

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**Ocorrência de Bactérias Endofíticas Associadas a  
Variedades de Cana-de-açúcar Cultivadas nos  
Estados: Alagoas e Pernambuco**

**Cecília de Souza Antônio**

**2010**



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

**OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS A  
VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS NOS ESTADOS:  
ALAGOAS E PERNAMBUCO**

**CECÍLIA DE SOUZA ANTÔNIO**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Veronica Massena Reis**

*e Co-orientação da Professora*  
**Vera Lúcia Divan Baldani**

Dissertação submetida como  
requisito parcial para obtenção do  
grau de **Mestre em Ciências**, no  
Curso de Pós-Graduação em  
Agronomia, Área de Concentração  
em Ciência do Solo

Seropédica, RJ  
Abril de 2010

633.61  
A627o  
T

Antônio, Cecília de Souza, 1975-

Ocorrência de bactérias endofíticas associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas nos estados: Alagoas e Pernambuco / Cecília de Souza Antônio – 2010.

63 f.

Orientador: Veronica Massena Reis.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 37-47.

1. Cana-de-açúcar – Fixação de nitrogênio – Teses. 2. Cana-de-açúcar – Adubos e fertilizantes - Teses. 3. Bactérias endofíticas – Teses. 4. Bactérias diazotróficas – Teses. I. Reis, Veronica Massena, 1961-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta dissertação, desde que seja citada a fonte.

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

**CECÍLIA DE SOUZA ANTÔNIO**

Dissertação a ser submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20 / 04 / 2010

---

Verônica Massena Reis. Dra. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Eduardo Lima Dr. UFRRJ

---

Fábio Lopes Olivares Dr. UENF

## AGRADECIMENTOS

Ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

A CAPES pela bolsa concedida.

À Embrapa Agrobiologia pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Verônica Massena Reis, pela orientação científica, pela amizade, confiança e respeito.

À minha co-orientadora, Dr<sup>a</sup>. Vera Divan Baldani, pela paciência, amizade e profissionalismo.

Aos professores do CPGA-CS, em especial a Lúcia dos Anjos e Marcos Gervasio.

Aos membros da banca examinadora, pela predisposição em analisar este trabalho.

Aos colegas dos laboratórios de Gramíneas, Genética e Bioquímica, Joilson, Lia, Gabi, Marinete, Aline, Patrícia, Péricles, Gemam, Sandy e Helma, e aos demais alunos.

Aos funcionários e vigias da Embrapa Agrobiologia, em especial ao Wilson, Lúcio, Claudinho e Altiberto.

Ao Marquinhos e Roberto, pela amizade e por estarem sempre dispostos a resolver os entraves burocráticos.

À Sandra e Carol, colegas da pós-graduação, por compartilharem comigo mais dois anos de estudo.

Ao meu grande amigo, Geraldo Baeta, pelo carinho.

Ao José Marcos, pelo amor, estímulo e especialmente pela compreensão e companheirismo nos momentos de desespero.

À minha mãe e pai pelo o apoio, amor, carinho e compreensão que deram a mim durante toda a minha vida.

A Deus por me permitir este momento.

## **BIOGRAFIA**

CECÍLIA DE SOUZA ANTÔNIO, filha de Miguel Antônio e Angela Maria Bandeira Antônio, nasceu em 05 de novembro de 1975 na Cidade do Rio de Janeiro. Ingressou no Centro Interescolar Estadual Miécimo da Silva no Rio de Janeiro/RJ, concluindo o curso técnico em Edificações no ano de 1994. Graduiu-se em Engenharia Agrônômica na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no ano de 2005. Atuou como bolsista de apoio técnico do CNPq junto a Embrapa Agrobiologia, na linha de pesquisa FBN em não leguminosas, de setembro de 2006 a fevereiro de 2008. Em março de 2008 ingressou no Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do solo na UFRRJ, como bolsista da CAPES.

## RESUMO

ANTÔNIO, Cecília de Souza. **Ocorrência de bactérias endofíticas associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas nos estados: Alagoas e Pernambuco.** 2010. 51f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ, 2010.

A cana-de-açúcar é um dos principais produtos agrícolas do Brasil. A cultura é capaz de se associar as bactérias diazotróficas (fixam nitrogênio do ar), que podem estar no interior do tecido da planta (endofíticas). As bactérias diazotróficas endofíticas são capazes de promover o crescimento da cana-de-açúcar por meio da fixação biológica do nitrogênio (FBN) ou pela produção de fitormônios. Mas pouco se conhece sobre as populações presentes destas bactérias em cana-de-açúcar. O presente trabalho visou estudar a diversidade da população e identificar estes isolados, através de métodos moleculares e fisiológicos, assim como avaliar a eficiência de alguns isolados na promoção de crescimento vegetal de plantas de cana-de-açúcar no campo. Foi observada em meio sólido Batata, com 95% de similaridade, a formação de sete grupos mostrando a grande variação morfológica de colônias neste meio testado. Muitos isolados apresentaram características similares ao gênero *Gluconacetobacter*, quando analisados em meio semi-sólido LGI-P e sólido Batata-P e LGI-P. Dois isolados foram mais eficientes na síntese de indóles com produções acima de 49 µg/mL. Todos os isolados foram classificados como Gram negativos. Dos 36 isolados avaliados, 27,5% foram semelhantes à estirpe padrão RB 11366 (*Burkholderia tropica*); 45% a BR 11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e 5% aos demais padrões BR 11335 (*Herbaspirillum seropedicae*), BR 11504 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) e BR 11145 (*Azospirillum amazonense*). Através da comparação do seqüenciamento do gene 16S rDNA com o NCBI GenBank o isolado 215 foi identificado com pertencente a espécie de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, o 179-1A com pertencente a espécie *Burkholderia tropica* e os isolados 151-B, 211-A e 219 ao gênero *Burkholderia*. As estirpes 160-1 e 215 inoculadas promoveram aumento na produção de biomassa seca da palha (acima de 0,7 Mg.ha<sup>-1</sup>) e nitrogênio total da folha bandeira (acima de 69,7 kg.ha<sup>-1</sup>), respectivamente nas variedades RB 72454 e RB 918639 testadas. Apenas o isolado 160-1 foi capaz de promover um aumento de biomassa seca na variedade RB 867515. A produção de colmos foi maior para a variedade RB918639 com 191,96 Mg.ha<sup>-1</sup>.

**Palavras – chave:** FBN. Seqüenciamento da 16SrDNA. Bactérias diazotróficas.

## ABSTRACT

ANTONIO, Cecília de Souza. **Occurrence of endophytic bacteria associated with varieties of sugar cane grown in the states: Alagoas and Pernambuco.** 2010. 51p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2010.

The sugar cane is one of the major agricultural products in Brazil. The crop is able to associate with diazotrophic bacteria (fix nitrogen from the air), that may be located inside the plant tissue (entophytic). The diazotrophic bacteria are capable of promoting growth of sugar cane by means of biological nitrogen fixation (BNF) or production of hormones. But little is known about populations of these bacteria present in sugar cane. This work aimed to study diversity of the population and identify the isolates by molecular and physiological methods, as well as to assess the effectiveness of some isolates to promote plant growth of sugar cane in the field. In solid potato media, there were observed the formation of seven groups, with 95% of similarity, showing the great colonies morphology variation. Many isolates showed similar characteristics to the genus *Gluconacetobacter*, when analyzed in semi-solid LGI-P media and solid Potato-P and LGI-P media. Two isolates were most efficient in the endolar synthesis with production over 49 µg/mL. All isolates were classified as Gram negative. Of the 36 isolates, 27.5% were similar to the standard strain RB 11366 (*Burkholderia tropica*), 45% to BR 11281 strain (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) and 5% to the other patterns BR 11335 (*Herbaspirillum seropedicae*), BR 11504 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) and BR 11145 (*Azospirillum amazonense*). Through the comparison of the sequencing of 16S rDNA with the NCBI GenBank isolate 215 was identified as belonging to species *Gluconacetobacter diazotrophicus*, the 179-1a belonging to *Burkholderia tropica* and the isolated 151-B, 211-A, and 219 to the gender *Burkholderia*. The inoculated strains 160-1 and 215 promoted an increase in the straw dry biomass (up to 0.7 Mg ha<sup>-1</sup>) and total nitrogen of flag leaf (above 69,7 kg ha<sup>-1</sup>), respectively in the tested varieties RB 72454 and RB 918,639. Only the 160-1 isolate was able to promote increase in biomass in the RB 867515 variety. Stalk yield was higher for the variety RB 918639 with 191.96 Mg ha<sup>-1</sup>.

**Key words:** BFN. Sequencing of 16S rDNA. Diazotrophic bacteria.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Aspectos do processo de fixação do nitrogênio atmosférico por via industrial e biológica.....	17
<b>Tabela 2.</b> Lista dos isolados selecionados para análise polifásica.....	23
<b>Tabela 3.</b> Iniciadores utilizados para seqüenciamento do gene 16S DNAr dos isolados bacterianos. Todos na concentração de 5 pmoles/ul.....	27
<b>Tabela 4.</b> Análise de solo realizada pelo laboratório de Solo da Embrapa Agrobiologia.....	28
<b>Tabela 5.</b> Número de células por grama de peso fresco de bactérias diazotróficas associadas a variedades de cana-de-açúcar obtidas no Estado de Alagoas e pré-germinadas em casa de vegetação (primeiro isolamento).....	31
<b>Tabela 6.</b> Número de células por grama de matéria fresca obtida a partir de amostras de cana-de-açúcar obtidas no Estado de Alagoas e pré-germinadas em casa de vegetação (segundo isolamento).....	32
<b>Tabela 7.</b> Número de células por grama de matéria fresca obtida a partir de amostras de cana-de-açúcar obtidas no Estado de Pernambuco e pré-germinadas em casa de vegetação (terceiro isolamento).....	33
<b>Tabela 8.</b> Número de células por grama de matéria fresca obtida a partir de amostras de cana-de-açúcar obtidas no Estado de Pernambuco e pré-germinadas em casa de vegetação (quarto isolamento).....	34
<b>Tabela 9.</b> Fontes de carbono usadas pelos grupos formados em dendrograma construído a partir de uma matriz binária e analisado pelo programa NTSYS, índice SM.....	38
<b>Tabela 10.</b> Morfologia das células dos isolados bacterianos e estirpes padrões de cana-de-açúcar.....	40
<b>Tabela 11.</b> Análise no programa MegaBLAST do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA.....	43
<b>Tabela 12.</b> Produtividade de colmos (Mg/ha) das variedades da cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia.....	46
<b>Tabela 13.</b> Produtividade da MS dos colmos (Mg.ha <sup>-1</sup> ) das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia.....	47
<b>Tabela 14.</b> Produtividade da MS das folhas bandeira (Mg.ha <sup>-1</sup> ) das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia.....	47
<b>Tabela 15.</b> Produtividade da MS das palhas (Mg.ha <sup>-1</sup> ) das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia.....	48
<b>Tabela 16.</b> Produtividade da MS total (Mg.ha <sup>-1</sup> ) das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa	

Agrobiologia.....	48
<b>Tabela 17.</b> Análises dos teores de N total ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) no colmo das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia.....	49
<b>Tabela 18.</b> Análises dos teores de N total ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) na folha bandeira das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia.....	49
<b>Tabela 19.</b> Análises dos teores de N total ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) na palha das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia.....	50
<b>Tabela 20.</b> Análises dos teores de N total ( $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) na parte aérea das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia.....	50

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** a) Toletes de cana contendo três gemas, b) Toletes em imersão no meio de cultura contendo microrganismos endofíticos, por 30 minutos microrganismos endofíticos por 30 minutos.....29
- Figura 2.** Tipos de colônias observadas no meio BATATA. A: pertencentes ao grupo 1. B: grupo 2, C: grupo 3, D: grupo 4, E: grupo 5, F: grupo 6 e G: grupo 7.....35
- Figura 3.** Dendrograma de similaridade de 40 isolados, provenientes de variedades de cana-de-açúcar e das estirpes padrões: PPe8 (RB 11366-*Burkholderia tropicalis*); PAL 5 (BR 11281-*Gluconacetobacter diazotrophicus*), HRC 54 (BR 11335-*Herbaspirillum seropedicae*), HCC 103 (BR 11504-*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) e CBAMC (BR 11145-*Azospirillum amazonense*). Gerado no programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir da caracterização de colônias em meio sólido BATATA.....36
- Figura 4.** Dendrograma de similaridade de isolados, provenientes de variedades de cana-de-açúcar gerado no programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir da avaliação da utilização de várias fontes e concentrações de carbono e em meio semi-sólido JMV, JNFB, LGI e LGI-P.....38
- Figura 5.** Produção de hormônio auxina por isolados bacterianos diazotróficos associados à cana-de-açúcar.....39
- Figura 6.** Isolados bacterianos a) 220; b) 259; c) 219 d) estirpe padrão BR 11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) submetidos à coloração GRAM.....40
- Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose 2% do produto de amplificação da região flanqueada pelo par de iniciadores 27f e R1492 para o gene 16S. PM: Marcador de Peso Molecular Low DNA Mass Ladder – Invitrogen. Isolados (1-40).....42
- Figura 8.** Árvore filogenética baseada nas seqüências parciais do gene 16S DNAr dos isolados com mais de 700pb e proteobactérias fixadoras de nitrogênio do banco de dados NCBI. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. A análise de *bootstrapping* foi calculada com 1000 repetições.....44
- Figura 9.** Árvore filogenética baseada nas seqüências parciais do gene 16S DNAr dos isolados com menos de 700pb e proteobactérias fixadoras de nitrogênio do banco de dados NCBI. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. A análise de *bootstrapping* foi calculada com 1000 repetições.....45

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>NMP</b>	Número Mais Provável
<b>BMS</b>	Biomassa Seca
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>rDNA</b>	DNA ribossomal
<b>TAE</b>	Tris, Acetato, EDTA
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
<b>PC</b>	Produtividade do Colmo
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Informação Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
<b>FBN</b>	Fixação Biológica de Nitrogênio
<b>rpm</b>	Rotações por minuto

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
2.1. A Cultura da Cana-de-açúcar .....	2
2.2. Taxonomia Bacteriana.....	2
2.3. Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV) .....	3
2.3.1. Produção de fitormônios.....	3
2.3.2. Fixação biológica de nitrogênio (FBN).....	3
2.4. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio .....	4
2.5. Fixação Biológica de Nitrogênio na Cultura de Cana-de-Açúcar .....	4
2.6. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio na Cana-de-Açúcar .....	5
2.6.1. Gênero <i>Herbaspirillum</i> .....	5
2.6.2. Gênero <i>Gluconacetobacter</i> .....	5
2.6.3. Gênero <i>Burkholderia</i> .....	6
2.6.4. Gênero <i>Azospirillum</i> .....	6
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
3.1. Origem dos Isolados .....	7
3.2. Contagem e Isolamento .....	7
3.3. Ativação dos Isolados.....	8
3.4. Caracterizações Fisiológicas dos Isolados.....	8
3.4.1. Caracterização morfológica das colônias .....	8
3.4.2. Crescimento em meio semi-sólido .....	10
3.4.3. Avaliação da capacidade de produção do hormônio auxina (AIA).....	10
3.4.4. Avaliação da morfologia celular.....	11
3.4.5. Reação de Gram.....	11
3.5. Caracterizações Moleculares dos Isolados .....	11
3.5.1. Extração do DNA genômico.....	11
3.5.2. Amplificação do gene 16S DNAr.....	12
3.5.3. Reação de sequenciamento do gene 16S DNAr .....	12
3.6. Avaliação dos Efeitos da Inoculação de Isolados e Estirpes Tipo de Bactérias Diazotróficas em Variedades de Cana-de-açúcar .....	13
3.6.1. Bactérias e variedades utilizadas .....	13
3.6.2. Localização, característica do clima, solo e delineamento experimental.....	13
3.6.3. Adubação da área.....	14
3.6.4. Preparação do veículo turfoso .....	14
3.6.5. Preparação do inoculante.....	14
3.6.6. Plantio.....	14
3.7 Determinações .....	15
3.7.1 Massa seca da parte aérea (MS) e produtividade de colmos (PC).....	15
3.7.2 Teores de nitrogênio total na parte aérea (N total) .....	15
3.7.3 Análises estatísticas .....	15

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>16</b>
4.1. Contagem e Isolamento .....	16
4.2. Ativação dos Isolados .....	19
4.3. Caracterizações Fenotípicas .....	19
4.3.1. Caracterização morfológica das colônias .....	19
4.3.2. Cultivo em meio de cultura semi-sólido.....	22
4.3.3. Avaliação da capacidade de produção do hormônio auxina (AIA).....	24
4.3.4. Avaliação da morfologia celular.....	24
4.3.5. Reação GRAM .....	25
4.4. Caracterização Molecular .....	26
4.4.1. Extração do DNA genômico.....	26
4.4.2. Amplificação do gene 16S DNAr.....	26
4.4.3. Reação de sequenciamento do gene 16S DNAr .....	27
4.5. Análises da Produtividade de colmos (PC) e da Massa Seca da Parte Aérea (MS) .....	30
4.6. Análises dos Teores de N Total na Parte Aérea .....	33
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar tem uma grande importância no cenário nacional principalmente na geração de energia. Esta cultura está associada a bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) que são importantes microrganismos por seu alto potencial agrícola. Há vários efeitos positivos nas plantas atribuídos a estas bactérias, como o controle biológico de pragas e doenças, fixação biológica de nitrogênio, indução de resistência sistêmica, produção de antibióticos, produção de fitohormônios como as auxinas e o etileno (OLIVEIRA et al., 2003). Estes efeitos são capazes de promoverem direta ou indiretamente o crescimento da planta. E este crescimento reflete muitas vezes no aumento da produtividade da cultura. A cana-de-açúcar está associada a algumas BPCV que são capazes de fixar o nitrogênio presente no ar e transferir-lo para a planta. Estas bactérias são conhecidas como diazotróficas e o processo como fixação biológica de nitrogênio (FBN).

A FBN vem contribuindo para a redução do uso dos adubos nitrogenados no Brasil. O nitrogênio é um dos nutrientes mais exigidos no ciclo de produção de muitas culturas. Um elemento que tem alto custo econômico e é facilmente perdido por volatilização e lixiviação. Culturas leguminosas como a soja tem até 94% do N requerido fornecido pela FBN (HUNGRIA et al., 2006). Em plantas não-leguminosas como a cana-de-açúcar a contribuição pode chegar a 70% (POLIDORO et al., 2002; URQUIAGA et al., 1992). Contudo o conhecimento de quais gêneros ou espécies de bactérias diazotróficas que estão associadas à cana-de-açúcar não é completo. Assim como qual ou quais são responsáveis pelo aumento da produtividade desta cultura. Visando investigar a comunidade de bactérias diazotróficas presentes em variedades de cana-de-açúcar cultivadas em regiões do nordeste brasileiro será empregada a taxonomia polifásica. Técnica criada por Colwell em 1970, refere-se à integração de informações genotípicas complementadas com informações fenotípicas e quimiotaxonômicas de um microrganismo a fim de executar um agrupamento do mesmo (PRAKASH et al., 2007) o que gera um sistema de classificação mais eficiente. Tendo em vista que o emprego apenas da técnica de caracterização morfológica, como ocorria, pode gerar a formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e muitas vezes errôneos (WOESE, 1987).

Este estudo foi elaborado sob a hipótese de que a diversidade da comunidade de bactérias diazotróficas endofítica associadas à cultura de cana-de-açúcar possa ser elevada em amostras de tecido.

Os objetivos foram identificar e caracterizar isolados bacterianos obtidos de tecidos vegetais de vários cultivares de cana-de-açúcar obtidas a região do nordeste pré-germinadas utilizando a taxonomia polifásica, assim como verificar o potencial de aplicação destas bactérias em plantas de cana.

Tendo em vista os elevados índices de biodiversidade microbiana associados a plantas no Brasil. Muito destes microrganismos podem apresentar alto potencial biotecnológico. A descoberta de novos microrganismos bem como sua classificação é importante para o conhecimento desta biodiversidade e sua adequada exploração. Estudos como este e outros buscam ampliar o conhecimento sobre FBN na cultura da cana-de-açúcar, assim como diminuir o impacto da ação humana sobre o meio ambiente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A Cultura da Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence à divisão Angiospermae, classe Monocotyledonea, família Poacea (PERIN, 2007). Tem seu centro de origem no Sudeste da Ásia. Hoje é cultivada em mais de 130 países, tendo como os maiores produtores Índia, Cuba e Brasil. A criação do Programa Brasileiro do Álcool Combustível em 1975 (Proálcool) deu grande impulso à cultura canavieira no Brasil e hoje ela é encontrada presente em quase todos os Estados do Brasil. Ocupa área de mais de 7,7 milhões de hectares com uma produção anual estimada para safra de 2009/2010 de 629,02 milhões de toneladas de cana, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2009). Os produtos da cana-de-açúcar possuem uma ampla utilização como produção de açúcar, álcool combustível e biodiesel. Os subprodutos da cana (bagaço, vinhaça e torta de filtro) são de grande importância socioeconômica na geração de energia, ração animal, aglomerados, fertilizantes e sequestro de carbono. A cadeia agroindustrial da cana-de-açúcar é considerada uma das principais geradoras de emprego no país cerca de 1,2 milhões de empregos formais. Considerando-se que para cada emprego direto são gerados dois indiretos, estima-se haver 4,29 milhões de pessoas trabalhando na cadeia da cana-de-açúcar segundo Souza & Macedo (2010).

A cana-de-açúcar é altamente exigente em nitrogênio (N). O N está presente na nutrição e na fisiologia da cana-de-açúcar na formação de aminoácidos, proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (MALAVOLTA et al., 1989). A planta obtém o N através da mineralização da matéria orgânica, adição de fertilizantes nitrogenados e fixação biológica de nitrogênio.

Acumula aproximadamente 200 kg de N em cana planta e entre 120 e 180 kg de N em cana soca, por hectare, para atingir produtividade de 80 a 100 Mg de colmos/ha (RESENDE et al., 2006). Contudo a maior parte do N é retirada do sistema, aproximadamente 70% é levado nos colmos no momento da colheita, e o restante é queimado no preparo do canavial para a colheita (OLIVEIRA et al., 1994). Esta exportação e queima de quase tudo o que é produzido e a baixa adição de fertilizantes em canaviais brasileiros, deveriam levar a um rápido esgotamento do potencial produtivo dos solos. Porém, em áreas após 16 anos de cultivo, foi observado que em geral não há redução do nível de N no solo, mesmo quando não há adição de N fertilizante ao sistema (RESENDE, 2003). Estes dados contribuem para a hipótese de reposição natural do N exportado. Esta reposição natural foi associada a microrganismos que estão presentes em plantas de cana-de-açúcar.

### 2.2. Taxonomia Bacteriana

As bactérias são grupo diverso de microrganismos, importantes pelo seu papel nos ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrogênio, e outros), nos processos de biorremediação, na conversão de energia, em biocatálises, e na síntese de produtos naturais; tornando as bactérias uma fonte importante para novos processos industriais e biotecnológicos (BULL et al., 2000; DEUTSCHBAUER et al., 2006).

Os microrganismos por vários anos foram descritos e identificados por métodos dependentes de cultivo (FRY, 2000; SCHLEIFER, 2004). Avaliações indicam que mais de 99% dos microrganismos presentes em ambientes naturais não são cultiváveis (LEVEAU, 2007). Mesmo assim, o volume de informações a partir deste 1% permitiu avanços inestimáveis. A maioria das descrições é baseada em características morfológicas, como forma e coloração das colônias, tamanho e motilidade celular, patogenicidade, assimilação de diferentes fontes de carbono, dentre outros, resultando na formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e muitas vezes errôneos (WOESE, 1987). Há algumas décadas,



avanços e inovações nas técnicas moleculares, baseadas em seqüenciamento de DNA e análise de seqüências dos genes ribossomais de vários procaríotos, têm gerado informações relevantes nas relações taxonômicas, ecológicas e evolucionárias das espécies de bactérias encontradas (FORNEY et al., 2004). A taxonomia polifásica criada por Colwell em 1970, refere-se à integração de informações genotípicas complementadas com informações fenotípicas e quimiotaxonômicas de um microrganismo a fim de executar um agrupamento do mesmo (PRAKASH et al., 2007) o que permite classificá-lo e geralmente identificá-lo (VANDAMME et al., 1996; GEVERS et al., 2005; COENYE et al., 2005).

### **2.3. Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV)**

Diversas bactérias têm sido estudadas em associação com plantas devido aos efeitos benéficos que esta associação pode resultar. Estas bactérias são conhecidas como Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV) e seus efeitos são resultantes de diversos mecanismos de ação que atuam diretamente ou indiretamente na promoção do crescimento (OLIVARES 2009). Em gramíneas, a associação com estas bactérias ocorre tanto na superfície como no interior dos tecidos vegetais, principalmente nas raízes, podendo colonizar a parte aérea. Desta forma, a planta supre as necessidades da bactéria com moléculas orgânicas utilizadas como fonte de carbono, seja através dos exudados radiculares ou a pronta disponibilização nos tecidos vegetais. Em troca, as bactérias podem estimular o crescimento vegetal. Entre os mecanismos diretos de promoção do crescimento podemos citar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a produção de hormônios, a solubilização de fósforo, e como os mecanismos indiretos a produção de antibióticos, de substâncias antifúngicas (OLIVARES 2009), de sideróforos, a indução de resistência sistêmica, entre outros.

#### **2.3.1. Produção de fitormônios**

A produção de reguladores de crescimento ativos como fitormônios faz parte do metabolismo de várias bactérias associadas aos vegetais e podem ser considerados agentes causais de alteração do crescimento e desenvolvimento vegetal. Entre as substâncias ativas como hormônios, foram identificadas auxinas, citocininas, giberelinas e etileno em condições de cultivo (fora da planta hospedeira). A capacidade dos microrganismos produzirem auxinas está relacionada a fatores de patogenicidade e de estímulos ao crescimento vegetal. Diversas auxinas vegetais possuem sua estrutura química identificada, porém dentre elas a mais importante é o ácido 3-indolacético (AIA) (OLIVEIRA et al., 2003) que geralmente possui mais de uma via metabólica de síntese. Estes hormônios causam modificações na morfologia das raízes, o que pode influenciar a absorção de nutrientes e de água.

#### **2.3.2. Fixação biológica de nitrogênio (FBN)**

O nitrogênio é um elemento essencial, 99,96% está na forma de  $N_2$  e na atmosfera, não disponível a todos os eucariotos e a maioria dos procaríotos, e apenas 0,04% encontram-se nas formas disponíveis orgânicas ou inorgânicas (ROSWALL, 1979). O  $N_2$  presente na atmosfera pode ser fixado ou transformado em  $NH_3$  através de descargas elétricas, processos industriais ou biológicos. A contribuição da fixação de nitrogênio por descargas elétricas é relativamente baixa. Já os processos industriais, são bem significativos, porém encarecem a produção, além de sua baixa eficiência e alta mobilidade, podendo poluir o solo, água e atmosfera.

O processo de FBN é um dos dois maiores processos que regulam a vida no planeta, juntamente com a decomposição da matéria orgânica e perdendo apenas pela fixação biológica de carbono (Fotossíntese). A FBN talvez seja o processo microbiano mais importante para fixar o  $N_2$  atmosférico e a chave para o ciclo do N. É realizada por muitos grupos de bactérias e alguns organismos do grupo Archae que possuem a enzima nitrogenase, dito diazotróficos, capazes de quebrar a tripla ligação existente na molécula de  $N_2$ , tornando-o

disponível em solos, oceanos, interior de tecidos de plantas, insetos e rúmem, sendo responsável por 65% do nitrogênio fixado anualmente.

Existem três tipos de organismos diazotróficos: os de vida livre, aqueles que vivem associados com outros organismos e aqueles que vivem em simbiose com outros organismos. Os diazotróficos endofíticos têm vantagens sobre os diazotróficos associativos de raízes, uma vez que ocupam espaços mais intimamente ligados ao hospedeiro, com maior acesso às fontes de carbono. Além disso, eles colonizam nichos protegidos do oxigênio, os quais são necessários para a expressão e atividade da nitrogenase (DOBBELAERE et al., 2003).

Bactérias endofíticas podem promover o crescimento das plantas por vias indiretas, como por exemplo, supressão de doenças, ou ações diretas como produção de fitohormônios, FBN, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, oxidação do enxofre, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (TAN & ZOU, 2001).

A associação entre bactérias diazotróficas e a cana-de-açúcar pode ser vista em diversos gêneros bacterianos e possui mecanismos ainda são pouco compreendidos (JAMES, et al., 2000). Entre as bactérias associadas à cana-de-açúcar destacam-se as espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988), *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (GILLIS et al., 1991; BALDANI et al., 1996) e *Burkholderia* spp. (PERIN et al., 2006 e REIS et al., 2004).

#### 2.4. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

Apesar da abundância de N<sub>2</sub> na atmosfera, apenas parte dos organismos do grupo dos procaríotes conseguem reduzir o nitrogênio da atmosfera em amônia. Estes organismos são denominados diazotróficos e incorporam o nitrogênio à biomassa através do mecanismo da FBN. Atualmente são conhecidas mais de 140 espécies de bactérias diazotróficas, incluindo cianobactérias e actinomicetos (YOUNG, 1992). Alguns aspectos relacionados com a fixação biológica e industrial estão relacionados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Aspectos do processo de fixação do nitrogênio atmosférico por via industrial e biológica

<b>Fixação industrial (Fertilizantes)</b>	<b>Fixação biológica de nutrientes (FBN)</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Nutriente mais caro, utiliza energia fóssil para produção e distribuição, aumentando o CO<sub>2</sub> atmosférico e o aquecimento global</li> <li>▪ Tem baixo aproveitamento agrônômico e são poluentes de solo, água e atmosfera</li> <li>▪ Representam de 5 a 20% do custo de produção das culturas</li> <li>▪ Representam apenas 2% da absorção total de nitrogênio pelas plantas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Segundo processo biológico mais importante do planeta depois da fotossíntese. Não é poluente, utiliza energia solar, recicla CO<sub>2</sub></li> <li>▪ Mecanismo responsável por 65% do N<sub>2</sub> incorporado nos seres vivos do planeta</li> <li>▪ Consome em torno de 2,5% da energia da fotossíntese do planeta</li> <li>▪ A vida no planeta terminaria em 30 anos se a fixação biológica do nitrogênio parasse</li> </ul>

Fonte: Franco e Balieiro (1999).

#### 2.5. Fixação Biológica de Nitrogênio na Cultura de Cana-de-Açúcar

O nitrogênio é um macronutriente importante na nutrição e na fisiologia da cana-de-açúcar. Nos países de clima tropical o baixo rendimento das culturas é atribuído principalmente a baixa disponibilidade deste elemento. O acúmulo de nitrogênio pela cana-

de-açúcar varia e aplicações de N-fertilizante possuem maior resposta em soqueiras que em cana planta de acordo com estudos feitos por Azeredo e colaboradores, (1986) e Urquiaga e colaboradores em 1992. Diante disto muitos agricultores vêm reduzindo aplicações de N na cana planta e utilizando valores em torno de 60 kg ha<sup>-1</sup> em soqueiras. A falta de resposta da cana-planta tem sido atribuída ao sistema radicular da cana-planta que favorece uma maior eficiência na utilização do nitrogênio do solo (TRIVELIN, 2000), a maior mineralização do nitrogênio favorecido pelo clima tropical e à FBN.

A quantificação da FBN associadas à cana-de-açúcar teve início nos anos setenta através do uso de algumas técnicas como a redução de acetileno, balanço de N total (LIMA et al., 1987; BODDEY et al., 1995) e abundância natural de <sup>15</sup>N (BODDEY et al., 2001). Estes métodos relatam contribuições da FBN de até 60% das necessidades de N das plantas.

## 2.6. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio na Cana-de-Açúcar

Pesquisas com bactérias fixadoras de nitrogênio em gramíneas no Brasil foram iniciadas pelas pesquisadoras Johanna Döbereiner e Alaídes Ruschel na década de 50, onde isolaram a bactéria fixadora de nitrogênio *Beijerinckia fluminensis* da rizosfera da cana-de-açúcar (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958).

Em cana-de-açúcar foram encontradas bactérias diazotróficas na rizosfera e colonizando tecidos internos das plantas. Entre as bactérias associadas à cana-de-açúcar destacam-se as espécies *Azospirillum lipoferum* (NEYRA & BERKUM, 1977), *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI et al., 1986), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988), *Burkholderia* spp. (YABUUCHI et al., 1992), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (GILLIS et al., 1991; BALDANI et al., 1996) e *Azoarcus* spp. (REINHOLD-HUREK & HUREK 2000).

### 2.6.1. Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* foi descrito (BALDANI et al., 1986) como uma bactéria fixadora de nitrogênio associadas à Poaceas no Brasil.

Dentre as espécies descritas apenas *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. frisingense* fixam nitrogênio em associação com plantas não leguminosas. A espécie diazotrófica descrita, *H. lusitanum*, foi isolada de nódulos de raízes de feijão coletados em Portugal (VALVERDE et al., 2003). *H. seropedicae* foi à primeira espécie descrita do gênero, isolada da rizosfera, rizoplano e raízes desinfestadas superficialmente de arroz, milho e sorgo (BALDANI et al., 1986). Foi também isolada de raízes, folhas e colmos de cana de açúcar cultivada no Brasil (BALDANI et al., 1996), e na Austrália (BODDEY et al., 1998). *H. rubrisubalbicans* pertencia ao gênero *Pseudomonas rubrisibalbicans* (GILLIS et al., 1991), e foi reclassificada por Baldani et al. (1986). Tem sido encontrada em associação com cana-de-açúcar e raízes da planta expontânea *Digitaria insularis*, crescida no interior da plantação de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1996). Foi detectada também em capim elefante (REIS et al., 2000), abacaxizeiros e bananeiras (CRUZ et al., 2001). Essa bactéria pode causar a doença chamada "estria mosqueada" na variedade de cana-de-açúcar B3462.

### 2.6.2. Gênero *Gluconacetobacter*

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

Apresenta distribuição ampla e além de fixar nitrogênio, produz hormônios de crescimento como AIA e Giberelina (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; BASTIÁN et al., 1998) e atua em controle biológico (PIÑON et al., 2001). Foi isolada de raízes e parte aérea de cana-de-açúcar cultivada nos estados de Alagoas, Pernambuco e Minas Gerais, no Brasil

(CAVALCANTE et al., 1988). Ao longo dos anos de estudo, foi encontrada em alto número e isolada de raízes, colmos, palhiço, solo da rizosfera e seiva xilemática de cana-de-açúcar no Brasil (REIS, 1991; PERIN, 2003), e inúmeros outros países.

É uma bactéria endofítica e possui baixa sobrevivência no solo (REIS et al., 1994). O teor de matéria orgânica pode estar associado à manutenção desta bactéria no solo, já que foi isolada de rizosfera de plantas de café (SANTOS et al., 2006), onde geralmente o teor de matéria orgânica é maior se comparado aos canaviais, que sofrem queimadas e retirada de praticamente todo o material vegetal no momento da colheita, contribuindo com o empobrecimento do solo, levando à falta de nutrientes necessários para o desenvolvimento dos organismos. Vem apresentando baixa diversidade genética em populações isoladas, o que pode estar relacionado ao ambiente restrito, que é o interior da planta de cana-de-açúcar, sofrendo desta maneira forte pressão seletiva, ou devido a produção de bacteriocinas, detectadas em condições de cultura pura por 2 grupos de bactérias, sobre outros grupos da mesma espécie e das espécies *G. johannae*, *G. azotocaptans* e *G. liquefaciens* (MUÑOZ et al., 2005).

### 2.6.3. Gênero *Burkholderia*

Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* apresentam ampla distribuição, se associam com plantas não leguminosas e formam nódulos em leguminosas. Os gêneros *B. tuberum* e *B. phymatum* (VANDAMME et al., 2002), foram isoladas de *Aspalathus carnosa*, na África do Sul e *Machaerium lunatum*, na Guiana Francesa, respectivamente, e recentemente inúmeros trabalhos mostraram o isolamento de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em nódulos, especificamente de plantas da subfamília Mimosóidea. Os dados disponíveis até o momento mostram que as bactérias que nodulam leguminosas e aquelas associadas a plantas da família Poacea são diferentes.

Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* se associam com inúmeras plantas. Em cana-de-açúcar, espécies recentemente descritas foram a *B. silvatlantica* (PERIN et al. 2006) e a *B. tropica* (REIS et al., 2004), e a *B. unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004) foi isolada de café, milho e cana-de-açúcar de diferentes locais no México e estudos posteriores mostraram que esta espécie predomina na cana, inúmeros isolados das espécies *B. tropica*, *B. kururiensis* e *B. caribensis* foram isoladas de amostras de cultivares de canas-de-açúcar brasileiras e australianas (BODDEY, 2003). Outras espécies descritas: *B. cepacea* isolada de milho (BEVIVINO et al., 1994), *Burkholderia* spp. isolada de culturas como banana, abacaxi, cana-de-açúcar (WEBER et al., 1999; BODDEY, 2002; PERIN et al., 2006), *B. xenovorans* isolada de café (GORIS et al., 2004) e *B. vietnamiensis* em arroz, milho, café, sorgo (GILLIS et al., 1995; ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001; RODRIGUES, 2004).

### 2.6.4. Gênero *Azospirillum*

Bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Azospirillum* spp. possuem capacidade de associação com diversas plantas, principalmente cereais e gramíneas forrageiras (DÖBEREINER & BALDANI, 1982; GERMIDA, 1986). São geralmente consideradas como rizosféricas, mas exibem diferenças estirpe-específicas do modo de colonização das raízes. Em consideração a estas diferenças, *Azospirillum* pode ser considerado um microrganismo endofítico facultativo (BALDANI et al., 1997).

As espécies descritas do gênero *Azospirillum* são: *A. lipoferum*, *A. brasilense* (TARRAND et al., 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. haloproferens* (REINHOLD et al., 1987), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. largomobile* (BEN DEKHIL et al., 1997), *A. doebereinae* (ECKERT et al., 2001) e *A. oryzae* (XIE et al., 2005), *A. melinis* (PENG et al., 2006), *A. canadense* (MEHNAZETAL et al., 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Origem dos Isolados

Os isolados foram obtidos de 12 variedades de cana-de-açúcar. Oito cultivadas nos Estados de Alagoas (SP 81325, SP 813250, SP 791011, RB 92579, RB 931530, RB 867515, RB 72454, e VAT 90212), e 9 cultivadas em Pernambuco (SP 813250, SP 832847, RB 92579, RB 867515, RB 72454, RB 863129, RB 931011, RB 869515 e VAT 90212). O material vegetal (colmo) foi trazido de avião até o laboratório Gramíneas da Embrapa Agrobiologia, Seropédica – RJ, e mantidos em sacos plásticos à temperatura ambiente.

Os colmos foram divididos em toletes contendo apenas uma única gema. Foram também tratados termicamente a 52°C por 30 minutos com posterior secagem em temperatura ambiente por 24 h, a fim de diminuir a contaminação externa. Em seguida, os toletes foram pré-germinados em casa de vegetação segundo Reis e colaboradores (1999). Foram plantados em caixas plásticas contendo 12 kg de areia e vermiculita, na proporção 2:1, sendo o substrato composto autoclavado duas vezes com intervalos de 24 horas após a primeira autoclavagem. Todo o experimento foi conduzido em casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia, em duas datas: Novembro de 2006 e Maio de 2007. Três semanas após o plantio, as plantas que germinaram foram levadas ao Laboratório visando isolar e identificar bactérias diazotróficas a elas associadas.

#### 3.2. Contagem e Isolamento

A contagem e o isolamento ocorreram conforme descrito por Döbereiner et al. (1995). Utilizando os meios de culturas Semi-Sólido semi-seletivos JNFb, LGI (DÖBEREINER et al. 1995), LGI-P caldo (REIS et al., 1994) e JMV (BALDANI, 1996).

Amostras de 1 g da parte aérea e da raiz foram lavadas e maceradas, com solução salina por 2 minutos. Em seguida sofreram diluições seriadas até  $10^{-6}$ , acrescentando-se 1 ml da diluição original a tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina. De cada diluição, uma amostra de 0,1 ml foi inoculada no centro do meio de cultura, em frascos com 3 repetições por meio, com 5 ml do meio de cultura Semi-Sólido. Os frascos foram incubados no escuro por 7 dias em estufa a 30 °C, para o desenvolvimento de película na região superficial do meio. A contagem foi realizada baseada na presença ou ausência da película formada no meio Semi-Sólido, para quantificar o Número Mais Provável de bactérias presentes através da Tabela de McCrady. As duas últimas diluições, de cada meio, que apresentaram crescimento positivo foram repicadas para um novo meio de cultura Semi-Sólido onde os que apresentaram formação de película característica de bactérias diazotrófica foram utilizados para isolamento. As amostras foram diretamente riscadas em placas de Petri contendo o respectivo meio sólido. E foram incubadas no escuro a 30° C por 5 dias para o crescimento de colônias isoladas. Cada colônia formada foi repicada para um novo meio semi-sólido. Após formação de película característica em meio de cultura Semi-Sólido, as amostras foram riscadas novamente em placas com meio de cultura DYG'S (RODRIGUES NETO et al., 1982) para purificação final.

Quando purificados, os isolados foram estocados em Glicerol 50% estéril (Glicerol diluído em Água MilliQ). Foram então previamente crescidos em meio de cultura líquido DYG's modificado, por 24 h a 150 rpm e 1 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada por 5 min. a 10.000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e o concentrado de células ressuspensionado em 500 µl de Glicerol 50%, homogeneizado e estocado a -20 °C. O glicerol age como um crioprotetor, impede alterações celulares e atua como um osmorregulador.

### 3.3. Ativação dos Isolados

Os isolados que foram estocados em glicerol estéril (50%) foram ativados para estudo taxonômico. Onde 20 µL da suspensão da solução bacteriana estocada foi crescida em meio de cultura semi-sólido, o mesmo utilizado para isolamento da bactéria. Após 72 h de incubação a 30° C todos os isolados que formaram película característica de diazotrófica foram riscados em placa contendo o meio de cultura Batata para purificação.

Todos os isolados serão liofilizados e depositados na Coleção de Cultura da Embrapa Agrobiologia onde receberam a sigla BR de depósito e numeração.

### 3.4. Caracterizações Fisiológicas dos Isolados

#### 3.4.1. Caracterização morfológica das colônias

Para a caracterização morfológica das colônias foi utilizado o meio de cultura sólido Batata (DÖBEREINER et al., 1995) com 3 repetições por isolado. Como alguns isolados quando inoculados em meio de cultura LGI-P semi-sólido e incubados por 7 dias à 30°C formaram película de cor laranja e mudaram a coloração do meio de amarela para incolor, devido a assimilação do azul de bromotimol pelas bactérias, semelhante ao gênero *Gluconacetobacter*. Também foram riscados em meio de cultura Batata-P e LGI-P para se observou o padrão de desenvolvimento do gênero *Gluconacetobacter* de acordo com a morfologia descrita por Döbereiner et al. (1995) buscando identificar possíveis isolados.

Segundo Yano et al., (1993) as seguintes características morfológicas das colônias foram avaliadas:

1. Tamanho: menor que um mm, puntiforme e maior que um mm;
2. Características ópticas: translúcida, transparente, opaca, ou brilhante,
3. Cor;
4. Forma da colônia, em circular ou irregular;
5. Elevação: plana, lente, convexa, pulvinada, umbonada ou umbilicada;
6. Borda: ondulada, lobada, denteada, filamentosa ou inteira;
7. Superfície: lisa, rugosa ou papilada;
8. Consistência: viscosa, butírica, aquosa, seca ou gomosa.

A morfologia das colônias foi analisada aos 5 e 7 dias de crescimento. Buscando otimizar a avaliação das bactérias utilizou-se a caracterização morfológica para criar grupos através da comparação das semelhanças entre os isolados. Estas semelhanças foram estimadas pelo coeficiente de SM (correspondência simples) (ROHLF, 1994), agrupados pelo método das distâncias médias UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average) (SNEATH & SOKAL, 1962) e representados graficamente por um dendrograma construído pelo programa NTSYS (Numerical Taxonomy System Using Multivariate Statistical Program), versão 2.1. Em seguida representantes entre os grupos num total de 40 foram selecionados para as avaliações seguintes (Tabela 2).

**Tabela 2.** Lista dos isolados selecionados para análise polifásica.

Isolados	Origem dos isolados			
	Amostra	Variedades	Local	Estado
151-B	RAÍZ	VAT 90212 14 MESES	USINA TRIUNFO	ALAGOAS
152	P.A.	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
159-B	RAÍZ	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
160-1	RAÍZ	VAT 90212 14 MESES	USINA TRIUNFO	ALAGOAS
163-A	RAÍZ	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
165	RAÍZ	RB 92579 14 MESES	USINA TRIUNFO	ALAGOAS
170	RAÍZ	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
171	P.A.	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
172	RAÍZ	VAT 90212 14 MESES	USINA TRIUNFO	ALAGOAS
173-B	RAÍZ	RB 92579 14 MESES	USINA TRIUNFO	ALAGOAS
176-B2-1	P.A.	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
179-1A	RAÍZ	RB 867515 SOCA 7 MESES	USINA CURURUPE	ALAGOAS
183	RAÍZ	RB 867515 SOCA 7 MESES	USINA CURURUPE	ALAGOAS
187	RAÍZ	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
189	P.A.	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
199	P.A.	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
202	RAÍZ	RB 92579 14 MESES	USINA TRIUNFO	ALAGOAS
205	P.A.	RB 867615 SOCA 7 MESES	USINA CURURUPE	ALAGOAS
206	RAÍZ	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
209	P.A.	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
211-A	RAÍZ	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
215	P.A.	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
216-A	P.A.	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
217-B	RAÍZ	RB 92579 14 MESES	USINA TRIUNFO	ALAGOAS
219	RAÍZ	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS
220	RAÍZ	SP 813250 14 MESES	USINA TRIUNFO	ALAGOAS
227-A	P.A.	RB 72454	USINA CURURUPE	ALAGOAS

**Tabela 2.** Continuação.

Isolados	Origem dos isolados			
	Amostra	Variedades	Local	Estado
232	RAÍZ	SP 813250 14 MESES	USINA TRIUNFO	ALAGOAS
255	RAÍZ	RB 867515 SOCA 7 MESES	USINA CURURIFE	ALAGOAS
256	P.A.	RB 72454	USINA CURURIFE	ALAGOAS
257-B	RAÍZ	RB 82579 14 MESES	USINA CURURIFE	ALAGOAS
259	RAÍZ	RB 867515 SOCA 7 MESES	USINA CURURIFE	ALAGOAS
261	RAÍZ	RB 867515 SOCA 7 MESES	USINA CURURIFE	ALAGOAS
262	RAÍZ	RB 72454	USINA CURURIFE	ALAGOAS
263-A	RAÍZ	SP 813250 14 MESES	USINS TRIUNFO	ALAGOAS
264	RAÍZ	RB 72454	USINA CURURIFE	ALAGOAS
1-III	P.A.	RB 863129 LOTE 06	USINA CRUANGI ENG. ANINGA	PERNAMBUCO
5-III	P.A.	SP 813250 LOTE 17	USINA CRUANGI ENG. BELEZA	PERNAMBUCO
6-III	RAÍZ	RB 931011 PLANTA	USINA OLHO D'ÁGUA	PENAMBUCO
8-III	RAÍZ	RB 863129 LOTE 06	USINA CRUANGI ENG. ANINGA	PERNAMBUCO

### 3.4.2. Crescimento em meio semi-sólido

Continuando a caracterização dos isolados, os 40 selecionados foram inoculados em meios de cultivo semi-sólidos, sem adição de nitrogênio e com formulações que se diferenciam quanto a fonte de carbono, pH e micronutrientes. Estes meios são considerados semi-seletivos para alguns gêneros de bactérias diazotróficas. Foram utilizados os meios semi-sólidos JNFB, fonte de carbono ácido málico (DÖBEREINER et al., 1995), LGI-P, fonte de carbono sacarose 10% (DÖBEREINER et al., 1995), JMV, fonte de carbono manitol 0,5% (BALDANI et al., 2000) e LGI, fonte de carbono sacarose 0,5% (MAGALHÃES et al., 1983) com 3 repetições por semi-sólido para cada isolado. O inóculo foi obtido do cultivo das bactérias em meio líquido DYG'S (RODRIGUES NETO et al., 1982) a 30°C por 24 horas sob agitação de 150 rpm. Em seguida, 30 µl da suspensão bacteriana foram inoculadas em frascos contendo 5 ml de meio de cultivo e estes incubados a 30°C. As avaliações foram feitas no 2º, 4º e 7º dia após a inoculação, sendo considerados como crescimento positivo, aqueles frascos onde houve formação de película característica de diazotróficos.

### 3.4.3. Avaliação da capacidade de produção do hormônio auxina (AIA)

A produção de AIA dos isolados foi determinada por método colorimétrico utilizando placas de poliestireno (SARWAR KREMER, 1995 – modificado por REIS JR. 2002). Os isolados foram submetidos a uma pré-inoculação em meio líquido DYG'S modificado (com alteração de 0,5g/l de KOH por 0,35g/l de NaOH), incubados em agitadores a 30°C por 2 dias em tubos de ensaio contendo 6 mL do meio. Uma alíquota de 1 mL da cultura crescidos no pré-inóculo foi cultivada por 72 h a 30 °C sob agitação de 150 rpm em tubos de ensaio



contendo 5 mL de meio DYG'S (com de 0,35g/l de NaOH e sem KOH), em triplicata e acrescidos de L-Triptofano (20µL/tubo). Para o controle negativo da reação, foi substituída a suspensão bacteriana por meio DYG'S modificado. Após o crescimento, as amostras foram padronizadas em D.O. (densidade ótica) 1,0 e centrifugadas a 7000 g por 5 min e alíquotas de 150 µL do sobrenadante foram dispostas nos poços da placa de poliestireno (placa com 96 poços com capacidade de 300 µL cada) seguindo a adição de 100 µL do reagente de Salkowski (1mL de FeCL3.6H<sub>2</sub>O 0,5M em 50mL de HClO<sub>4</sub> 35%). Após 30 min de reação em ausência de luz e sob temperatura ambiente observou-se a intensidade da coloração rósea e as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus (Labsystem Oy, Helsinki, Finlândia) com filtro de interferência de 540 nm e os dados processados pelo programa Labsystem Transmit Multiskan Plus For Windows. Para a estimativa da produção de AIA foi determinada a curva padrão nas concentrações de: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 mg.mL<sup>-1</sup>, utilizando uma solução padrão do produto comercial AIA (1,75 mg.ml<sup>-1</sup>) de acordo com a equação  $y = 0,0112x + 0,096$ . (R<sup>2</sup> 0,99).

A produção de ácido-endol-ácetico foi parâmetro para seleção de isolados para avaliação em campo. Sendo observada a capacidade dos isolados atuarem como promotores de crescimento vegetal.

#### **3.4.4. Avaliação da morfologia celular**

A morfologia foi avaliada através de microscopia ótica. Uma alíquota da suspensão bacteriana cultivada previamente em meio DYG'S por 24 horas foi posicionada entre a lâmina e a lamínula para observação ao microscópio óptico de contraste de fase, através das objetivas de 40X e 100X.

#### **3.4.5. Reação de Gram**

De acordo com o protocolo sugerido por Yano et al. (1993), as bactérias foram crescidas em meio sólido DYG'S e o esfregaço preparado a partir de uma colônia isolada. A técnica consistiu em: preparação de um esfregaço em lâmina de vidro; secagem ao ar e fixação das células em chama; cobertura da lâmina com cristal violeta por 1 minuto; lavagem em água corrente; cobertura da lâmina com lugol por 2 minutos; lavagem com água corrente; descoramento com álcool; lavagem da lâmina com água corrente; cobertura com safranina diluída por 30 segundos e, por fim, lavagem da lâmina com água, secagem e avaliação da coloração das células em microscópio óptico de contraste de fase com a objetiva de 100X com óleo de imersão.

### **3.5. Caracterizações Moleculares dos Isolados**

#### **3.5.1. Extração do DNA genômico**

O DNA genômico foi extraído de células bacterianas cultivadas em meio líquido DYG'S por 24 horas. Utilizou-se para a extração o MiniKit QIAamp® DNA da QIAGEN de acordo com as recomendações do fabricante.

O sucesso da extração do DNA foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 1%. Onde 2 µl de cada amostra de DNA e três µl de tampão de corrida (Loading Buffer 6x) foi submetido a uma voltagem de 90 volts por 40 min em tampão TAE 1X (0,04 M Tris acetato e 1 mM de EDTA). Em seguida o gel foi corado em brometo de etídio (0,5 µg. mL<sup>-1</sup>), visualizado sob luz ultravioleta e documentado com auxílio do sistema de foto documentação Kodak Gel Logic 100 e pelo programa Kodak 1D Imagem System. A quantificação e a qualificação do DNA genômico foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop®) (SIMONATO et al., 2007).

### 3.5.2. Amplificação do gene 16S DNAr

O fragmento foi amplificado através da combinação de iniciadores 27f e R1492 (Tabela 3). As reações de amplificação foram compostas de 12 ng de DNA genômico; tampão com HCL 1X; Tween 20 5%; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de cada dNTP; 5 U de Taq DNA polimerase e 0,2 μM de cada iniciador com volume final de 50 μL. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador PTC 100 (MJ Research). O material preparado foi colocado num termociclador e submetido ao seguinte programa de amplificação: uma etapa de desnaturação (94 °C por 3 min.), seguido de 30 ciclos intermediários (94° C por 1 minuto, 58° C por 1 minuto e 72° C por 2 min), e uma etapa final de extensão (72 °C por 5 min.) seguido por resfriamento (4 °C por 15 min.). A qualidade dos produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2% com 2 μL de cada amostra de DNA e 2 μL de tampão de corrida (Loading Buffer 6x) e comparadas a um marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder - Invitrogen) e submetidos a uma voltagem de 100 volts por 2h e 30 min em tampão TAE 1X (0,04 M Tris acetato e 1 mM de EDTA). O gel foi corado e visualizado como descrito no item 3.5.1.

Após a amplificação do gene todo material do produto da PCR foi purificado com o uso do kit Wizard® SV da Promega de acordo com fabricante. O material purificado foi quantificado no NanoDrop® e em gel de agarose 2% como descrito nos itens 3.5.1 e 3.5.2. O padrão de peso molecular utilizado foi Low DNA Mass Ladder.

### 3.5.3. Reação de seqüenciamento do gene 16S DNAr

A reação de seqüenciamento do gene 16S DNAr dos isolados bacterianos foi realizada utilizando 150 ng dos produtos de PCR purificados, 5,0 μM de cada iniciador (Tabela 3), 4 μL do Kit de seqüenciamento Dye-terminator (DYEnamic ET, Amersham Biosciences) e água ultrapura (ultraPURE™, Invitrogen Co.) para um volume final de 10 μL. Os 24 ciclos de amplificação constituíram-se de uma etapa de desnaturação a 95°C por 25 segundos, uma etapa de anelamento 58°C por 15 segundos e uma etapa de extensão a 60°C por 1 minuto. Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram precipitadas adicionando 1,0 μL de acetado de amônio 7,5 M e 27,5 μL de etanol absoluto 70% e incubadas a 4°C por uma noite. Posteriormente à incubação, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 45 minutos sob temperatura de 4°C. O sobrenadante foi então descartado e o precipitado será lavado com 100 μL de etanol 70% e centrifugado novamente a 4.000 rpm por 10 minuto a 4°C. As amostras foram secas ao ar, ressuspendidas em 7,5 μL de tampão de corrida e analisadas em seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosystem). As seqüências contíguas foram montadas a partir das seqüências diretas e reversas utilizando-se os programas PHRED/PHRAP em ambiente Linux pelo setor de informática da Embrapa Agrobiologia.

A pesquisa por similaridade foi realizada no Genbank, pelo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com as seqüências contíguas possuindo em 500 a 1.400 pb conforme descrito pelo programa MegaBLAST (ZHANG et al., 2000), cuja comparação se dá pela pesquisa contra banco de dados de nucleotídeos NCBI. Para a construção da árvore filogenética, as seqüências foram alinhadas usando o programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994). A árvore baseada na comparação de pares de base foi construída usando o método Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987). A topologia da árvore filogenética foi avaliada pelo método de bootstrap com 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1985). A distância evolucionária foi computada usando o método Kimura 2-parameter (KIMURA, 1980) e a análise filogenética conduzida no programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007).

**Tabela 3.** Iniciadores utilizados para seqüenciamento do gene 16S DNAr dos isolados bacterianos. Todos na concentração de 5 pmoles/ul.

Iniciador	Seqüência (5'→3')	Referência
27f	AGAGTT TGA TCC TGG CTCAG	HEUER et al., 1997
RU6	GAAATAAATCTCTTTGTAAAACGG	WAND et al., 2010
R1492	TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT	HEUER et al., 1997
RU3	GCGGCTGGCACGTAGTTAG	BISPO et al., 2009
U2	GGCGTGCTTAACACATGCAAGTCG	BISPO et al., 2009
16S1110r	TGCGCT CGT TGC GGG ACT TAACC	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S362f	CTCCTACGGGAGGCAGTGGGG	SOARES-RAMOS et al., 2003
16S786f	CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG	SOARES-RAMOS et al., 2003

### 3.6. Avaliação dos Efeitos da Inoculação de Isolados e Estirpes Tipo de Bactérias Diazotróficas em Variedades de Cana-de-açúcar

#### 3.6.1. Bactérias e variedades utilizadas

Com base na avaliação da capacidade de produção do hormônio auxina e na formação de grupos foram selecionados 5 isolados: 263-A, 215, 202, 160 e 179-1A para implantação do experimento além de uma mistura de 5 estirpes padrões: BR 11504 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*), BR 11335 (*Herbaspirillum seropedicae*), BR 11145C (*Azospirillum amazonense*), BR 11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e BR 11366 (*Burkholderia tropica*), um controle absoluto, não inoculado e não fertilizado e um controle nitrogenado para 3 variedades de cana-de-açúcar (RB 72454, RB 867515 e RB 918639).

#### 3.6.2. Localização, característica do clima, solo e delineamento experimental

O experimento foi conduzido no campo experimental da EMBRAPA Agrobiologia (CNPAB), km 7 da BR 465 no município de Seropédica-RJ. A região possui uma dominância do clima quente e úmido, sem inverno pronunciado, sendo o regime pluviométrico caracterizado por um período chuvoso no verão e estiagem no inverno. Dentro da classificação de KÖPPEN, este clima é do tipo Aw caracterizado por inverno seco e verão chuvoso e quente, com precipitação anual de 1300 mm; inverno pouco pronunciado; temperatura média anual de 24°C e umidade relativa do ar de 70%. A estação chuvosa tem início em setembro, culminando em dezembro e janeiro com chuvas de alta intensidade e curta duração. Os meses mais quentes são janeiro e fevereiro, enquanto em julho ocorrem as médias mensais mais baixas de temperatura. Sendo implantado em 26 a 27 de Junho de 2008 em área de solo classificado como Planossolo, série Ecologia, de baixa fertilidade natural de nitrogênio. Para tal utilizou delineamento em blocos casualizados contendo 4 repetições por tratamento. Cada tratamento é constituído de 4 linhas de plantio com comprimento de 2 metros e espaçamento entre linhas de 0,6 metros totalizando 96 parcelas. A área total por parcela é 4,8 m<sup>2</sup> sendo úteis 2,4 m<sup>2</sup> as duas linhas centrais.

### 3.6.3. Adubação da área

De acordo com a análise química realizada pelo laboratório de Solos da Embrapa Agrobiologia (Tabela 4.) foi realizada a adubação: 100 kg. ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Super Simples), 100 kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O (KCl- Cloreto de Potássio), micronutriente 50 kg.ha<sup>-1</sup> na forma de FTE BR12 antes do plantio, e de 120 kg.há<sup>-1</sup> de N (Uréia) em 2 vezes, a primeira no plantio e a segunda 4 meses depois, nos tratamentos nitrogenados.

**Tabela 4.** Análise de solo realizada pelo laboratório de Solo da Embrapa Agrobiologia

Identificação da Amostra	pH	AL	Ca+Mg	Ca	Mg	P	K	C	M.O.	N
		cmolc/dm <sup>3</sup>				mg/dm <sup>3</sup>		%		
0-20 cm	5,0	0,2	0,5	0,3	0,2	7,7	3,6	0,3	0,52	0,058
20-40 cm	4,8	0,3	0,4	0,2	0,2	3,2	2,5	0,24	0,41	0,049

### 3.6.4. Preparação do veículo turfoso

O material de solo de turfa foi neutralizado a pH 6,0 com carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), para o crescimento adequado das bactérias e foi moída em moinho de bola. Após este processo 175g de turfa são depositados em sacos de polipropileno e autoclavada duas vezes a 120°C por 1 hora com intervalos de 24 horas. A esterilização da turfa contribui tanto para o maior número de células quanto para a manutenção das bactérias por um tempo maior, pois não existe competição da bactéria diazotrófica com outros microrganismos presentes no veículo de inoculação por nutrientes no meio de cultura.

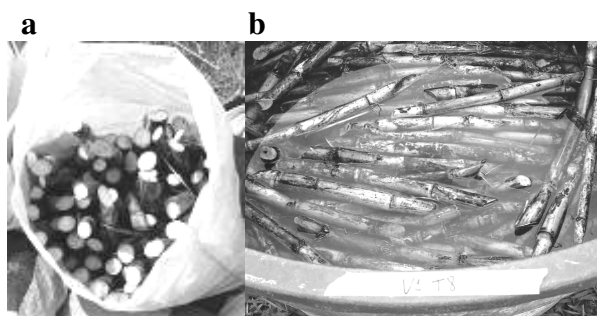
### 3.6.5. Preparação do inoculante

Uma colônia bacteriana e crescida em tubos contendo 6 ml de meio líquido, o mesmo utilizado para o isolamento, com fonte de nitrogênio: 10 mM de NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> para o meio LGI-P, 1 g NH<sub>4</sub>Cl para o meio JNFb, 1 g de KNO<sub>3</sub> para o meio LGI e 10 mM de Glutamato de sódio para o meio JMV sob agitação de 150 rpm a 30°C por 24 h. Após o crescimento 1,0 mL de solução bacteriana é inoculada em Herlemayar com 250 ml de meio Mínimo estéril Modificado por Burdman et al., (1998) acrescido de 1,0 mL de solução de frutose 0,7% em tampão fosfato 0,5M (relação 1:10) estéril por filtro Millipore® 0,2 µm e incubada a 30°C sob agitação de 150 rpm durante 24h. Após este período foi realizada a leitura das absorbâncias a 436 nm e utilizou câmara de Neubauer para contagem das células, que foram ajustadas para 10<sup>10</sup> células.mL<sup>-1</sup> por bactéria. Para preparar o inoculante foram adicionados 75 mL da solução bacteriana, contendo a concentração de 10<sup>10</sup> células.mL<sup>-1</sup> em sacos contendo 175g do veículo turfoso (para compor o inóculo), misturados até que a turfa fique úmida (sem que escorra líquido) e incubado por 24 h a 30 °C.

### 3.6.6. Plantio

Foram utilizados no plantio 6 toletes por linha com 3 gemas (18 gemas por linha), originários de plantas com 1 ano, obtidas no campo experimental da EMBRAPA Agrobiologia (CNPAB), km 7 da BR 465 no município de Seropédica-RJ. O inoculante é diluído 1:100 em água limpa (concentração final a cerca de 10<sup>8</sup> células.mL<sup>-1</sup>), em caixas com capacidade para 500 L. Após a mistura ser homogeneizada os toletes das variedades RB72454, RB867515 e RB918639 de cana-de-açúcar são imersos no inoculante por 30 minutos (Figura 1) e seguem para o plantio.

Para evitar perdas de parcelas por tombamento provocado por ventos fortes durante o período a colheita foi realizada após 10 meses de plantio. Foram avaliadas a produtividade de colmos e a produção de biomassa da parte aérea das variedades de cana-de-açúcar.



**Figura 1. a)** Toletes de cana contendo três gemas; **b)** toletes em imersão no meio de cultivo contendo microrganismos endofíticos por 30 minutos.

### 3.7 Determinações

#### 3.7.1 Massa seca da parte aérea (MS) e produtividade de colmos (PC)

As plantas foram colhidas aos 10 meses de cultivo. Para estimar a produção de massa seca da parte aérea das plantas foi determinada a massa fresca da palhada (folhas senescidas), folhas bandeira (folhas verdes) e colmos de cada parcela. Destas frações foram retiradas amostras frescas que foram pesadas e em seguida, foram levadas para secagem em estufa a 65°C até obter peso estável. Após a secagem as amostras foram pesadas para determinar a porcentagem de umidade. Já que a porcentagem de umidade da amostra é a mesmo do material colhido. A MS da parte aérea foi determinada pela subtração do teor de umidade.

#### 3.7.2 Teores de nitrogênio total na parte aérea (N total)

A matéria seca da parte aérea das plantas foi determinada após a secagem na estufa. As amostras foram moídas e 300 mg foram colocados em tubos de digestão, adicionando 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado e, por último 2,0 g de uma mistura catalisadora contendo 1000 g de sulfato de potássio, 50 g de sulfato de cobre e 3,0 g de selênio. As amostras foram deixadas no digestor até que se completasse a digestão total. Em seguida, foram destiladas por arraste a vapor pelo método Kjeldahl e tituladas com ácido sulfúrico padronizado. Metodologia descrita por Alves et al., (1994). Após a determinação do percentual de nitrogênio das amostras foi multiplicado o peso da matéria seca da parte aérea pelo percentual de N obtido em cada amostra, para a determinação N-total.

#### 3.7.3 Análises estatísticas

Os dados de biomassa seca aérea das plantas foram analisados no programa SAEG 8.0 (EUCLYDES, 1983) quanto a sua normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet). Em seguida, foram feitas análises de variância com auxílio do programa SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2003) e comparação de médias pelo teste Scott-Knott (SCOTT & KNOTT, 1974) a 5 % de probabilidade.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Contagem e Isolamento

O número de células por grama de massa fresca nas variedades variou de não detectado a  $1,40 \times 10^7$  e foi maior nos meios de cultura JNFb e JMV, em todas as partes da planta (Tabela 5, 6, 7 e 8). Foi obtido um total de 260 isolados de plantas pré-germinadas em casa de vegetação. Segundo Perin, 2007 o uso de vários meios de cultura no isolamento possibilita isolar bactérias com maior versatilidade nutricional e que a fonte de carbono preferencial da bactéria esta diretamente ligada ao nº de isolados e a população detectada. Este número foi maior nas amostras de raiz 200 (77%) em relação à parte aérea - 60 (23%).

Outros autores observaram que a raiz parece concentrar a maior população de bactérias diazotróficas (PERIN 2003, 2007, REIS JUNIOR et al., 2000). Por ser região de dreno de fotoassimilados produzidos na parte aérea que servem como alimento para as bactérias.

O maior número de isolados crescidos de raiz foi obtido em meio JNFb (ácido málico) num total de 104 isolados (40%). Para o material oriundo de Pernambuco, apenas na variedade RB 92579 não foi possível isolar bactérias de parte aérea. Devido aos materiais utilizados para isolamento terem idades fisiológicas deferentes e serem cultivados sob climas, solo e manejo deferentes não foi possível relacionar o fator ou fatores responsáveis para a variação populacional.

**Tabela 5.** Número de células por grama de peso fresco de bactérias diazotróficas associadas a variedades de cana-de-açúcar obtidas no Estado de Alagoas e pré-germinadas em casa de vegetação (primeiro isolamento).

Variedade	Origem	Amostras	Meios de cultura			
			Nº células /g massa fresca			
			LGI-P caldo	JMV	LGI	JNFb
SP 813250 14 meses	Triunfo	Raiz	ND <sup>1</sup>	NA <sup>2</sup>	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
		Parte Aérea	NA <sup>2</sup>	NA <sup>2</sup>	NA <sup>2</sup>	NA <sup>2</sup>
RB 72454	Cururipe	Raiz	$2,5 \times 10^5$	NA <sup>2</sup>	$2,5 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$
		Parte Aérea	$4,5 \times 10^5$	NA <sup>2</sup>	$4,5 \times 10^4$	$4,5 \times 10^5$
RB 92579 14 meses	Triunfo	Raiz	$2,5 \times 10^5$	NA <sup>2</sup>	$2,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$
		Parte Aérea	NA <sup>2</sup>	NA <sup>2</sup>	NA <sup>2</sup>	NA <sup>2</sup>
RB 867515 7 meses basal	Cururipe	Raiz	$9,5 \times 10^4$	NA <sup>2</sup>	$4,5 \times 10^5$	$9,5 \times 10^4$
		Parte Aérea	$2,5 \times 10^4$	NA <sup>2</sup>	$1,5 \times 10^4$	$9,5 \times 10^4$
VAT 90212 14 meses	Triunfo	Raiz	$2,5 \times 10^4$	NA <sup>2</sup>	$3,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$
		Parte Aérea	ND <sup>1</sup>	NA <sup>2</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>

I: ND, não detectado pelo método, 2: NA, não avaliada, 3: R, Raiz e PA, Parte Aérea.

**Tabela 6.** Número de células por grama de matéria fresca obtida a partir de amostras de cana-de-açúcar obtidas no Estado de Alagoas e pré-germinadas em casa de vegetação (segundo isolamento).

Variedade	Origem	Amostras	Meios de cultura			
			Nº células /g massa fresca			
			LGI-P caldo	JMV	LGI	JNFb
SP 813250 Soca	Triunfo	Raízes	ND <sup>1</sup>	4,0 x 10 <sup>3</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
		Parte Aérea	4,5 x 10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	2,5 x 10 <sup>4</sup>	2,5 x 10 <sup>5</sup>
RB 931530 4º soca	Cururipe	Raízes	7,5 x 10 <sup>4</sup>	4,5 x 10 <sup>5</sup>	4,5 x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>5</sup>
		Parte Aérea	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
RB 92579 Planta	Triunfo	Raízes	2,5 x 10 <sup>4</sup>	7,5 x 10 <sup>4</sup>	7,0 x 10 <sup>4</sup>	9,0 x 10 <sup>3</sup>
		Parte Aérea	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
RB 867515 Soca	Cururipe	Raízes	9,0 x 10 <sup>3</sup>	4,5 x 10 <sup>5</sup>	2,5 x 10 <sup>4</sup>	9,9 x 10 <sup>3</sup>
		Parte Aérea	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
RB 92579 soca	Cururipe	Raízes	2,0 x 10 <sup>5</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	1,1 x 10 <sup>4</sup>	2,5 x 10 <sup>5</sup>
		Parte Aérea	9,0 x 10 <sup>3</sup>	ND <sup>1</sup>	4,0 x 10 <sup>3</sup>	4,0 x 10 <sup>3</sup>
SP 791011 soca	Triunfo	Raízes	2,5 x 10 <sup>4</sup>	2,5 x 10 <sup>5</sup>	9,0 x 10 <sup>3</sup>	2,5 x 10 <sup>5</sup>
		Parte Aérea	ND <sup>1</sup>	9,0 x 10 <sup>3</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
SP 813250 planta	Triunfo	Raízes	4,5 x 10 <sup>4</sup>	4,5 x 10 <sup>5</sup>	2,5 x 10 <sup>4</sup>	4,5 x 10 <sup>4</sup>
		Parte Aérea	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>

**Tabela 7.** Número de células por grama de matéria fresca obtida a partir de amostras de cana-de-açúcar obtidas no Estado de Pernambuco e pré-germinadas em casa de vegetação (terceiro isolamento).

Variedade	Origem	Amostras	Meios de cultura			
			Nº células /g massa fresca			
			LGI-P caldo	JMV	LGI	JNFb
RB 867515 planta	Olho D'água	Raízes	$1,4 \times 10^7$	NA <sup>2</sup>	$9,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^7$
		Parte				
		Aérea	$2,5 \times 10^5$	NA <sup>2</sup>	$9,0 \times 10^3$	$9 \times 10^4$
VAT 90212 planta	Olho D'água	Raízes	$1,1 \times 10^7$	NA <sup>2</sup>	$1,4 \times 10^7$	$4,5 \times 10^4$
		Parte				
		Aérea	$9,5 \times 10^5$	NA <sup>2</sup>	$1,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$
RB 863129 4º soca	Olho D'água	Raízes	$9,5 \times 10^5$	NA <sup>2</sup>	$1,4 \times 10^7$	$4,5 \times 10^6$
		Parte				
		Aérea	$9,0 \times 10^3$	NA <sup>2</sup>	$9 \times 10^3$	$9,5 \times 10^4$
RB 863129 Lote 06	Cruangi (Eng. Aninga)	Raízes	$1,1 \times 10^4$	NA <sup>2</sup>	$2,0 \times 10^4$	$4,5 \times 10^5$
		Parte				
		Aérea	$7,0 \times 10^3$	NA <sup>2</sup>	$4,0 \times 10^3$	$4,5 \times 10^4$
RB 869515 Lote 4	Cruangi (Eng. Aninga)	Raízes	$2,5 \times 10^6$	NA <sup>2</sup>	$1,4 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$
		Parte				
		Aérea	$2,5 \times 10^4$	NA <sup>2</sup>	$2,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
RB 92579 5º soca	Cruangi (Eng. Aninga)	Raízes	$4,5 \times 10^6$	NA <sup>2</sup>	$4,5 \times 10^5$	$4,5 \times 10^6$
		Parte				
		Aérea	$9,0 \times 10^3$	NA <sup>2</sup>	$3,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^5$
RB 92579 5º soca	Olho D'água	Raízes	$1,1 \times 10^3$	NA <sup>2</sup>	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$
		Parte				
		Aérea	ND <sup>1</sup>	NA <sup>2</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
SP 832847 Lote 14	Cruangi (Eng. Beleza)	Raízes	$4,5 \times 10^6$	NA <sup>2</sup>	$1,4 \times 10^7$	$2,5 \times 10^6$
		Parte				
		Aérea	$4,5 \times 10^5$	NA <sup>2</sup>	$4,5 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$
RB 931011 [1] planta	Olho D'água	Raízes	$3,0 \times 10^5$	NA <sup>2</sup>	$4,5 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$
		Parte				
		Aérea	$2,5 \times 10^5$	NA <sup>2</sup>	$1,4 \times 10^7$	$9,0 \times 10^4$
SP 813250 Lote 14 15/08/07	Cruangi (Eng. Beleza)	Raízes	$7,5 \times 10^5$	NA <sup>2</sup>	$1,1 \times 10^7$	$1,5 \times 10^6$
		Parte				
		Aérea	$4,0 \times 10^4$	NA <sup>2</sup>	$4,5 \times 10^6$	$7,0 \times 10^4$

1: ND, não detectado pelo método, 2: NA, não avaliado.



**Tabela 8.** Número de células por grama de matéria fresca obtida a partir de amostras de cana-de-açúcar obtidas no Estado de Pernambuco e pré-germinadas em casa de vegetação (quarto isolamento).

Variedade	Origem	Amostras	Meios de cultura			
			Nº células /g massa fresca			
			LGI-P caldo	JMV	LGI	JNFb
RB 92579	Dois Rios	Raízes	2,0 x 10 <sup>4</sup>	NA <sup>2</sup>	4,0 x 10 <sup>3</sup>	2,0 x 10 <sup>4</sup>
		Parte Aérea	ND <sup>1</sup>	NA <sup>2</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
RB 867515	Terra Nova	Raízes	2,0 x 10 <sup>4</sup>	NA <sup>2</sup>	4,5 x 10 <sup>4</sup>	9,0 x 10 <sup>3</sup>
		Parte Aérea	4,0 x 10 <sup>3</sup>	NA <sup>2</sup>	2,5 x 10 <sup>4</sup>	9,0 x 10 <sup>3</sup>
RB 813250	Belo Horizonte	Raízes	2,5 x 10 <sup>4</sup>	NA <sup>2</sup>	4,5 x 10 <sup>4</sup>	9,5 x 10 <sup>4</sup>
		Parte Aérea	7,0 x 10 <sup>3</sup>	NA <sup>2</sup>	ND <sup>1</sup>	ND <sup>1</sup>
RB 863129	Dois Rios	Raízes	2,5 x 10 <sup>4</sup>	NA <sup>2</sup>	4,5 x 10 <sup>4</sup>	4,5 x 10 <sup>4</sup>
		Parte Aérea	ND <sup>1</sup>	NA <sup>2</sup>	2,5 x 10 <sup>4</sup>	1,5 x 10 <sup>4</sup>
RB 72454	Folguedo	Raízes	ND <sup>1</sup>	NA <sup>2</sup>	ND <sup>1</sup>	2,5 x 10 <sup>4</sup>
		Parte Aérea	ND <sup>1</sup>	NA <sup>2</sup>	4,0 x 10 <sup>3</sup>	4,5 x 10 <sup>4</sup>

1: ND, não detectado pelo método, 2: NA, não avaliado.

## 4.2. Ativação dos Isolados

Devido à perda de viabilidade de algumas bactérias em estoque, apenas 201 puderam ser reativados do total de 260 isolados armazenados. O congelamento assim com o descongelamento pode provocar danos a células bacterianas gerando perda de viabilidade, contudo a estabilidade genética dos microrganismos é maior utilizando o congelamento com crioprotetores que a de outros métodos como a liofilização.

## 4.3. Caracterizações Fenotípicas

### 4.3.1. Caracterização morfológica das colônias

#### a) Em meio sólido Batata

Sete grupos foram formados do total de 201 isolados. O agrupamento revelou que muitos isolados foram semelhantes entre si, formando 2 grandes grupos. O maior grupo é o grupo 3 com 91 isolados seguidos pelo grupo 4 com 82 isolados com diferentes dados ecológicos. Os isolados do grupo 3 apresentaram colônias circulares, pequenas e médias, lenticular, com borda inteira, superfície lisa e brilhante de coloração creme. Os isolados do grupo 4 diferiram dos isolados do grupo 3 apenas por apresentar superfície da colônia rugosa.

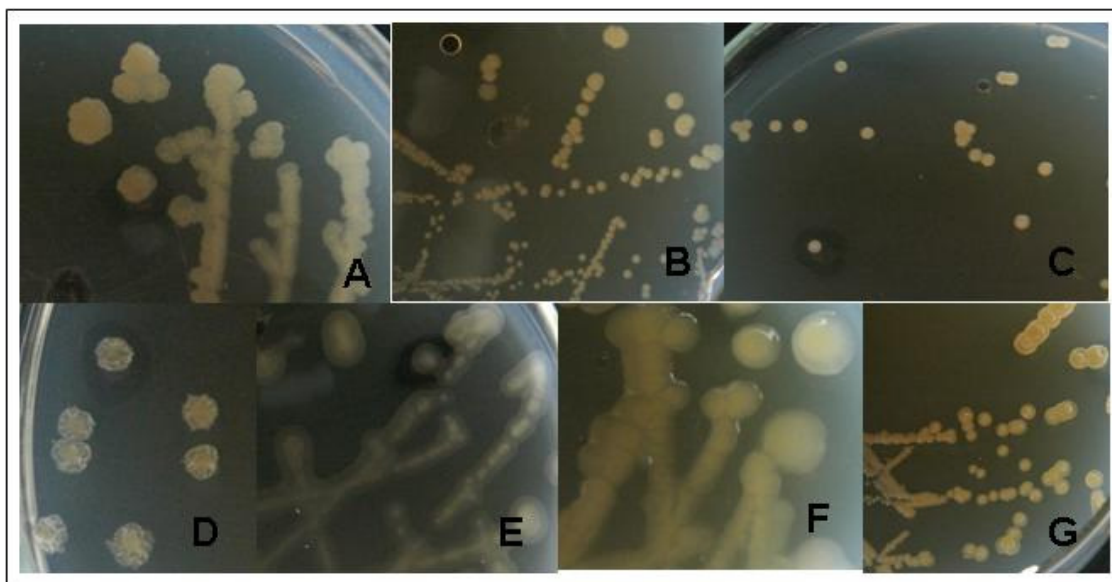
Dos grupos formados apenas o grupo 3 foi similar a um dos padrões analisados. Segundo a análise de similaridade as bactérias provavelmente pertencem ao gênero *Gluconacetobacter*.

Reis et al. (1999) observou que o isolamento deste gênero é favorecido quando se utilizou a pré-germinação dos toletes. Assim como Barbosa et al. (2006) que obteve 51 isolados utilizando esta técnica.

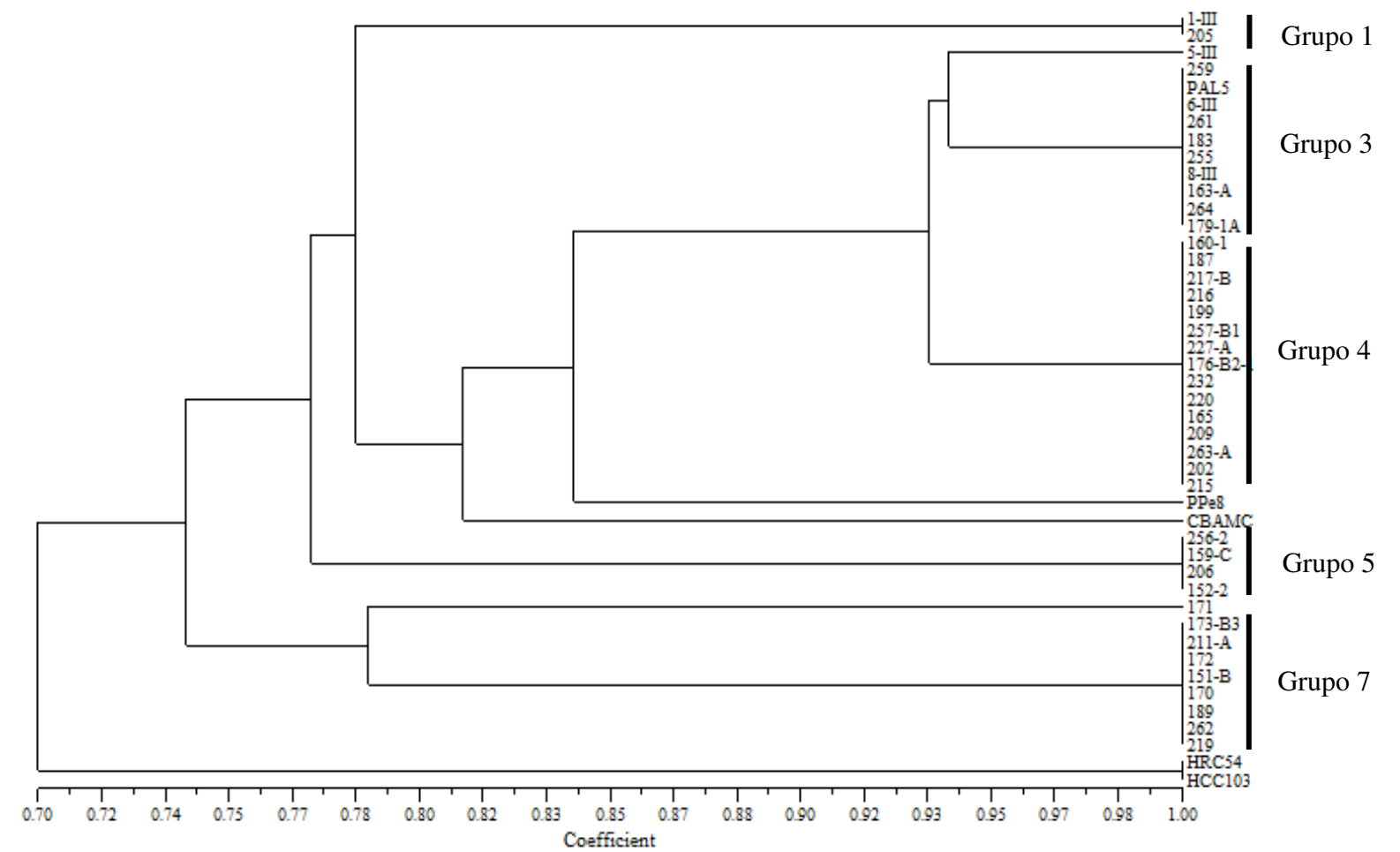
Os grupos obtidos através da caracterização morfológica das colônias em meio

BATATA confirmam que o uso desta técnica permite uma diferenciação entre os isolados (Figura 2).

A partir do agrupamento foram selecionados 40 isolados para as demais análises, contendo representantes de cada grupo (Figura3).



**Figura 2.** Tipos de colônias observadas no meio BATATA. A: pertencentes ao grupo 1. B: grupo 2, C: grupo 3, D: grupo 4, E: grupo 5, F: grupo 6 e G: grupo 7.



**Figura 3.** Dendrograma de similaridade de 40 isolados, provenientes de variedades de cana-de-açúcar e das estirpes padrões: PPe8 (RB 11366-*Burkholderia tropica*); PAL 5 (BR 11281-*Gluconacetobacter diazotrophicus*), HRC 54 (BR 11335-*Herbaspirillum seropedicae*), HCC 103 (BR 11504-*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) e CBAMC (BR 11145-*Azospirillum amazonense*). Gerado no programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir da caracterização de colônias em meio sólido BATATA.

#### **b) Em meio sólido Batata-P e LGI-P**

Alguns isolados do grupo 3 e 4 foram capazes de formar película laranja no meio semi-sólido LGI-P e absorver o corante Azul de Bromotimol, transformando o meio de amarelo para incolor (acidificando o meio) para que possa fixar o nitrogênio atmosférico, após 7 dias de incubação. As colônias são circulares, pequenas e médias, lenticular, com borda inteira, superfície lisa e brilhante de coloração amarela no início do crescimento tornando-se alaranjada após 7 dias de incubação em meio LGI-P. Já em meio Batata-P apresentou forma circular, lenticular, com borda inteira, superfície lisa, brilhante e coloração creme no início do crescimento e tornando-se marrom após 7 dias de incubação. Sendo estes os isolados: 215, 202, 263, 160-1, 216-A, 209, 176-B2-1, 232, 165, 220, 257-B1, 217-B, 187, 216-A, 227-A, 199, 259, 6-III e 8-III. Apresentaram colônias características do gênero *Gluconacetobacter* como descrito por Döbereiner et al., (1995) nos meios de cultura sólidos LGI-P e Batata-P.

#### **4.3.2. Cultivo em meio de cultura semi-sólido**

Segundo Döbereiner et al. (1995) o uso de meios de cultivo semi-sólido semi-seletivos favorece o isolamento e auxilia na identificação pré-liminar de algumas bactérias diazotróficas. No dendrograma obtido pela construção de uma matriz binária e analisado pelo programa NTSYS, índice SM, observou-se a formação de um grande grupo de isolados e alguns menores. Dos 40 isolados testados em diferentes meios semi-sólidos, apenas os isolados do grupo 8 apresentaram película na presença do meio contendo ácido málico (JNFB). O que indica que o meio JNFB pode ser utilizado como um meio específico para o isolamento estas bactérias.

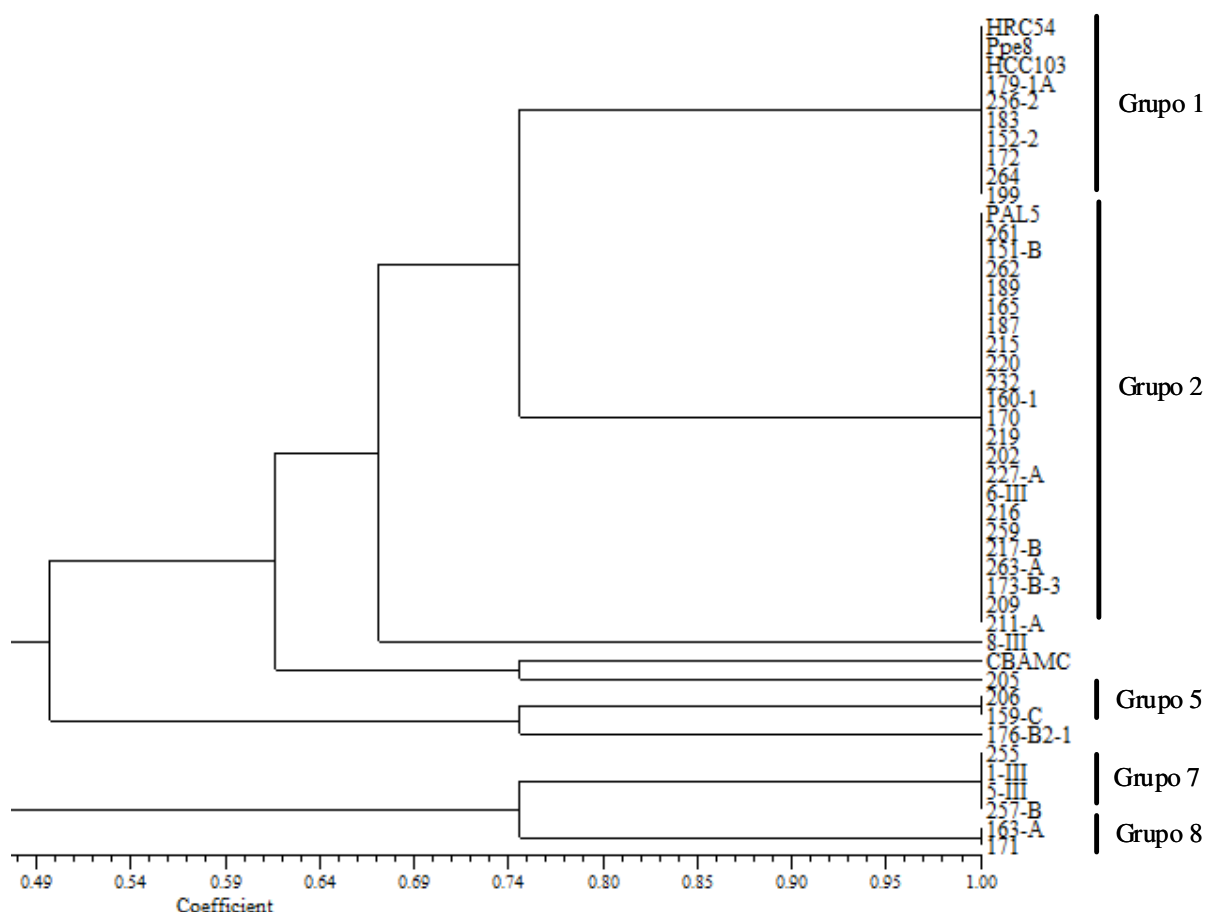
Todos os isolados do grupo 1 desenvolveram película nos meios testados assim como as estirpes tipo PPe8 (RB 11366) *Burkholderia tropica*, HRC 54 (BR 11335) *Herbaspirillum seropedicae* e HCC 103 (BR 11504) *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Apresentando grande capacidade de adaptação a diferentes fontes de carbono e pH. Os 4 isolados pertencentes ao grupo 7 perderam a capacidade de formarem película nos meios testados por isso não foram mais incluídos nas análises de caracterização (Figura 4).

O maior grupo, grupo 2 com 22 isolados (55% dos isolados testados) não cresceram na presença de ácido málico como fonte de carbono, apresentando comportamento semelhante à estirpe tipo PAL 5 (BR 11281) de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Resultado semelhante ao relato por Santos, (2008) que afirma a bactéria cresce bem em presença de sacarose, glicose, frutose, gluconato, manitol, sorbitol e glicerol, mas não utiliza alguns ácidos carboxílicos, como succinato, fumarato e malato. As fontes de carbono usadas pelos diferentes grupos formados no dendrograma apresentado na Figura 4 estão listadas na Tabela 9.

**Tabela 9.** Fontes de carbono usadas pelos grupos formados em dendrograma construído a partir de uma matriz binária e analisado pelo programa NTSYS, índice SM.

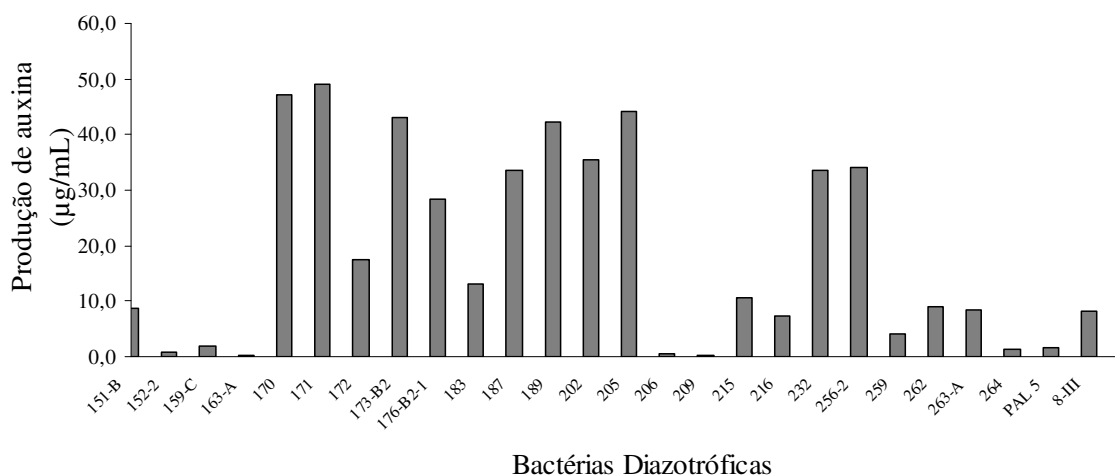
GRUPOS	JMV MANITOL 0,5%	LGI SACAROSE 0,5%	LGI-P SACAROSE 10%	JNFB ÁC. MÁLICO 0,5%
1	+	+	+	+
2	+	+	+	-
3	+	-	+	-
4	-	+	+	-
5	+	-	+	+
6	-	-	+	+
7	-	-	-	-
8	-	-	-	+



**Figura 4.** Dendrograma de similaridade de isolados, provenientes de variedades de cana-de-açúcar gerado no programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir da avaliação da utilização de várias fontes e concentrações de carbono e em meio semi-sólido JMV, JNFB, LGI e LGI-P.

### 4.3.3. Avaliação da capacidade de produção do hormônio auxina (AIA)

A produção de AIA dos 36 isolados testados apresentou grande variação, variando de não detectado a 49,19  $\mu\text{g/mL}$ . Do total de bactérias avaliadas cerca 69% produziram AIA. Resultados semelhantes foram obtidos por Marchioro (2005) que avaliou a produção de AIA e derivados em isolados obtidos de gramíneas, abacaxi, banana e palmeira. A porcentagem de isolados produtores de AIA foi maior nos isolados obtidos de raiz (64%) em relação à parte aérea. Esta relação não foi observada por Barbosa et al., (2009) quando avaliou a produção de AIA de isolados de cana-de-açúcar. Dados da literatura sinalizam a AIA como um hormônio capaz de facilitar associação simbiótica (Silveira et al., 2007- livro microbiologia do solo e qualidade ambiental, Marise Fonseca Dos Santos). Os isolados mais eficientes na síntese de auxina total foram: 171 e 170. O isolado 171 apresentou a maior capacidade de produção de auxinas (49,19  $\mu\text{g/mL}$ ), 29 vezes superior ao padrão utilizado PAL 5 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*). O isolado 209 apresentou a menor capacidade de síntese de AIA (0,179  $\mu\text{g/mL}$ ). As bactérias que apresentaram produção positiva de AIA estão representadas na Figura 5.



**Figura 5.** Produção de hormônio auxina por isolados bacterianos diazotróficos associados à cana-de-açúcar.

### 4.3.4. Avaliação da morfologia celular

Para avaliação morfologia celular os isolados apresentaram diferenças tanto na forma quanto no grau de agregação das células. Dos 36 isolados avaliados 27,5% foram semelhantes à estirpe padrão BR 11366 (*Burkholderia tropica*); 45% a BR 11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e 5% aos demais padrões BR 11335 (*Herbaspirillum seropedicae*), BR 11504 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) e BR 11145 (*Azospirillum amazonense*) dados representados na Tabela 10.

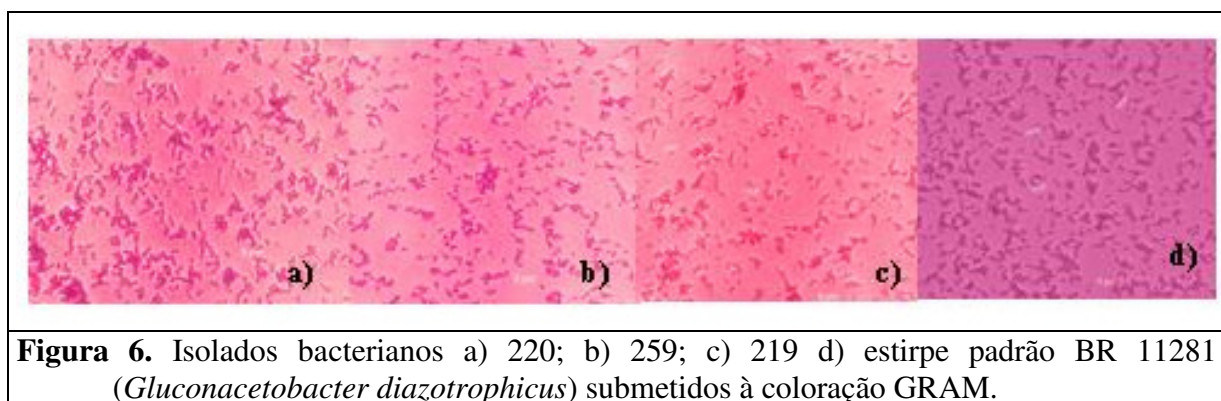
**Tabela 10.** Morfologia das células dos isolados bacterianos e estirpes padrões de cana-de-açúcar.

Bactérias	Forma	<sup>(1)</sup> Grau de Agregação	Bactérias	Forma	<sup>(1)</sup> Grau de Agregação
261	Bastonete	C/A	259	Bastonete	C/A
264	Bastonete	C/A	205	Bastonete curvo (Vibrião)	C/A
179-1A	Bastonete	C/A	159-C	Bastonete	C/A
163-A	Bastonete	C/A	206	Bastonete	C/A
183	Bastonete	C/A	152-2	Bastonete	C/A
215	Bastonete curvo	NC	171	Bastonete	C/A
209	Bastonete curvo	NC	173-B2	Bastonete	C/A
176-B2-1	Bastonete curvo	NC	211-A	Bastonete	C/A
232	Bastonete curvo	NC	189	Bastonete	C/A
263-A	Bastonete curvo	NC	172	Bastonete	C/A
202	Bastonete curvo	NC	151-B	Bastonete	C/A
165	Bastonete curvo	NC	170	Bastonete	C/A
220	Bastonete curvo	NC	262	Bastonete	C/A
217-B	Bastonete curvo	NC	256-2	Bastonete	C/A
187	Bastonete curvo	NC	219	Bastonete	C/A
160-1	Bastonete curvo	NC	BR 11366	Bastonete	C/A
216-A	Bastonete curvo	NC	BR 11335	Bastonete curvo (Vibrião)	NC
227-A	Bastonete curvo	NC	BR 11504	Bastonete curvo (Vibrião)	C/A
199	Bastonete curvo	NC	BR 11145	Bastonete curvo (Vibrião)	C/A
6-III	Bastonete curvo	C/A	BR 11281	Bastonete	NC
8-III	Bastonete curvo	C/A			

<sup>(1)</sup> Presença e ausência de cadeias bacterianas C e NC, respectivamente. (A): formação de agregação.

#### 4.3.5. Reação GRAM

A técnica de coloração revelou classificação GRAM negativa em todos os isolados, assim como nos padrões de bactérias diazotróficas. Revelando a presença de uma parede celular externa lipídica que foi removida durante o processo de coloração.



**Figura 6.** Isolados bacterianos a) 220; b) 259; c) 219 d) estirpe padrão BR 11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) submetidos à coloração GRAM.

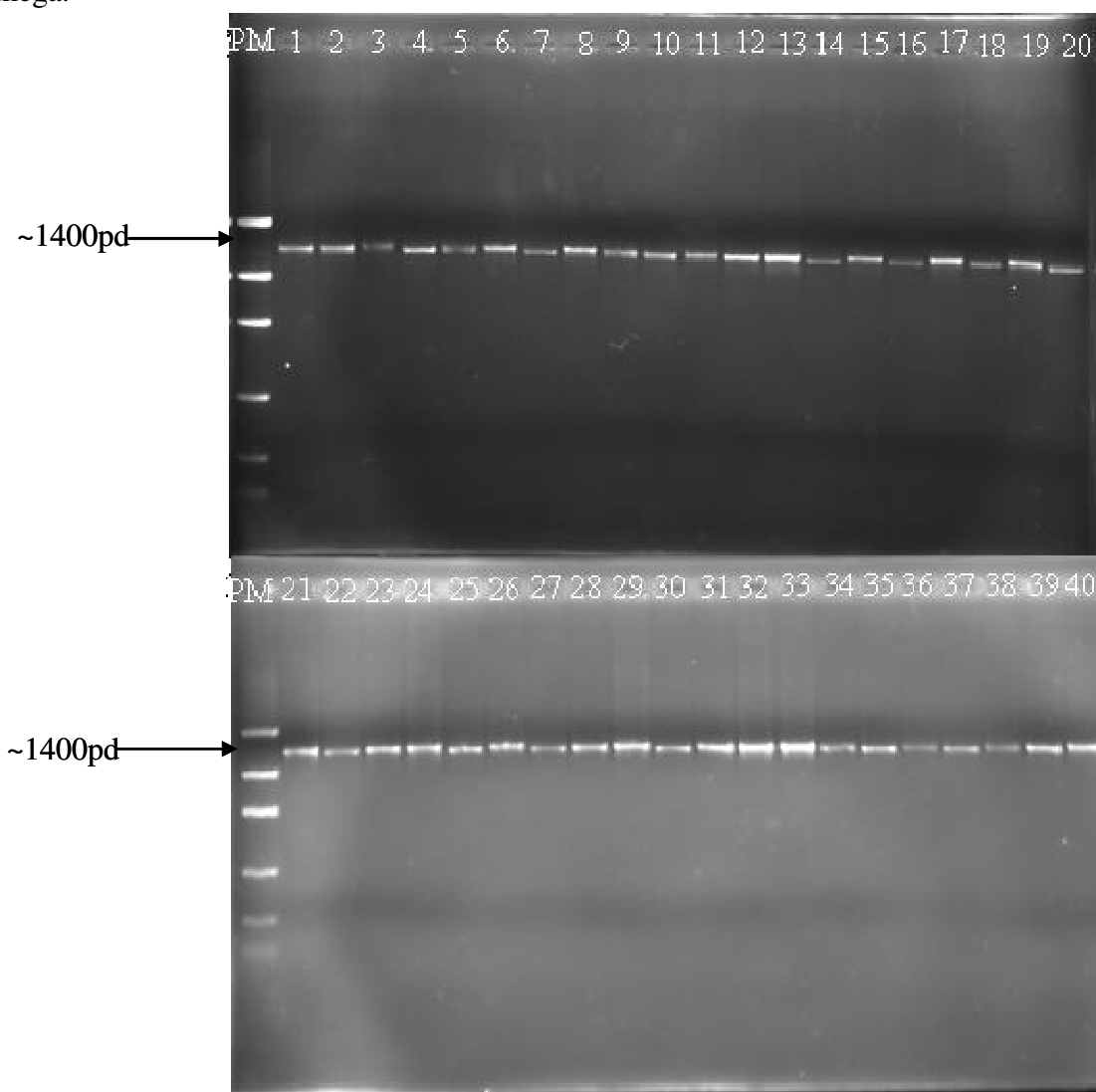
## 4.4. Caracterização Molecular

### 4.4.1. Extração do DNA genômico

O DNA genômico extraído por sua qualidade não necessitou de etapas de purificação posteriores. Ocorreu variação na quantidade de DNA genômico entre as amostras, o que pode ser atribuído a diferença do número de células de cada bactéria cultivada no momento da extração. A quantificação do DNA genômico determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® - SIMONATO et al., 2007) apresentou uma média entre 12 a 160 ng.µL<sup>-1</sup> de concentração.

### 4.4.2. Amplificação do gene 16S DNAr

Em virtude de muitos produtos amplificados apresentarem várias bandas quando visualizados no gel de agarose o mesmo foi submetido a processo de purificação. Onde todo material amplificado (135 µL) foi depositado em tubos, com capacidade para 150 µL e homogeneizado para purificação de acordo com o Kit Wizard® SV de purificação de PCR da Promega.



**Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose 2% do produto de amplificação da região flanqueada pelo par de iniciadores 27f e R1492 para o gene 16S. PM: Marcador de Peso Molecular Low DNA Mass Ladder – Invitrogen. Isolados (1-40).



#### 4.4.3. Reação de seqüenciamento do gene 16S DNAr

A reação de seqüenciamento do gene 16S DNAr dos isolados bacterianos foi realizada conforme descrito no item 3.5.3. Segundo Videira (2008) valores acima de 97% de similaridade caracterizam o isolado com pertencente a uma mesma espécie ou gênero. A análise em MegaBLAST revelou que entre as bactérias analisadas os isolados foram semelhantes a espécie *Burkholderia cenocepacia* (170, 211-A e 262), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (176-B2-1 e 215), *Enterobacter oryzae* (159-C), e ao gênero *Bacillus* (209 e 217-B), *Enterbacter* (206), *Ochrobactrum* (163-B) apresentados na Tabela 11.

Para o posicionamento filogenico as seqüências foram alinhadas e editadas para que todas apresentassem o mesmo número de nucleotídeos. Por este motivo foram geradas duas árvores filogenicas. A primeira árvore os isolados apresentaram seqüências com mais de 700 pb e a segunda com menos de 700 pb. Muitas bactérias apresentaram identidades diferentes da análise de similaridade feita no BLAST é provável que durante a edição das seqüências, a região de maior similaridade tenha sido removida, utilizando-se então uma região com maior variabilidade genética. A árvore filogenética baseada na seqüência do gene 16S rDNA com mais de 700 pb, criada através da comparação com o NCBI GenBank, mostrou que alguns isolados apresentam similaridade de 100% com as espécies de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (nº de acesso no GenBank X97776.1) – isolado 215, *Burkholderia tropica* (nº de acesso no GenBank EF139183.1) – isolado 179-1A e os gêneros de *Burkholderia* – isolados 151-B, 211-A e 219. O isolado 163-B apresentou 97% de similaridade com *Ochrobactrum* sp. estirpe AZn6.1 (nº de acesso no GenBank AB217471.1) assim como o isolado 206 com a espécie *Enterobacter* sp. F3feb (nº de acesso no GenBank X97776.1), confirmando os resultados da análise de BLAST (Figura 8 e 9). Não foi possível obter similaridade superior a 97% para os isolados com seqüências de bases inferiores a 700pb através do banco de dados NCBI.

**Tabela 11.** Análise no programa MegaBLAST do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA dos isolados endofíticos obtidos de variedades de cana-de-açúcar.

Código do isolado	Cultivar/Amostra	Grupo	Blast 16s rDNA	Código de acesso	Máxima Identidade%
1	151-B VAT 90212 14 meses/Raiz	7	<i>Brkholderia cenocepacia</i>	CP000459.1	94
2	170 RB 72454/Raiz	7	<i>Brkholderia cenocepacia</i>	FJ870663.1	97
3	211-A RB 72454/Raiz	7	<i>Brkholderia cenocepacia</i>	CP000459.1	99
4	219 RB 72454/Raiz	7	<i>Brkholderia cenocepacia</i>	CP000458.1	93
5	262 RB 72454/Raiz	7	<i>Brkholderia cenocepacia</i>	CP000459.1	98
6	209 RB 72454/P.A	4	<i>Bacillus</i> sp.	DQ658991.1	97
7	217-B RB 92579/Raiz	4	<i>Bacillus</i> sp.	GU566345.1	99
8	160-1 VAT 90212 14 meses/Raiz	4	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	CP0001189.1	91
9	176-B2-1 RB 72454/P.A	4	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	AM889285.1	97
10	259 RB 867515 soca 14 meses/Raiz	3	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	CP001189.1	90
11	215 RB 72454/P.A	4	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	AM889285.1	97
12	220 SP 813250 14 meses/P.A	4	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	AM889285.1	88
13	165 RB 92579 14 meses/Raiz	4	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	DQ468351.1	94
14	152-2 RB 72454/P.A	5	<i>Paenibacillus favisporus</i>	EF173324.1	80
15	256-2 RB 72454/P.A	5	<i>Uncultured Enterobacter</i> sp.	GQ417628.1	94
16	206 RB 72454/Raiz	5	<i>Uncultured Enterobacter</i> sp.	GQ417628.1	99
17	216-A RB 72454/P.A	4	<i>Uncultured Enterobacter</i> sp.	GQ417629.1	88

**Tabela 11.** Continuação.

	Código do isolado	Cultivar/Amostra	Grupo	Blast 16s rDNA	Código de acesso	Máxima Identidade%
18	179-1A	RB 867515 soca 7 meses/Raiz	3	<i>Burkholderia tropica</i>	EF139183.1	96
19	255	RB 867515/Raiz	3	<i>Burkholderia tropica</i>	EF139183.2	95
20	159-C	RB 72454/Raiz	5	<i>Enterobacter oryzae</i>	EF488758.1	98
21	163-B	RB 72454/Raiz	3	<i>Ochrobactrum sp.</i>	EF587906.1	98
22	257-B1	RB 82579 14 meses/Raiz	4	<i>Ochrobactrum sp.</i>	AY306225.2	87
23	199	RB 72454/P.A	4	<i>Uncultured alpha proteobacterium sp.</i>	GQ984345.1	90



**Figura 8.** Árvore filogenética baseada nas seqüências parciais do gene 16S DNAr dos isolados com mais de 700pb e proteobactérias fixadoras de nitrogênio do banco de dados NCBI. A árvore foi gerada pelo método neighbour-joining. A análise de bootstrapping foi calculada com 1000 repetições.



**Figura 9.** Árvore filogenética baseada nas seqüências parciais do gene 16S DNAr dos isolados com menos de 700pb e proteobactérias fixadoras de nitrogênio do banco de dados NCBI. A árvore foi gerada pelo método *neighbour-joining*. A análise de *bootstrapping* foi calculada com 1000 repetições.

#### 4.5. Análises da Produtividade de colmos (PC) e da Massa Seca da Parte Aérea (MS)

Dentre as cultivares estudadas nem uma apresentou diferença estatística ( $P > 0,05$ ) na produtividade agrícola. A falta de resposta à inoculação foi observada também por Silva et al. (2009). A cultivar com menor média de produtividade foi a RB 72454, que apresentou uma produtividade média de 185,93 Mg/ha. A maior produtividade média foi obtida pela cultivar RB 918639 com 191,96 Mg/ha. Estudos mostram que a resposta à inoculação é bastante variada e que pode estar relacionada a fatores como genótipo de planta e o ambiente de produção.

**Tabela 12.** Produtividade de colmos (Mg/ha) das variedades da cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia.

Tratamentos	Variedades			Médias
	RB 72454	RB 867515	RB 918639	
Mistura	160,6aA	219,5aA	182,2aA	187,4A
160-1	197,2aA	191,6aA	184,5aA	191,1A
179-1A	166,2aA	194,8aA	97,8aA	152,9A
202	202,7aA	208,4aA	151,1aA	187,4A
215	198,0aA	166,0aA	178,8aA	180,9A
263-A	190,7aA	171,9aA	176,4aA	179,7A
Cont. Abs.	174,1aA	181,5aA	208,3aA	187,9A
Cont. Nitr.	233,9aA	202,9aA	207,5aA	218,8A
Médias	185,93a	190,42a	191,96a	
CV(%)	21,39			

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferente letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de significância 0,05. Dados referentes às médias de quatro repetições referentes aos oito tratamentos nas três variedades de cana-de-açúcar.

Os resultados da análise de variância (Tabelas 14) mostraram diferenças estatísticas significativas apenas na produtividade de MS da palha. As variedades RB 72454, RB 867515 apresentaram produtividade de MS de palha significativa quando inoculada com o isolado 160-1. Também apresentou ganho de MS na palha à variedade RB 918639 quando inoculada como isolado 215 em relação aos demais tratamentos ao nível de 5 % de probabilidade.

As variedades RB 72454, RB 867515 e RB 918639 apresentaram produtividade de MS da palha de 0,7 Mg.ha<sup>-1</sup>, 2,5 Mg.ha<sup>-1</sup> e 10,9 Mg.ha<sup>-1</sup>, respectivamente, superior ao controle nitrogenado. Não foram observadas variações dentro nem entre as variedades de cana-de-açúcar quanto aos diferentes tratamentos usados de inoculação em nível de 5% de probabilidade para o colmo, folha bandeira e massa total na produção de MS. Contudo a resposta da inoculação foi bastante variável. A variedade RB 72454 foi a que menos respondeu aos tratamentos de inoculação.

Silva et al. (2009) ao avaliar o efeito da utilização, em campo, de inoculantes compostos (mistura de estirpes de bactérias diazotróficas, polímeros carboximetilcelulose e amido), também não observou resposta à produção de massa de matéria seca total (colmo + ponteiro + palha) significativas entre os tratamentos para a variedade RB72454. Este comportamento pode ser explicado pelas variações ambientais e na possível interação do genótipo vegetal com bactérias endofíticas no processo de FBN.

O tratamento mistura de estirpes promoveu ganho de massa seca em quase todas as partes da cana-de-açúcar analisadas, embora não sejam significativos os valores. Este comportamento foi observado por Canuto et al. (2003), em experimentos de seleção de estirpes de bactérias diazotróficas, que melhor se associavam a plantas micropropagadas. Os autores observaram que tanto as misturas de estirpes quanto as estirpes isoladas eram capazes de promover aumento de massa seca em variedades de cana-de-açúcar.

**Tabela 13.** Produtividade da MS dos colmos ( $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia

Tratamentos	Variedades			Médias
	RB 72454	RB 867515	RB 918639	
Mistura	35,9aA	63,9aA	38,3aA	46,0A
160-1	38,2aA	50,4aA	36,2aA	41,6A
179-1A	49,5aA	42,3aA	62,0aA	51,3A
202	62,4aA	45,8aA	43,2aA	50,5A
215	58,3aA	47,3aA	54,1aA	53,2A
263-A	38,6aA	41,2aA	38,1aA	39,3A
Cont. Abs.	49,0aA	57,2aA	46,7aA	51,0A
Cont. Nitr.	62,3aA	57,2aA	33,5aA	51,0A
Médias	49,3a	50,7a	44,0a	
CV(%)	47,77			

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferente letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de significância 0,05. Dados referentes às médias de quatro repetições referentes aos oito tratamentos nas três variedades de cana-de-açúcar.

**Tabela 14.** Produtividade da MS das folhas bandeira ( $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia

Tratamentos	Variedades			Médias
	RB 72454	RB 867515	RB 918639	
Mistura	7,8aA	7,2aA	8,7aA	7,9A
160-1	10,2aA	8,6aA	6,7aA	8,5A
179-A	6,4aA	6,9aA	7,6aA	7,0A
202	9,5aA	7,2aA	8,4aA	8,4A
215	8,9aA	9,2aA	10,5aA	9,6A
263-A	9,5aA	7,2aA	9,0aA	8,5A
Cont. Abs.	8,2aA	7,2aA	7,6aA	7,7A
Cont. Nitr.	10,5aA	8,2aA	7,0aA	8,6A
Médias	7,7a	8,2a	8,2a	
CV(%)	32,91			

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferente letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de significância 0,05. Dados referentes às médias de quatro repetições referentes aos oito tratamentos nas três variedades de cana-de-açúcar.

**Tabela 15.** Produtividade da MS das palhas ( $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia

Tratamentos	Variedades			Médias
	RB 72454	RB 867515	RB 918639	
Mistura	14,3aA	18,9aA	19,8bA	17,6A
160-1	23,8aA	18,9aA	12,3bB	18,3A
179-1A	15,1aA	12,2aA	18,7bA	15,2A
202	19,8aA	19,6aA	17,5bA	19,0A
215	18,6aA	17,1aA	29,4aA	21,7A
263-A	15,5aA	18,5aA	17,7bA	17,2A
Cont. Abs.	16,5aA	21,7aA	18,9bA	19,0A
Cont. Nitr.	23,1aA	16,4aA	18,5bA	19,3A
Médias	18,3a	17,9a	19,1a	
CV(%)	32,88			

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferente letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de significância 0,05. Dados referentes às médias de quatro repetições referentes aos oito tratamentos nas três variedades de cana-de-açúcar.

**Tabela 16.** Produtividade da MS total ( $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia

Tratamentos	Variedades			Médias
	RB 72454	RB 867515	RB 918639	
Mistura	58,0aA	89,9aA	66,9aA	71,6A
160-1	72,2aA	77,9aA	55,3aB	68,5A
179-1A	71,0aA	61,5aA	88,2aA	73,6A
202	91,7aA	72,6aA	69,2aA	77,8A
215	85,9aA	73,7aA	93,9aA	84,5A
263-A	63,2aA	67,1aA	64,9aA	65,1A
Cont. Abs.	73,7aA	86,0aA	73,3aA	77,7A
Cont. Nitr.	95,9aA	81,7aA	59,1aA	78,9A
Médias	76,5a	76,3a	71,3a	
CV(%)	36,42			

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferente letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de significância 0,05. Dados referentes às médias de quatro repetições referentes aos oito tratamentos nas três variedades de cana-de-açúcar.

#### 4.6. Análises dos Teores de N Total na Parte Aérea

Os teores de nitrogênio total apresentaram diferenças estatísticas significativas em nível de 5% nas análises realizadas na folha bandeira para as variedades RB 918639 e RB 72454. As variedades RB 918639 e RB 72454 apresentaram os maiores teores de N total em relação aos demais tratamentos quando inoculadas com os isolados 215 ( $96,8 \text{ kg}\cdot\text{há}^{-1}$ ) e 160-1 ( $69,7 \text{ kg}\cdot\text{há}^{-1}$ ) respectivamente (Tabela 18). Estes valores foram 147 e 19 vezes superiores ao controle nitrogenado respectivamente. Este fato positivo de inoculação pode ser atribuído ao processo de FBN, síntese de fitohormônios de crescimento como a auxina ou por um efeito sinérgico destes fatores sobre a planta segundo Canuto et al. (2003).

A variedade RB 867515 não apresentou resposta a adubação nitrogenada e nem aos tratamentos inoculados para nem uma das análises realizadas de N total (Tabela 15, 16, 17 e 18). Segundo Xavier (2006) a variedade RB 72454 apresenta alto potencial para FBN, com

base nas técnicas de balanço de N-total no sistema solo/planta.

**Tabela 17.** Análises dos teores de N total (kg.ha<sup>-1</sup>) no colmo das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia

Tratamentos	Variedades			Médias
	RB 72454	RB 867515	RB 918639	
Mistura	6,6aA	5,2aA	7,7aA	6,5A
160-1	11,2aA	7,5aA	4,7aA	7,8A
179-1A	4,6aA	4,9aA	6,1aA	5,2A
202	9,3aA	5,6aA	7,2aA	7,4A
215	8,2aA	12,2aA	11,1aA	10,5A
263-A	8,9aA	6,1aA	8,2aA	7,6A
Cont. Abs.	7,8aA	6,3aA	6,3aA	6,8A
Cont. Nitr.	11,9aA	6,9aA	5,1aA	7,9A
Médias	8,6a	6,9a	7,0a	
CV(%)	69,42			

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferente letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de significância 0,05. Dados referentes às médias de quatro repetições referentes aos oito tratamentos nas três variedades de cana-de-açúcar.

**Tabela 18.** Análises dos teores de N total (kg.ha<sup>-1</sup>) na folha bandeira das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia

Tratamentos	Variedades			Médias
	RB 72454	RB 867515	RB 918639	
Mistura	20,8aA	36,6aA	39,6bA	32,4A
160-1	69,7aA	38,5aB	16,3bB	41,5A
179-1A	24,3aA	15,4aA	39,4bA	26,4A
202	43,2aA	39,5aA	30,9bA	37,9A
215	36,9aB	34,1aB	96,8aA	55,9A
263-A	24,7aA	37,8aA	32,5bA	31,7A
Cont. Abs.	30,1aA	50,6aA	36,2bA	39,0A
Cont. Nitr.	58,5aA	26,9aA	39,1bA	41,5A
Médias	38,5a	34,9a	41,4a	
CV(%)	76,39			

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferente letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de significância 0,05. Dados referentes às médias de quatro repetições referentes aos oito tratamentos nas três variedades de cana-de-açúcar.



**Tabela 19.** Análises dos teores de N total (kg.ha<sup>1</sup>) na palha das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia

Tratamentos	Variedades			Médias
	RB 72454	RB 867515	RB 918639	
Mistura	141,9aA	485,5aA	204,1aA	277,2A
160-1	156,2aA	271,2aA	135,5aA	187,6A
179-1A	274,2aA	270,2aA	529,3aA	357,9A
202	513,5aA	215,2aA	192,9aA	307,2A
215	410,7aA	285,8aA	293,0aA	328,9A
263-A	177,4aA	170,2aA	175,5aA	174,3A
Cont. Abs.	302,3aA	340,8aA	280,6aA	307,9A
Cont. Nitr.	427,9aA	369,5aA	154,4aA	317,3A
Médias	300,5a	301,1a	245,7a	
CV(%)	96,64			

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferente letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de significância 0,05. Dados referentes às médias de quatro repetições referentes aos oito tratamentos nas três variedades de cana-de-açúcar.

**Tabela 20.** Análises dos teores de N total (kg.ha<sup>1</sup>) na parte aérea das variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia

Tratamentos	Variedades			Médias
	RB 72454	RB 867515	RB 918639	
Mistura	169,2aA	527,4aA	215,1aA	316,1A
160-1	237,1aA	317,2aA	156,3aA	236,9A
179-1A	303,1aA	290,6aA	574,8aA	389,5A
202	565,9aA	260,3aA	231,0aA	552,4A
215	455,8aA	332,1aA	400,9aA	396,3A
263-A	211,1aA	214,1aA	216,1aA	213,9A
Cont. Abs.	340,2aA	397,8aA	323,2aA	353,7A
Cont. Nitr.	498,4aA	403,4aA	198,7aA	366,8A
Médias	347,6a	342,8a	294,1a	
CV(%)	87,38			

<sup>1</sup> Médias seguidas de diferente letra minúscula na coluna e maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ao nível de significância 0,05. Dados referentes às médias de quatro repetições referentes aos oito tratamentos nas três variedades de cana-de-açúcar.

## 5 CONCLUSÕES

- Através do uso de métodos moleculares e fisiológicos foi possível estudar a diversidade populacional e identificar alguns isolados.
- Alguns isolados foram eficientes na promoção de crescimento vegetal de plantas de cana-de-açúcar no campo, aos 10 meses após plantio, promovendo aumento de massa seca na palha e nos teores de nitrogênio total em folha bandeira da cultura.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, B.J.R.; BAÊTA, A.M.; ALVES, J.V. Protocolo da Embrapa Agrobiologia para análise de nitrogênio em adubos orgânicos, solo e tecidos. Embrapa Agrobiologia, 1994. 17 p. (Embrapa-CNPAB. **Documentos**, 100).
- ASH, C.; PRIEST, F.G.; COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Journal of Microbiology Serol.** v. 64, p. 253-260, 1993.
- AZEREDO, D.F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, H.; VIEIRA, J.R. Nitrogênio na cana planta; doses e fracionamento. **STAB-Açúcar, Álcool e Subprodutos.** v. 4, p. 32-36, 1986.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.V.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **Inter. J. System. Bacteriol.**, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum spp.* no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** 1996. 238 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia spp.* **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 485-491, 2000.
- BARBOSA, E.A.; PERIN, L.; REIS, V.M. Uso de fontes de carbono por *G. diazotrophicus* isolados de plantas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 827-833, 2006.
- BARBOSA, M. V.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; SILVA, M. DE O.; COSTA, D. P. DA. Produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas associadas à cana-de-açúcar In: IX Jornada de Ensino Pesquisa e Extensão UFRPE, 2009, Recife, **Anais da IX JEPEX, 2009.** Recife: UFRPE, 2009.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Journal of Plant growth regulation.** v. 24, p. 7-11, 1998.
- BEN DEKHIL, S., CAHILL, M., STACKEBRANDT, E. & SLY, L. I. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largimobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp.

nov. **Systematic Applied Microbiology**. v. 20, p.72–77, 1997.

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

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

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

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

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. DE; ALVES, B. JR.; URQUIAGA, S. Field application of the <sup>15</sup>N isotope dilution technique for the reliable quantification of plant-associated biological nitrogen fixation. **Fertilizer Research**. v. 42, p. 77–87, 1995.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; REIS, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, n.º.137, p. 111-117, 1991.

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of <sup>15</sup>N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to sugar cane and others grasses. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.28, p.889-895, 2001.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V.M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.

BURDMAN, S.; JURKEVITCH, E.; SCHWARTSBURD, B.; HAMPEL, M.; OKON, Y. Aggregation in *Azospirillum brasilense*: effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. **Microbiology**. v. 144, p. 1989-1999, 1998.

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

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

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., in N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophyte species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CANUTO, E. DE L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; SALLES, J. F.; PERIN, L. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, v. 37(2):67-72, 2003.

CAVALCANTE, V. A. & DOBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

COENYE, T.; GEVERS, D.; PEER, Y. V.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.147-167, 2005.

COLWELL, R. R. Polyphasic taxonomy of bacteria. In: IIZUKA H.; HASEGAWA T. (eds.). **Culture Collections of Microorganisms**, Tóquio: University of Tokyo Press, p. 421-436, 1970.

CONAB – Conselho Nacional de Abastecimento (2009). Disponível: site IBGE. URL <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/cana.pdf>. Consultado em 15 de setembro de 2009.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacterial isolated from banana (*Musa* spp.) e abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375-2379, 2001.

DEUTSCHBAUER, A. M.; CHIVIAN, D.; ARKIN, A. P. Genomics for environmental microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.229-235, 2006.

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

DÖBEREINER J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Research Biology**, v.1, p. 261-272, 1958.

DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 19, p. 251-258, 1959.

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

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas em plantas não leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia,

1995, 60 p.

ECKERT, B., WEBER, O. B., KIRCHHOF, G., HALBRITTER, A., STOFFELS, M. & HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineri* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 17–26, 2001.

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

EUCLYDES, R. F. **Manual de utilização do programa SAEG (Sistema de Análise Estatística e Genética)**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1983. 59p.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution** v.39, p.783-791, 1985.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 5.0. In: 45ª Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45ª, 2003, São Paulo, **Resumo...** São Paulo: UFSCar, São Carlos, 2003. p.255-258.

FORNEY, L. J.; ZHOU, X.; BROWN C. J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. **Current Opinion Microbiology**, v.7, n°3, p.210-20, 2004.

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

FRY, J. Bacterial diversity and ‘unculturables’. **Microbiology Today**, v.27, p.86–188, 2000.

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

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

GERMIDA, J. J. Population dynamics of *Azospirillum brasilense* and its bacteriophage in soil. **Plant and Soil**, v. 6, p. 189-203, 1986.

GEVERS, D.; COHAN, F. M.; LAWRENCE, J. G.; SPRATT, B. G.; COENYE, T.; FEIL, E. J.; STACKEBRANDT, E.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F. L.;

SWINGS, J. Opinion: re-evaluating prokaryotic species. **Nature Review Microbiology**, v.3, p.733–739, 2005.

GILLIS, M., TRAN, Van V., BARDIM, R., GOOR, M., HEBBAR, P., WILLEMS, A., SEGERS, P., KERSTENS, K., Heulin, T., and FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an amended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 45, 274-289, 1995.

GILLIS, M.; DOBEREINER, L.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autrophicum*. In: Polsinelli, M., Materassi, R., and Vicenzi, M. Eds. Nitrogen fixation. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht, 1991. pp. 292-294.

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

GRACIOLLI, L. A; FREITAS, J. R.; RUSCHEL, A P. Bactérias fixadoras de Nitrogênio nas raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). **Revista de Microbiologia**, v. 14, p. 191-196, 1983.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crop in the tropic: the case of soybean (*Glycine max* (L.) Merr) in South America In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K. (Ed.) **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston: Studium Press, LLC, 2006. p 43-93.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v.3854, p.1-13, 2000.

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

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16, p.111-120, 1980.

LEVEAU J.H.J. The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, 119: 279–300, 2007.

LIMA, E.; BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a <sup>15</sup>N-aided nitrogen balance. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 24, p. 413–419, 1987.

LOWRY, O. H.; ROSEBRUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement

with folin phenol reagent. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 183, p. 265-275, 1951.

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

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S.A. Avaliação do estado nutricional das plantas. **Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato**. 1989. 201 p.

MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74f. Tese (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal do Paraná - Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, Curitiba.

MAYR, E.; ASHLOCK P.D. **Principles of systematic zoology**. 2nd ed. McGraw-Hill, Inc., 1991, p.1–12

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

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

NEWMAN, D.K.; BANFIELD J.F. Geomicrobiology: How molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. **Science**, v.296, p.1071-1077, 2002.

NEYRA, C.A.; VAN BERKUM, P. Nitrate reduction and nitrogenase activity in *Spirillum lipoferum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 23, p. 306-310, 1977.

OLIVARES, F. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. **Boletim informativo da SBCS**. Janeiro-Abril, 2009. 33-34 p.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology & Fertility of Soils**, v. 21, p. 197–200, 1996.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA S.; BALDANI, J.I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, ago. 2003. 40 p. (Embrapa Agrobiologia. **Documentos**, 161).

OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Burning cane: the long term effects. **International Sugar Journal**, v. 96, p. 272-75, 1994.

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



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

PERIN, L.; ARAÚJO, J. L. S.; REIS, V. M. Aspectos genéticos e moleculares na interação entre organismos patogênicos e diazotróficos em cana-de-açúcar. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, set. 2007. 41 p. (Embrapa Agrobiologia. **Documentos**, 233).

PERIN, L.; ARAÚJO, J.L.S.; REIS, V.M. O gênero *Burkholderia*: um importante componente da comunidade microbiana. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2006. p.1-32. (Embrapa Agrobiologia. **Documentos**, 219)

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

POLIDORO, J.C. **O molibdênio na nutrição nitrogenada e na contribuição da fixação biológica do nitrogênio associada à cultura da cana-de-açúcar.** 2002. 185f. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Seropédica, RJ.

PRAKASH, O.; VERMA, M.; SHARMA, P.; KUMAR, M.; KUMARI, K.; SINGH, A.; KUMARI, H.; JIT, S.; GUPTA, S. K.; KHANNA, M. Polyphasic approach of bacterial – An overview of recent advances. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.47, p. 98-108, 2007.

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

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus sensu lato* and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus* gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzae* gen. nov., sp. nov. and *Azonexus fungiphilus* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.50, p.649–659, 2000.

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

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

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias

diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 985-994, 2000.

REIS, V. M. **Aspectos ecológicos e fisiologia da bactéria fixadora de N<sub>2</sub> *Acetobacter diazotrophicus***. 1991. 119f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

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

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

REIS, V.M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS, V.M.; PERIN, L.; REIS JUNIOR, F.B. Uma nova estratégia para isolar *Gluconacetobacter diazotrophicus* de plantas de cana-de-açúcar. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1999. 5 p. (Embrapa Agrobiologia. **Documentos**, 35).

RESENDE, A.S.; SANTOS, A.; XAVIER, R.P.; COELHO, C.H.; GONDIM, A.; OLIVEIRA, O.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Efeito da queima da palha da cana-de-açúcar e de aplicações de vinhaça e adubo nitrogenado em características tecnológicas da cultura. **R. Bras. Ci. Solo**, 30:937-941 p, 2006.

RESENDE, A. S. **Efeito da queima e das aplicações de nitrogênio e vinhaça após 16 anos de cultivo de cana-de-açúcar**. 2003. 120f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Universidade Federal Rural d Rio de Janeiro, Seropédica.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J.R.V.A.; VICTOT, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. Citri Tipo B. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 12, p. 16, 1982.

RODRIGUES, L. da S., **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado**. 2004, 94 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

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

ROSWALL, T. Nitrogen losses from terrestrial ecosystems: global, regional and local considerations. In: **International meet Global Impacts of Applied Microbiology**, v. 5, p. 17-26, 1979.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing

phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v.4, p.406-425, 1987.

SANTOS, C.C.R. DOS; PERIN, L.; BALDANI, J.I.; REIS, V.M. Isolamento de *Gluconacetobacter* spp. em diferentes tipos de solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 85-92, 2006.

SANTOS, M.F. DOS. **Proteoma diferencial da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivada com plântulas de cana-de-açúcar**. 2008, 108 p. Tese (Doutorado em química). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SARWAR, M.; REMER, R.J. **Determination of bacterially derived auxins using a microplante method**. **Letters in Applied Microbiology**. Orford, v. 20, p.282 – 285, 1995.

SCHLEIFER, K.H. Microbial diversity: facts, problems and prospects. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p.3-9, 2004.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n°2, p. 507-512, 1974.

SELDIN, L.; VAN ELSAS, J.D.; PENIDO, E.G.C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and roots. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 34, p. 451-456, 1984.

SILVA, F.C. da. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Empresa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370 p.

SILVA, M.C. DE B.; ANDRADE, P.A.M. DE. Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas In: SALA, V.M.R.; SILVEIRA, A.D. da; CARDOSO, E.J.B.N. (Eds). **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. 312p.

SILVA, M.F.; OLIVEIRA, P.J.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; REIS, V.M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, no.11 Brasília Nov. 2009. 7p.

SIMONATO, L.E.; GARCIA, J.F.; NUNES, C.M.; MIYAHARA, G.I. Avaliação de dois métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação em PCR. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n°. 2, p. 121-127, abril 2007.

SIMPSON, G.G. A classification of living animals. London, Wiley, New York, **Science**, v.134, p. 1745-1745, 1961.

SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. Numerical taxonomy. **Nature**, v.193, p.855-860, 1962.

SOUTO, S.M.; DOBEREINER, J. Fixação de N atmosférico por *Beijerinckia* na rizosfera do capim elefante (*Pennisetum purpureum*) “elefante pinda”. In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, v. 11, p. 32-34, 1967.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) programa version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, 10.1093/molbev/msm092, 2007.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v.18, p.448-459, 2001.

TARRANT, J.J.; KRIEG, N.R.; DOBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 8, p. 967-980, 1978.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J.; CLUSTAL W. improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. **Oxford Journal**, v. 22, p. 4673-468, 1994.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, v. 10, n° 296, p. 1064-1066, 2002.

TRIVELIN, P.C.O. **Utilização do nitrogênio pela cana-de-açúcar: três casos estudados com uso do traçador <sup>15</sup>N**. Piracicaba: Livre docência, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2000. 143p.

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

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

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

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLS, M.; DEVOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 60, n. 2, p. 407-437, 1996.

VIDEIRA, S.S. **Taxonomia polifásica de bactérias diazotróficas do gênero *Sphingomonas* spp. e efeito da inoculação em plantas de arroz**. 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia. Seropédica, RJ.

WEBER, O.B.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v.1(210):103-113, 1999.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v.51:221-271, 1987.

XAVIER, R.P. **Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-açúcar**. 2007. 71f. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do

Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ.

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

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of 7 species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 36:1251-1275, 1992.

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

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STANCEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, J. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman, 1992. p.43-86.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, p.203-214, 2000.

## 7 ANEXOS

### A - Meios de Cultivo

**Meio JMV** (BALDANI V. L. D., 1996. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica.)

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

Ajustar o pH para 5,0 – 5,4.

Completar para 1000 ml com água destilada.

Adicionar 1,6 g l-1 de agar para semi-sólido e 25 g l-1 para sólido.

Para meio líquido adicionar 10 mM de glutamato de sódio (1,87g/l) (indicador opcional).

**Meio LGI** (MAGALHÃES et al., Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.55:417-430, 1983)

Açúcar cristal (sacarose)		5g	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	2 ml	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	6 ml	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 ml	
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 ml	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 0.1 %	2 ml	
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	1 ml	
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	5 ml	
FeEDTA	sol. 1,64 %	4 ml	
Vitamina para meio de cultura		1 ml	

Ajustar o pH para 6,0 – 6,2 com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 %

Completar para 1000 ml com H<sub>2</sub>O destilada.

Adicionar 1,4 g l-1 de agar para semi-sólido e 15 g l-1 para sólido.

**Meio DYGS** (RODRIGUEZ NETO, Summa Phytopathologica, Campinas, v.12(1-2). p. 16, 1986. )

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

Ajustar o pH com solução de KOH a 10%:

pH 6,0 para Herbaspirillum.

pH 6,0 para Gluconacetobacter (menos ácido málico).

pH 6,8 para Azospirillum.

Completar para 1000 ml com H<sub>2</sub>O destilada.  
Adicionar 15g l-1 de agar para meio sólido.

**Meio LGI-P** (DÖBEREINER et al., Embrapa-SPI, Brasília, 1995)

Açúcar Cristal (sacarose)		100 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	2 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	6 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 ml
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 0.1 %	2 ml
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	1 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	5 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml

Ajustar o pH para 5,5 com solução de ácido acético a 1%.  
Completar para 1000ml com água destilada.  
Adicionar 1,3 g l-1 de agar para semi-sólido e 25 g l-1 para sólido.

**Meio JNFb** (DÖBEREINER et al., Embrapa-SPI, Brasília, 1995)

Ácido málico		5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	6 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	18 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 ml
NaCl	sol. 10 %	1 ml
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	2 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	4 ml
Sol. de micronutrientes para meio de cultura		2 ml
Vitamina para meio de cultura		1 ml
KOH		4,5 g
Extrato de levedura (somente para meio sólido)		20 mg

Ajustar o pH para 5,8 com solução de KOH a 1%.  
Completar para 1000 ml com água destilada.  
Adicionar 1,7 g l-1 de agar para semi-sólido e 17 g l-1 para sólido.

**Meio LG** (DÖBEREINER et al., Embrapa-SPI, Brasília, 1995)

Açúcar Cristal (sacarose)		20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	0,5 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	sol. 10 %	1,5 ml
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	2 ml
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	2 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 0.1 %	2 ml
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	sol. 1 %	1 ml
Azul de bromotimol	sol. 0,5 % em 0,2 N de KOH	5 ml

Ajustar o pH para 6,6 – 7,0.  
Completar para 1000 ml com água destilada.  
Adicionar 15 g l-1 de agar para sólido.

**Meio Batata-P** (DÖBEREINER et al., Embrapa-SPI, Brasília, 1995)

Batata cozida		200 g
Açúcar cristal		100 g
Solução de micronutrientes		2 ml
Solução de vitaminas		1 ml

Pesar os 200 g de batata e cozinhar em água destilada durante 30 minutos. Paralelamente o açúcar cristal, o micronutriente e a vitamina em 50 ml de água destilada com 2 gotas de azul de bromotimol sol. 0,5% em 0,2 N de KOH. Filtrar a batata em algodão e juntar a solução preparada anteriormente ao filtrado. Completar o volume para 1000 ml. Adicionar e ajustar o pH com ácido acético até atingir pH 5,5. Adicionar 25g l-1 de ágar para sólido.

## **B – Soluções**

### **Solução salina para diluição seriada**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	sol. 10 %	1 ml
MgSO <sub>4</sub>	sol. 10 %	0,5 ml
NaCl	sol. 10 %	0,2 ml
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	sol. 10 %	0,5 ml
FeEDTA	sol. 1,64 %	1 ml
Sol. De micronutrientes para meio de cultura		0,5 ml

Ajustar o pH para 6,5 com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 %, Completar com água destilada para 1000 ml.

### **Solução de micronutrientes para meio de cultura**

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,200g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,235g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> .	0,280g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,008g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,024g

Completar o volume para 200 ml com água destilada.

### **Solução de vitaminas**

Biotina	10 mg
Piridoxol – HCl	20 mg

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

**Reagente de Lowry** (LOWRY et al., Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951)

Solução A: 50 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 1 l de água destilada, 0,47 M

Solução B: 1 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 1 l de água, KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,08 M,

Solução C: 1 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O em 1 l de água destilada, 0,04 M

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

### **Tampão fosfato – 0,5M**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	170 g	2 l H <sub>2</sub> O
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68 g	1 l H <sub>2</sub> O

Promover a mistura das duas soluções e ajustar o pH para 7,0. Guardar em geladeira e diluir em água destilada na hora do uso.

### **TAE 1 X**

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

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



**Tampão de amostra**

0,25% de azul de bromofenol

40% de sacarose em água

A solução foi esterilizada e estocada a 4 oC

**Revelador kodak D79**

Metol 3,5 g

Sulfito de sódio 60,0 g

Hidroquinona 9,0 g

Carbonato de sódio 40,0 g

Brometo de potássio 3,0 g

Aquecer 700 ml de água a 50 °C, colocar os reagentes na seqüência e completar para 1000 ml.

**TBE 10 X**

Tris Base 121 g

Ácido bórico 55,6 g

EDTA 9,3 g

Água 1000 ml