek, B. (2000) Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. *Environment Microbiology*, 2:131-141.
- Enrich- Prast (1998) Importância de *Oryza glumaepatula* Steud. (arroz bravo) na recuperação do igapó. In: Bozelli, R.L., Esteves, F. de A. & Roland, F. (Org.) Lago Batata: Impacto e recuperação de um ecossistema amazônico O Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé, Rio de Janeiro 249-260p.
- Estrada G.A., Baldani V.L.D., de Oliveira D.M., Urquiaga S. & Baldani J.I. (2013). Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. *Plant Soil*, 369:115-129.
- Fageria, N.K. & Stone, L.F. (2003) Manejo do nitrogênio. In: Fageria, N.K., Stone, L.F. & Santos, A.B. Manejo da fertilidade do solo para o arroz irrigado. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 51-9p.
- Fagotti, D.S.L. (2012) Bactéria diazotróficas e pó de rochas em sistemas agroecológicos de produção familiar. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia.
- FAO. Faostat – Statistics Database, dados de 2016 (2017) Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat>>. Acesso em: maio 2018.
- Fernandes-júnior, P.; Aidar, S.T.; Morgante, C.V.; Gava, C.A.T.; Zilli, J.E.; Souza L.S.B.; Marinho, R.C.N.; Nóbrega, R.S.A.; Brasil, M.S.; Seido, S.L.; Martins, L.M.V. (2015) The resurrection plant *Tripogon spicatus* (poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern brazilian Caatinga. *Revista Brasileira de Ciência do solo* 39:993-1002.

- Fernandes-Júnior, P.I.; Pereira, G.M.D.; Perin L.; Silva L.M.S.; Baraúna A.C.B.; Alves, F.M.; Passos, S.R & Zilli, J.É (2013) Diazotrophic bacteria isolated from wild rice *Oryza glumaepatula* (Poaceae) in the Brazilian Amazon. *Revista de Biologia Tropical* 61(2):991-999.
- Ferreira, J.S.; Guimarães, S.L. & Baldani, V.L.D. (2011) Produção de grãos de arroz em função da inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. *Enciclopédia Biosfera*, 7(13):826-833.
- Guimarães, S.G. & Baldani, V.L.D. (2013) Produção de arroz inoculado com bactérias diazotróficas marcadas com resistência induzida ao antibiótico estreptomicina. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, 56(2):125-132.
- Guimarães, S.L.; Baldani, J.I.; Baldani, V.L.D. & Jacobneto, J. (2007) Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42(3):393-398.
- Harland, J.R. & de Wet, J.M.J. (1971) Towards rational classification of cultivated plants. *Taxon*, 20(4):509-517.
- Hungria, M.; Campos, R.J.; Souza, E.M. & Pedrosa, F.O. (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331:413-425.
- Hungria, M.; Nogueira, M.A.; Araujo, R.S. (2016) Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agriculture Ecosystems e Environment*, 221:125-131.
- IRRI - International Rice Research Institute. Rice Knowledge Bank. Disponível em: www.knowledgebank.irri.org/wildricetaxonomy. Acesso em janeiro de 2018.
- Jesus, J.A. (2013) Potencial biotecnológico de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para o crescimento de plantas. 107p. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.
- Jiang, C.; Sheng, X.; Qian, M. & Wang, Q. (2008) Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal- contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*, 72:157-164.

- Kansoh, S.A.; Amany, L. & Essam, A.N. (1999) Biodegradation and utilization of bagasse with *Trichoderma reessie*. *Polymer Degradation and Stability*, 63(6):273-278.
- Kennedy, G.; Burlingame, B. & Nguyen, V.N. (2002) Nutritional Contribution of rice impact of biotechnology and biodiversity in rice-consuming countries. Bangkok: the International Rice Commission -Twentieth Session.
- Khalid, A. (2004) Relative efficiency of rhizobacteria for auxin biosynthesis in rhizosphere vs. non-rhizosphere soil. *Australian Journal of Soil Research*, Melbourne, 42:921-926.
- Khammas, K.M.; Ageron, E.; Grimont, P.A.D. & Kaiser, P. (1989) *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology, Paris*, 140:679-693.
- Khush, G.S. (1997) Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Molecular Biology*, The Netherlands, 35:25-34.
- Ladha J. K.; Padre, A.T.; Punzulan G.C. & Watanabe I. (1982) Nitrogen-fixing (C₂H₂-reducing) activity and plant growth characters of 16 wetland rice varieties. *Soil Science & Plant Nutrition*, 33:91-106.
- Li, H.; Singh, K.R.; Singh, P.; Song, Q.; Xing, Y.; Yang, L. & Li, Y. (2017) Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. *Frontiers in Microbiology*, 8:1268.
- Lindermann, W.C. & Glover, C.R. (2003) Nitrogen fixation by legumes. Cooperative Extension Service -College of Agriculture and home Economics. Guide A-129:4.
- Loaces, I.; Ferrando, L. & Scavino A.F. (2011) Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice. *Microbial Ecology*, 61(3):606-18.
- Luz, W. (2001) Evaluation of Plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 26(3):597-600.
- Mariosa, T.N. (2014) Potencial de enraizamento de estacas semilenhosas de oliveira (*Olea europaea* L.) inoculadas com rizobactérias. 68p. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Itajubá programa de pós-graduação em meio ambiente e recursos hídricos.
- Marra, M.L.; Soares, C.R.F.S.; Oliveira, S.M.; Ferreira, P.A.A.; Soares, B.L.; Carvalho, R.F.; Lima, J.M. & Moreira, F.M.S. (2012) Biological nitrogen fixation and

- phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil*, 357:289-307.
- Megías, E.; Reis Junior, F.B; Ribeiro, R.A; Ollero, F.J.; Megías, M. & Hungria, M. (2017) Genome Sequence of *Pantoea ananatis* Strain AMG 501, a Plant Growth-Promoting Bacterium Isolated from Rice Leaves Grown in Paddies of Southern Spain. *Genome Announc*, 5(34):e00848-17.
- Morais, O.P.; Rangel, P.H.N.; Fagundes, P.R.R.; Castro, E.M.; Neves, P.C.F.; Cutrin, V.A.; Prabhu, A.S.; Brondani, C.; Magalhães Jr, A.M. (2006) Melhoramento genético. In: A cultura do arroz no Brasil. Santos, A.B.; Stone, L.F.; Vieira, N.R.A. (eds). 2 ed. ver. Ampl. - Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão 321-396.
- Ningsih, D.R.; Asnani, A. & Fatoni, A. (2010) Pembuatan dekstrin dari pati ubi kayu menggunakan enzim amilase dari *Azospirillum* sp. JG3 dan karakterisasinya. *Molekul*, 5(1):15-21.
- Novakowski, J.H.; Sandini, I.E.; Falbo, M.K.; Moraes, A. & Cheng, N.C. (2011) Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. *Semina: Ciências Agrárias*, 32:1687- 1698.
- Oliveira, M.A.; Zucareli, C.; Ferreira, A.S.; Domingues, A.R.; Spolaor, L.T. & Neves, C.S.V.J. (2015) Phosphate fertilizer and inoculation with *Pseudomonas fluorescens* in agronomic performance of corn. *Revista de Ciências Agrárias* 38(1):18-25.
- Pascual, C.S.C.I. (2009) Efeitos da parbolização do arroz (*Oryza sativa* L.) Integral sobre os compostos bioativos e a disponibilidade de amido. 102p. Tese (Doutorado) - Faculdade Ciências Farmacêutica/Universidade de São Paulo.
- Pedrinho, E.A.N; Galdiano Júnior, R.F; Campanharo, J.C; Alves, L.M.C. & Lemos, E.G.M. (2010) Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. *Bragantia*, Campinas, 69(4):905-911.
- Peñafiel-Jaramillo M.F.; Torres-Navarrete E.D.; Barrera-Álvarez, E.A.; Prieto-Encalada, G.H.; Carriel, J.M. & Canchignia-Martínez, F.H. (2016) Production of indole-3-acetic acid by *Pseudomonas veronii* R4 and root formation in vine leaves “Thompson Seedless” in vitro. *Ciencia y Tecnología*, 9(1):31-36.
- Peng, S.; Biswas, J.C. & Ladha, J.K. (2002) Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. *Agronomy Journal*, 94:925–929.
- Pott, V.J. & Pott, A. (2000) Plantas aquáticas do Pantanal. Brasília: Embrapa, 404p.

- Prochnow, R. (2002) Alternativas Tecnológicas para produção integrada de arroz orgânico. Tese (Mestrado em Agroecossistemas) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Reed, S.C.; Cleveland, C.C. & Townsend, A.R. (2008) Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42:489-512.
- Reinhold-Hurek, B.; Hurek, T.; Gillis, M.; Hoste, B.; Vancanneyt, M.; Kersters, K. & De Ley, J. (1993) *Azoarcus* gen. nov., nitrogen- fixing proteobacteria associated with roots of *Kallar grass* (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth) and description of two species *Azoarcus indigens* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43:574-584.
- Rodrigues, A.A.; Forzani, M.V.; Soares, R.S.; Sibov, S.T. & Vieira, J.D.G (2016) Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. *Pesquisa Agropecuaria Tropical, Goiânia*, 46(2):149-158.
- Rodríguez, H. & Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances, Oxford* 7:319-339.
- Rubim, M.A.L. (1994) A case study on life-history of wild rice - From germination to emergence of inflorescence. In: Morishima, H. & Martins, P.S. (Ed) "Investigations of plant genetic resources in the Amazon Basin with emphasis on the genus *Oryza*. Report of 1992/1993 Amazon Project.
- Rubim, M.A.L. (1995) Ciclo de vida, biomassa e composição química de duas espécies de arroz silvestre da Amazônia Central. 126 p. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas - INPA/FUA.
- Santos, A. B.; Stone, L.F. & Vieira, N. R.A. (2006) A Cultura do arroz no Brasil. Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2ª Ed, 1000p.
- Santos, C.E.R.S; Freitas, A.D.S.; Vieira, I.M.M.B. & Colaço, W. (2008) Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais. In: figueiredo, M.V.B.; Burity, H.A.; Stamford, N.P. & Santos, C.E.R.S. *Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. Agrolivros*, 1:17-43.

- Shoebitz, M.; Ribaudó, C.M.; Pardo, M.A.; Cantore, M.L.; Ciampi, L. & Curá, J.A. (2009) Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perennerhizosphere*. *Soil Biology & Biochemistry*, 41(9):768-1774.
- Silva, M.F.; Oliveira, P.J.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G. & Reis, V.M. (2009) Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44: 1437-1443.
- Sindarroz (2000) A história do arroz. Disponível em: <http://www.sindarroz-sc.com.br> Acesso em: janeiro 2018.
- Souza, R.; Beneduzi, A.; Ambrosini, A.; Costa, P.B.; Meyer, J.; Vargas, L.K.; Schoenfeld, R. & Passaglia, L.M.P. (2013) The effect of olant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant Soil*, 366:585-603.
- Szilagyi-Zecchin, V.; Ikeda, A.; Hungria, M.; Adamoski, D.; Kava-Cordeiro, V.; Glienke, C. & Galli-Terasawa, L. (2014) Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *Applied and Industrial Microbiology and Biotechnology*, 4:26.
- Terres, A.L.S.; Fagundes, P.R.R.; Machado, M.O.; Magalhães-Junior, A.M. & Nune, D.D.M. (2004) Melhoramento genético e cultivares de arroz irrigado. In: Gomes, A.S. & Magalhães-Junior, A.M. (Eds.). *Arroz irrigado no sul do Brasil*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 161-226p.
- Thangam, E.B. & Rajkumar, G.S. (2000) Studies on the production of extracellular protease by *Alcaligenes faecalis*. *Journal of Microbiology & Biotechnology* 16: 663-666.
- Thongekkaew, J.; Ikeda, H.; Masaki, K. & Iefuji, H. (2008) An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 60(2):140-6.
- USDA - United States Departament of Agriculture (2012). Disponível em: <http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=B%20VS&hidReportRetrievalID=681&hidReportRetrievalTemplateID=7> Acessado em janeiro de 2018.

- Verma, S.C.; Ladha, J.K. & Tripathi, A.K. (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Jornal Biotechnology*, 91(2-3):127-41.
- Videira, S.S.; Araujo, J.L.; Rodrigues, L.S.; Baldani, V.L. & Baldani, J.I. (2009) Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. *FEMS Microbiology Letters*, 293(1):11-9.
- Yan, Y.; Yang, J.; Dou, Y. & Chen, M. (2008) Nitrogen fixation island and rhizosphere competence traits in the genome of root-associated *Pseudomonas stutzeri* A1501. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105:7564-7569.
- You, C.B. & Zhou, F.Y. (1989) Non-nodular endorhizospheric nitrogen fixation in wetland rice. *Canadian Journal Microbiology*, 35:403.