

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Monitoramento do estabelecimento das bactérias presentes
no inoculante da Embrapa, durante o desenvolvimento
inicial de plantas de cana-de-açúcar utilizando técnicas
microbiológicas e moleculares**

CAROLINE BARRA SALES KHAYAT DA COSTA

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**Monitoramento do estabelecimento das bactérias presentes
no inoculante da Embrapa, durante o desenvolvimento
inicial de plantas de cana-de-açúcar utilizando técnicas
microbiológicas e moleculares**

Caroline Barra Sales Khayat da Costa

Orientação do pesquisador
José Ivo Baldani

Co-orientação da pesquisadora
Márcia Soares Vidal

**Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências no Curso de Pós-Graduação em
Fitotecnia.**

Seropédica - RJ

Julho/2016

Página da ficha catalográfica

633.61

C837m

T

Costa, Caroline Barra Sales Khayat da, 1985-

Monitoramento do estabelecimento das bactérias presentes no inoculante da Embrapa, durante o desenvolvimento inicial de plantas de cana-de-açúcar utilizando técnicas microbiológicas e moleculares / Caroline Barra Sales Khayat da Costa - 2016.

61 f.: il.

Orientador: José Ivo Baldani.

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

Bibliografia: f. 43-59.

1. Cana-de-açúcar - Teses. 2. Nitrogênio - Fixação - Teses. 3. Plantas - Efeito do nitrogênio - Teses. 4. Bactérias patogênicas - Teses. 5. Fitotecnia - Teses. I. Baldani, José Ivo, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CAROLINE BARRA SALES KAYHAT DA COSTA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Dissertação aprovada em 26/07/2016.

José Ivo Baldani, Ph.D.
Embrapa Agrobiologia
Orientador

Márcia Reed Rodrigues Coelho, Dra.
Embrapa Agrobiologia

Silvia Regina Goi, Profa., Ph.D.
UFRRJ

Dedico esta dissertação

A Deus, à minha família, aos amigos, colegas de trabalho e orientadores pelo apoio, força, incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, à Embrapa Agrobiologia, ao curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, e à Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade, estrutura e pelo apoio financeiro.

Aos meus orientadores José Ivo Baldani e Márcia Soares Vidal por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, fazerem parte da minha vida com ensinamentos que carregarei por toda minha vida.

À minha família linda, meu marido Diogo Khayat da Costa e meu filho Guilherme Barra Sales Khayat da Costa, que sempre foram os meus motivos para continuar, tudo que faço é por vocês.

À minha mãe Virginia Maria Barra Sales, pelo amor incondicional. Por ser essa pessoa de fibra, que muito me ensinou, e por ser a pessoa que mais acredita e se orgulha, mesmo quando eu não o faço. Obrigado também por cuidar do meu filho, só assim poderia ter concluído. Te amo mãe.

Ao meu pai Orlando José Angelice Sales, por toda educação que me foi dada, uma das pessoas que mais vibra com minhas conquistas. Te amo pai.

Aos meus avós, pelo amor e dedicação à família, vocês são o centro de tudo. Sei que estão orgulhosos com mais essa conquista da neta, mesmo de longe. Amo vocês incondicionalmente.

À minha irmã querida Cristine Barra Sales, por todo incentivo, pelos eternos desabafos. Por toda ajuda com o Gui. Você é muito importante. Obrigado por tudo.

À minha tia Cristina Maria Barra "Tininha", obrigado por tudo, não teria conseguido sem você. Foi você que me deu força para começar isso tudo, sempre acreditando em mim. Obrigado por todo apoio dado durante toda minha vida acadêmica, se cheguei aqui, foi com sua ajuda. Te amo!

Às primas e sobrinha, por proporcionarem momentos maravilhosos de pura descontração. Amos vocês!

Aos meus "sogros" e "sogras", por toda oração destinada a mim.

Às amigas Francine, Valéria Polese, Alessandra Camelo, pela ajuda mais divertida nas várias coletas que realizei durante esses dois anos, "Beijo no ombro".

Aos amigos Cleiton de Paula "POP Chocolate" e Paula Renata "Paulete", obrigado por tudo, sem vocês não teria conseguido. Obrigado por caminharem comigo, pelos ensinamentos passados, apoio, vocês são o máximo!

À minha querida amiga Patrícia Galvão, obrigado por me permitir fazer parte da sua vida, por escutar meus desabafos a qualquer hora, inclusive de madrugada. Além de todo o aprendizado com a pesquisa, obrigado pelo aprendizado de vida. Você foi muito importante nessa trajetória, levarei a amizade para sempre. Te amo amigaaaaa! Chorou?!

À amiga Kátia Teixeira (*in memoriam*). Obrigado pela oportunidade de conhecer uma Kátia que poucos conheciam.

Às amigas Patrícia Gitahy e Carolina Rossi, por todo apoio e carinho, o LGB não é o mesmo sem vocês.

À toda equipe do Laboratório de Genética e Bioquímica e todos, sem nenhuma exceção, sempre me apoiaram e ajudaram enormemente. Não vou citar nomes pois posso esquecer de alguém e não gostaria que isso acontecesse. Os meus sinceros agradecimentos.

Agradeço ao Geraldo Baêta, ele faz acontecer, resolve qualquer problema, uma pessoa com um "humor" diferente de todas as pessoas que já conheci.

A todos que de alguma forma, me apoiaram durante esse tempo.

BIOGRAFIA

Caroline Barra Sales Khayat da Costa, filha de Orlando José Angelice Sales e Virginia Maria Barra Sales, nasceu em 15 de abril de 1985, na cidade do Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro. Em 2004, ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), onde graduou-se em junho de 2012. Em setembro de 2013, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) desenvolvendo sua dissertação de mestrado intitulada “Monitoramento do estabelecimento das bactérias presentes no inoculante da Embrapa Agrobiologia, durante o desenvolvimento inicial de plantas de cana-de-açúcar, utilizando técnicas microbiológicas e moleculares” sob a orientação do pesquisador José Ivo Baldani e co-orientação da pesquisadora Márcia Soares Vidal.

RESUMO GERAL

Costa, Caroline Barra Sales Khayat da. **Monitoramento do estabelecimento das bactérias presentes no inoculante da Embrapa Agrobiologia, durante o desenvolvimento inicial de plantas de cana-de-açúcar utilizando técnicas microbiológicas e moleculares.** Dissertação (Mestre em Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Seropédica, RJ, 78p. 2016.

Um dos processos mais conhecidos e importantes na natureza é a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN). Este processo é realizado por algumas classes de microrganismos, denominados diazotróficos, que associados com espécies vegetais são uma alternativa importante para aprimorar a nutrição nitrogenada nos sistemas agrícolas. As populações de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico quando associadas à cultura da cana-de-açúcar melhoram a produção e, ao colonizarem o interior das raízes promovem benefícios às plantas hospedeiras. Análises quantitativas têm indicado que a seleção das combinações de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas e variedades de cana-de-açúcar podem ser melhor exploradas com o objetivo de aperfeiçoar a associação para finalidades agrícolas. Assim, o presente trabalho propõe monitorar o estabelecimento das bactérias diazotróficas presentes no inoculante para cana-de-açúcar da Embrapa, durante o desenvolvimento inicial planta. Toletes propagados da variedade RB867515 de cana-de-açúcar foram inoculados individualmente e com a mistura das cinco estirpes de bactérias diazotróficas: *Nitrospirillum amazonense* (CBAmC), *Paraburkholderia tropica* (PPe8), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal5), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (HCC103). As plantas foram crescidas em casa de vegetação e coletadas 30 dias após o plantio, sendo separado o material vegetal para avaliação do estabelecimento das estirpes pela técnica do Número Mais Provável (NMP) e quantificação absoluta por PCR em Tempo Real (qPCR). Adicionalmente foi feita a identificação das estirpes inoculadas através da análise do perfil de rDNA das películas bacterianas formadas nos respectivos meios semissólidos pela técnica de BOX-PCR. Os resultados obtidos da contagem de bactérias diazotróficas presente nas raízes por NMP mostrou que os tratamentos inoculados em relação ao controle (população nativa), apresentaram uma maior população de células bacterianas em torno de 10^5 células por massa fresca de raiz, porém não significativa. A metodologia de qPCR permitiu a quantificação do número de cópias do 16S rDNA, da ordem de 10^5 células bacterianas g^{-1} massa fresca de raiz, mostrando que houve diferença na população das espécies diazotróficas endofíticas que colonizam as raízes de cana-de-açúcar. Os perfis obtidos por BOX-PCR das películas formadas nos respectivos meios semissólidos não mostraram alta similaridade (>80%) com o perfil das espécies inoculadas para a maioria dos tratamentos inoculados. Os resultados obtidos indicam que a técnica de qPCR permitiu mostrar o estabelecimento de algumas estirpe do inoculante nos toletes de cana-de-açúcar enquanto que a técnica de NMP não mostrou diferença significativas entre os tratamentos inoculados e não inoculados possivelmente pela menor sensibilidade da metodologia.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas endofíticas; Fixação Biológica de nitrogênio; PCR em tempo real; BOX-PCR.

ABSTRACT

Costa, Caroline Barra Sales Khayat da. **Monitoring the establishment of bacteria in the inoculant of Embrapa Agrobiology, during the initial root development of sugarcane plants using microbiological and molecular techniques.** Dissertation (Master Science in Agronomy, Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Seropédica, 78p 2016.

One of the most known and important process in nature is the biological nitrogen fixation (FBN). Few classes of microorganisms perform this process; named diazotrophics that associated with plants is an important alternative to enhance nitrogen nutrition in agricultural systems. Diazotrophic bacterial population in association with sugarcane improves the yield due to its ability to colonize the inner roots of the host plant and do not provoke any pathogenicity signal. Quantitative analyzes have indicated that selection of combinations of endophytic diazotrophic strains when associated with sugarcane varieties can improve the yield and therefore varieties of sugarcane may be better exploited in order to benefit this association for agricultural purposes. Thus, this work proposes to monitor the establishment of diazotrophic bacteria present in the inoculant of Embrapa, during the initial development of sugarcane plants. Micro-propagated sets of the sugarcane variety RB867515 were inoculated individually and with a mixture of five nitrogen fixing bacteria strains that compose the sugarcane inoculant: *Nitrospirillum amazonense* (CBAmC) *Paraburkholderia tropica* (Ppe8) *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal5) *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (HCC103). Plants were grown in a greenhouse and harvested 30 days after planting. Fresh root material was separated for evaluation of the establishment of the strains by bacterial counting using the technique of Most Probable Number (MPN), absolute quantification by Real Time PCR (qPCR), besides the identification of the inoculated strains through analysis of the rDNA profile of the pellicle formed in the respective semisolid media using the BOX-PCR technique. The results of bacterial count diazotrophic present in the roots by NMP showed that the treatments inoculated in the control (native population) showed higher population of bacterial cells around 10^5 cells by fresh root mass, but not statistically significant. The methodology qPCR permitted quantitation of the number of 16S rDNA copies in the order of 10^5 bacterial cells g⁻¹ fresh weight root, showing that there were differences in the population of endophytic species that colonize the roots of sugarcane. The profiles of BOX -PCR of the respective pellicles formed in semisolid media did not show high similarity (> 80 %) with the profile of the species inoculated for most of the treatments. The results obtained indicate that the qPCR technique showed the establishment of some of the inoculated strains in sugar cane buds while the NMP technique showed no significant difference between treatments inoculated and non-inoculated possibly due to the lower sensitivity of the method.

Keywords: diazotrophic endophytic bacteria; Biological Nitrogen Fixation; Real-time PCR; BOX-PCR.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Simplificação dos principais processos envolvidos no ciclo do nitrogênio (adaptado de MOROZKINA & ZVYAGILSKAYA, 2007)	4
Figura 2. Experimento de inoculação de mini-toletes da var. RB867515 de cana-de-açúcar com a mistura das cinco estirpes de bactérias presentes no inoculante da Embrapa Agrobiologia.....	19
Figura 3. Plântula de cana-de-açúcar, inoculada com a bactéria <i>N. amazonense</i>	20
Figura 4. Meio semissólido JNFB, inoculado com amostra macerada do tecido do tratamento Mix (mini-toletes inoculados com a mistura das cinco estirpes de bactérias)	20
Figura 5. Contagem do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas em meios semissólidos semi-seletivos dos diferentes tratamentos de inoculação. (A) estirpe PAL5 no meio LGI-P; (B) estirpe Ppe8 no meio JMV; (C) estirpes HRC54 e HCC103 no meio JNFB; (D) estirpe CBAmC no meio LGI. Dados médios de 3 repetições.....	26
Figura 6. Contagem do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas nos seguintes tratamentos: (A) plantas não inoculadas; (B) Mix - mistura das cinco estirpes de bactérias. Dados médios de 3 repetições	27
Figura 7. Extração de DNA genômico, submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7%, de A: <i>H. seropedicae</i> (HRC54); B: <i>G. diazotrophicus</i> (PAL5); C: <i>H. rubrisubalbicans</i> (HCC103), D: <i>P. tropica</i> (Ppe8) e E: <i>N. amazonense</i> (CBAmC)	28
Figura 8. DNA bacteriano extraído de raízes de plantas de cana-de-açúcar coletadas 30 dias após a inoculação individual ou em mistura das 5 estirpes bacterianas presentes no inoculante da Embrapa. Coluna: 1kb (marcador molecular); colunas com os números 11-21-31-41 (tratamento sem inoculação); colunas com os números 12-22-32-42 (tratamento inoculado com Ppe8); colunas com os números 13-23-33-43 (tratamento inoculado com PAL5); colunas com os números 14-24-34-44 (tratamento inoculado com HRC54); colunas com os números 15-25-35-45 (tratamento inoculado com HCC103); colunas com os números 16-26-36-46 (tratamento inoculado com HCC103); colunas com os números 17-27-37-47 (tratamento inoculado com a mistura das cinco estirpes de bactérias)	29
Figura 9. Perfil eletroforético do produto de amplificação dos iniciadores espécie específicos para as estirpes bacterianas. Coluna 1kb - marcador molecular; coluna a: Controle negativo (H ₂ O livre de DNase e RNase); colunas com os números 11-21-31-41 (tratamento sem inoculação); Figura A:	

P. tropica (Bt2Ppe8f1/Bt2Ppe8f2), colunas com os números 12-22-32-42 (tratamento inoculado com Ppe8); Figura B: *G. diazotrophicus* (GdPAL5f/GdPAL5r), colunas com os números 13-23-33-43 (tratamento inoculado com PAL5); Figura C: *H. seropedicae* (Hs3HRC54f/Hs3HRC54r), colunas com os números 14-24-34-44 (tratamento inoculado com HRC54); Figura D: *H. rubrisubalbicans* (Hr1HCC103r1/Hr1HCC103f1), colunas com os números 15-25-35-45 (tratamento inoculado com HCC103); Figura E: *N. amazonense* (AaCBAmCF/AaCBAmCR), colunas com os números 16-26-36-46 (tratamento inoculado com CBAmC); colunas com os números 17-27-37-47 (tratamento inoculado com a mistura das 5 estirpes bacterianas), em gel de agarose 2%..... 30

Figura 10. Curva Padrão do número de cópias do iniciador 16S rDNA versus médias de Ct para cada uma das estirpes do inoculante. Foram utilizadas 3 repetições para cada uma das diluições 31

Figura 11. Log₁₀ do número de cópias 16S rDNA de bactérias diazotróficas endofíticas, dos tratamentos inoculados comparado com o tratamento não inoculado e o tratamento Mix, obtidas por qPCR aos 30DAI. (A) *H. rubrisubalbicans*; (B) *N. amazonense*; (C) *P. tropica*; (D) *H. seropedicae*; (E) *G. diazotrophicus*. Quantificação por reação de qPCR (Teste de Tukey (p<5% - Tratamento com letras iguais, não difere estatisticamente entre si) 33

Figura 12. Log₁₀ do número de cópias 16S de bactérias diazotróficas endofíticas, do tratamento não inoculado e o tratamento Mix, obtidas por qPCR aos 30DAI. Quantificação por reação de qPCR. Teste de Tukey (p<5% - Tratamento com letras iguais, não difere estatisticamente entre si) 34

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose (2%) do produto de amplificação do DNA genômico por BOX-PCR das películas crescidas nos diferentes meios semissólidos a partir da inoculação com macerado de raízes dos diferentes tratamentos. A: controle negativo (H₂O livre de DNase e RNase); B: estirpe HRC54; C: Estirpe Ppe8; D: Estirpe PAL5; E: Estirpe HC103; F: Estirpe CBAmC. As colunas de 1 a 52 estão descritas no anexo..... 35

Figura 14. Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de BOX-PCR com o programa Bio-numerics 7.6, seguido do gel de agarose em posição horizontal. Foi analisada a similaridade pelo Coeficiente de Dice. Marcadores contendo as cinco bactérias utilizadas no inoculante e utilizadas como padrão: Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *N. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*. JNFB, LGI, LGI-P e JMV foram os meios de cultura utilizados para coletar as películas. Os números 11-21-31-41 (tratamento sem inoculação); 12-22-32-42 (tratamento inoculado com Ppe8); 13-23-33-43 (tratamento inoculado com PAL5); 14-24-34-44 (tratamento inoculado com HRC54); 15-25-35-45 (tratamento inoculado com HCC103); 16-26-36-46 (tratamento inoculado com CBAmC) 17-27-37-47 (tratamento inoculado com a mistura das cinco estirpes de bactérias) 36

Figura 15. Análise de similaridade com índice de Dice e agrupamento por

UPGMA dos tratamentos não inoculados (11, 21, 31, 41) e inoculados com a estirpe PAL5 (13, 23, 33, 43), em meio de cultivo LGI-P.....	37
Figura 16. Análise de similaridade com índice de Dice e agrupamento por UPGMA dos tratamentos não inoculados (11, 21, 31, 41) e inoculados com a estirpe CBAmC (16, 26, 36, 46), em meio de cultivo LGI.....	37
Figura 17. Análise de similaridade com índice de Dice e agrupamento por UPGMA dos tratamentos não inoculados (11, 21, 31, 41) e inoculados com as estirpes HRC54 (14, 24, 34, 44) e HCC103 (15, 25, 35, 45), em meio de cultivo JNFB.....	38
Figura 18. Análise de similaridade com índice de Dice e agrupamento por UPGMA dos tratamentos não inoculados (11, 21, 31, 41) e inoculados com a estirpe Ppe8 (12, 22, 32, 42), em meio de cultivo JMV.....	39
Figura 19. Análise de similaridade com índice de Dice e agrupamento por UPGMA dos tratamentos não inoculados (11, 21, 31, 41) e inoculados com as estirpes (CBAmC, HCC104, HC54, PAL5 e Ppe8), nos meios de cultivo JNFB, JMV, LGI, LGI-P.....	39
Figura 20. Comparação das técnicas NMP e qPCR, dos tratamentos não inoculados com os inoculados e Mix. (A) <i>H. rubrisubalbican</i> e <i>H. seropedicae</i> ; (B) <i>G. diaztroophicus</i> .; (C) <i>N. amazonense</i> ; (D) <i>P. tropica</i>	40

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Iniciadores espécie-específicos para quantificar bactérias diazotróficas endofíticas constituintes no inoculante para cana-de-açúcar. Gd - <i>G. diazotrophicus</i> , Aa - <i>A. amazonense</i> , Bt - <i>B. tropica</i> , Hs - <i>H. seropedicae</i> e Hr - <i>H. rubrisubalbicans</i>	22

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Estirpes bacterianas e meios de cultura semi-seletivos empregados neste estudo	18
Tabela 2. Legenda das colunas da Figura 13.....	60

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE QUADROS	XIII
LISTAS DE TABELAS	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O nitrogênio na cultura de cana de açúcar	3
2.2 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)	4
2.3 Bactérias endofíticas e efeitos promotores de crescimento	5
2.4 Produção de fitormônios	6
2.5 Bactérias que compõem o inoculante da Embrapa Agrobiologia	7
2.6 Número Mais Provável - NMP	13
2.7 Utilização da técnica de PCR em Tempo Real	14
2.8 BOX-PCR	16
3. OBJETIVO GERAL	17
3.1 Objetivo específico	17
3.2 Hipótese	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Obtenção de material vegetal	18
4.2 Cultivo das estirpes bacterianas	18
4.3 Inoculação de mini-toletes de cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas	18
4.4 Coleta	19
4.5 Análises microbiológicas	20
4.5.1 Contagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas	20
4.6 Análises moleculares	21
4.6.1 Extração de DNA das estirpes isoladas	21
4.6.2 Determinação da curva padrão para qPCR	22
4.6.3 Análise de qPCR	23
4.7 BOX-PCR.....	24

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Contagem do número de células das estirpes inoculadas pela técnica do Número Mais Provável (NMP)	25
5.2 PCR em tempo real	28
5.2.1 Curva Padrão	31
5.2.2 Quantificação do número de cópias do gene 16S de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar por PCR	32
5.3 Análise de BOX-PCR	34
6. CONCLUSÃO	41
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
9. ANEXO	60

1. INTRODUÇÃO

Um dos processos mais conhecidos e importantes na natureza é a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), que é realizada somente por algumas classes de microrganismos, denominados diazotróficos (BALDANI et al., 2009). Esses microrganismos fixadores de nitrogênio quando em associação com espécies vegetais é uma alternativa importante para aprimorar a nutrição nitrogenada nos sistemas agrícolas, uma vez que a demanda por adubos nitrogenados apresenta custo de produção elevado em sistemas agrícolas. Quando essa associação é eficiente, essa opção é mais econômica e ecológica para suprir as necessidades de nitrogênio das plantas (BALDANI et al., 1997). Têm-se estudado diversas bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N₂) associadas a plantas da família *Poaceae* e esses experimentos têm demonstrado que ocorrem contribuições bastante significativas dessa fixação biológica de nitrogênio nestas culturas (BODDEY et al., 2003; FREITAS, 2009; OLIVEIRA, 2012). No Brasil, plantas de cana-de-açúcar provenientes de experimentos de campo quando avaliadas pelo balanço total de nitrogênio e enriquecimento de ¹⁵N demonstram que entre 40 e 60% de todo o nitrogênio na planta, aproximadamente 150 kg de nitrogênio por hectare ao ano, são provenientes do processo de fixação biológica (BODDEY et al., 1995).

As bactérias diazotróficas endofíticas apresentam baixa sobrevivência no solo e, por isso, são encontradas colonizando principalmente o interior das raízes e outros órgãos de plantas. Estudos mostram que as populações de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico quando associadas à cultura de cana-de-açúcar melhoram a produção e, ao colonizar o interior das raízes destas plantas promovem benefícios às plantas hospedeiras (HARDOIM et al., 2008; BALDANI et al., 2009; BERG et al., 2009; COMPANT et al., 2010).

O desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar pode ser estimulado pela associação com diversas bactérias diazotróficas. Quando essas bactérias colonizam o interior da planta hospedeira são denominadas bactérias endofíticas e, quando se associam com os tecidos externos são denominadas epifíticas. Essas bactérias benéficas, endofíticas e epifíticas, podem ser encontradas habitando diversos nichos associados aos vegetais, onde os mais comuns são a rizosfera, rizoplano, raízes, caules e folhas (HALLMANN et al., 1997; HARDOIM et al., 2008; COMPANT et al., 2010).

Em estudo conduzido com a variedade comercial SP70-1143 de cana-de-açúcar cultivada por 400 dias, após a inoculação de plantas micropropagadas com estirpes isoladas e em diferentes combinações com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Nitrospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Paraburkholderia tropica* foi demonstrado que as plantas se desenvolveram melhor com a inoculação conjunta em relação à inoculação das estirpes isoladas, contribuindo com cerca de 30% de nitrogênio total da planta (OLIVEIRA et al., 2002). Outro estudo sobre a inoculação conjunta das mesmas bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar cultivadas no campo revelou, que além de promover o crescimento das plantas, há interações positivas e negativas entre as bactérias, entre as bactérias e a planta, além das interações entre a planta, as bactérias e o ambiente (OLIVEIRA et al., 2006). Estudos de inoculação conjunta com as mesmas bactérias aumentou a produtividade de caules na variedade RB72454 de maneira similar à adubação com 120 kg ha⁻¹ de nitrogênio, nas colheitas de cana-planta e primeira soqueira; no entanto, não houve modificação na contribuição da FBN advinda da inoculação, dando evidências de que os benefícios do inoculante para a cana-de-açúcar podem ser provenientes do efeito da promoção de crescimento de plantas (SCHULTZ et al., 2014).

Esse inoculante, para a cultura de cana-de-açúcar, contendo essas cinco espécies bacterianas citadas acima foi desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia (REIS et al., 2009), em veículo turfoso, e está sendo aplicado e avaliado em experimentos de campo em diversas

regiões do Brasil (SCHULTZ et al., 2012). A literatura indica que esses estudos devem ser aprofundados e mais bem explorados com o objetivo de aperfeiçoar o sistema de benefícios das combinações de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas e variedades de cana-de-açúcar para fins agrícolas (CARVALHO et al., 2011; SCHULTZ et al., 2014).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O Nitrogênio na Cultura da Cana-de-açúcar

O Brasil não é apenas o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), com cerca de nove milhões de hectares de área cultivada e produção de cerca de 73 Mg ha⁻¹ (CONAB, 2016), é também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol, conquistando cada vez mais o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética. (BRASIL, 2014a).

A cultura da cana-de-açúcar brasileira apresenta baixa resposta à aplicação de nitrogênio mineral (AZEREDO et al., 1986), em parte, devido ao melhoramento das variedades brasileiras ter sido direcionado para a obtenção de produtividades medianas em solos de baixa fertilidade. Este fato levou à seleção indireta de genótipos com maior capacidade de associação com microrganismos que possam contribuir para o crescimento vegetal, como a fixação biológica de nitrogênio (DÖBEREINER, 1995). Alguns autores demonstraram a existência de diferentes modos de interação entre microrganismos e plantas (interações patogênicas, neutras ou benéficas), inclusive para a cana-de-açúcar (HUREK et al., 1998; MUTHUKUMARASAMY et al., 1999; REIS et al., 1999; OLIVEIRA et al. 2002).

Existem algumas técnicas disponíveis para a quantificação da contribuição real da fixação biológica de nitrogênio na nutrição nitrogenada da cultura de cana-de-açúcar, como por exemplo, a estimativa da fixação de N₂ pela análise do nitrogênio total, estimativa da amônia, utilização de câmara e tanques de crescimento em casa de vegetação para incorporação de ¹⁵N, entre outros. Trabalhos que utilizam a técnica de diluição isotópica de ¹⁵N para o estudo da nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar demonstraram a ocorrência da incorporação de nitrogênio atmosférico fixado por bactérias diazotróficas (LIMA et al., 1987; SAMPAIO et al., 1988; TRIVELIN et al., 1995). Outros estudos demonstraram a influência do genótipo vegetal (e possivelmente dos genótipos bacterianos) na colonização da planta (BALDANI, 1984; RAMOS et al., 2010), e na provável contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cana-de-açúcar.

O nitrogênio é um elemento fundamental para vida, representando aproximadamente 78% da atmosfera terrestre, na forma de gás dinitrogênio (N₂), e faz parte da constituição de ácidos nucléicos e proteínas, entre outras moléculas orgânicas (YOUNG, 1992; HOWARD & REES, 1996). Este elemento pode estar incorporado a compostos, em diferentes graus de oxidação, onde suas interconversões definem o ciclo biogeoquímico do elemento (Figura 1). O nitrogênio inorgânico, durante a fixação do nitrogênio, é convertido para uma forma biologicamente útil e sua assimilação prevê a incorporação deste em cadeias carbônicas de diferentes compostos orgânicos. Processos de nitrificação (oxidação de amônio para nitrato) e desnitrificação (redução do nitrato a nitrito e óxidos de nitrogênio) estão envolvidos na remoção do nitrogênio para a atmosfera (MOROZKINA & ZVYAGILSKAYA, 2007).

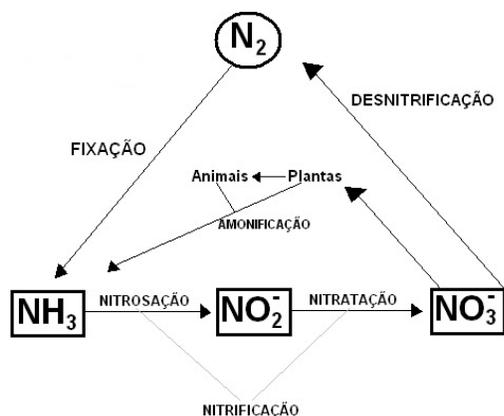


Figura 1. Simplificação dos principais processos envolvidos no ciclo do nitrogênio (adaptado de MOROZKINA & ZVYAGILSKAYA, 2007).

O amônio é a fonte primária de nitrogênio para a maioria das vias metabólicas, sendo convertido em glutamina e glutamato, que por sua vez, são precursores de outros compostos nitrogenados (MERRICK & EDWARDS, 1995). A fixação biológica do nitrogênio é feita pela redução do gás N_2 a amônio (NH_4^+). A maioria dos procariotos podem utilizar vários tipos de fontes de nitrogênio e a escolha desta fonte se relaciona à subsequente assimilação do mesmo, bem como a disponibilidade ambiental dessas fontes. As fontes primárias são preferencialmente utilizadas para regular a assimilação deste elemento, mas existem também outras fontes alternativas de nitrogênio que podem ser aproveitadas na ausência das fontes primárias (BOTHE et al., 2007).

O nitrogênio tem papel fundamental entre os nutrientes exigidos pela cultura e aplicados via adubação, pois participa direta e indiretamente de vários processos bioquímicos, fazendo parte de todos os aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (MALAVOLTA et al., 1997), sendo considerado um fator limitante para o crescimento das plantas (FRANCO & DÖBEREINER, 1994) e, por consequência, a produtividade é frequentemente limitada pela disponibilidade deste elemento no solo.

2.2. Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

A promoção do crescimento vegetal ocorre tanto pela transferência de moléculas sintetizadas pela bactéria para a planta, ou pelo aumento na absorção, ou aumento da disponibilidade de certos elementos nutricionais. O mecanismo mais estudado de promoção do crescimento vegetal por bactérias endofíticas compreende a fixação biológica de nitrogênio (FBN), e a transferência e/ou disponibilização deste nitrogênio assimilado para o metabolismo vegetal. Este processo fornece compostos nitrogenados diretamente para as plantas por meio de associações, ou quando os organismos morrem e os liberam no ambiente, fornecendo o nitrogênio para o desenvolvimento vegetal (LINDERMANN & GLOVER, 2003). A contribuição de bactérias endofíticas para a nutrição de plantas leguminosas através da FBN é bastante conhecida. Nestas associações, bactérias Gram-negativas conhecidas como rizóbios (*Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*), colonizam tecidos endofiticamente (raízes e por vezes o caule) como simbioses, e promovem o desenvolvimento de estruturas de simbiose altamente especializadas denominadas de nódulos. Estas estruturas são formadas por interferência de sinais moleculares trocados entre a planta hospedeira e a bactéria (VANRHIJN & VANDERLEYDEN, 1995; LINDERMANN & GLOVER, 2003, COSTA et al., 2014).

Estudos sobre o balanço de nitrogênio, a incorporação de ^{15}N por diluição isotópica ou abundância natural fornecem evidências da ocorrência da FBN em plantas não leguminosas, especialmente em gramíneas, tanto sob condições controladas como em condições de campo (OLIVEIRA, 2003; BALDANI et al., 2009). As informações sobre os mecanismos e os modos de transferência de nitrogênio, e sobre as bases fisiológicas das associações entre bactérias diazotróficas e plantas não leguminosas são bastante variáveis e dependentes de interações específicas entre os genótipos bacteriano e vegetal (JAMES, 2000; BALDANI et al., 1997; BALDANI et al., 2009).

2.3. Bactérias Endofíticas e Efeitos Promotores de Crescimento

As bactérias endofíticas podem interferir no crescimento das plantas por mecanismos diretos ou indiretos. Os mecanismos de ação direta das bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) incluem, por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio, síntese de sideróforos, produção de fitormônios, solubilização de fósforo e aceleração dos processos de mineralização. Os mecanismos de ação indireta incluem a indução de resistência sistêmica nos vegetais, diminuição de fatores de estresse como o etileno endógeno, produção de antibióticos e antagonismo a fitopatógenos, entre outros fatores. Muitas BPCV, em particular bactérias de vida livre associadas à rizosfera e endofíticas, possuem a capacidade de atuar em diversos destes mecanismos e podem utilizar diferentes modos de ação durante o ciclo do vegetal. O impacto destas bactérias no crescimento da planta irá depender das propriedades físico-químico-biológicas do solo onde esta espécie se desenvolve (OLIVEIRA, 2003).

Várias famílias vegetais apresentam comunidades endofíticas que produzem algum efeito promotor de crescimento. Em batata, por exemplo, cerca de 10% do total de bactérias endofíticas isoladas apresentavam algum efeito promotor de crescimento, incluindo efeitos significativos no número e comprimento de raízes, massa seca de raízes, comprimento do caule, formação de pelo foliar, emergência de raízes secundárias e conteúdo total de lignina (HALLMANN et al., 1997). A associação de microrganismos diazotróficos nem sempre ocorreu, porém houve aumento na absorção de minerais e melhoria na eficiência de utilização da água. Existe inclusive estudos realizados com bactérias diazotróficas, incapazes de fixar o nitrogênio atmosférico através de mutação específica, onde se observaram efeitos promotores de crescimento (HUREK et al., 1994; SEVILLA et al., 1998).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal colonizam nichos ecológicos, que também podem ser ocupados por espécies fitopatogênicas, em especial os patógenos de tecidos vasculares exercendo uma forma eficiente de proteção de plantas provenientes da micropropagação, assim como na formação de mudas sadias para comercialização. Algumas espécies bacterianas que colonizam a rizosfera, e também podem desenvolver eventualmente uma colonização endofítica, podem ser caracterizadas como outros agentes de controle biológico. (TSIMILI-MICHAEL et al., 2000; VAZQUEZ et al., 2000; OLIVEIRA, 2003).

Além da atuação direta do metabolismo de bactérias endofíticas sobre a atividade de organismos patogênicos, a ocorrência de colonização endofítica por BPCV pode induzir respostas sistêmicas de resistência nas plantas, chamadas SAR (do inglês *Systemic Acquired Resistance*). Este fenômeno ocorre após a exposição da planta a um agente indutor (ativador químico, extratos de células de microrganismos mortos ou vivos), ativando os seus mecanismos de defesa não apenas no sítio de indução, como também em outros tecidos dele distantes, de forma mais ou menos generalizada (STICHER et al., 1997). No caso de células de microrganismos vivos, quase sempre são classificados como (rizo) bactérias promotoras do crescimento (KLOEPPER, 1996; KLOEPPER et al., 1997). A esse respeito, existem casos comprovados em que a inoculação com BPCV na rizosfera torna a parte aérea mais resistente

a patógenos (KLOPPER, 1996; WEI et al., 1996). Pesquisas têm mostrado, muito embora ainda não consigam explicar com clareza, que certas BPCV parecem atuar como agentes indutores de resistência sistêmica, no sentido em que a planta fica protegida contra mais de um patógeno, ao contrário do controle biológico clássico que programa o controle de forma mais específica (WEI et al., 1996). Os mecanismos envolvidos no desencadeamento da resposta já possuem alguma clareza, embora ainda não se saiba como as BPCV permanecem associadas aos vegetais após terem elicitado uma resposta sistêmica de defesa da planta. A resposta hipersensível desencadeada por bactérias inicia-se pela percepção dos elicitores bacterianos (peptídeos de baixa massa molecular), na superfície ou no interior da célula vegetal. A célula vegetal possui receptores na membrana da plasmalema, que interagem com as moléculas elicitoras, desencadeando a resposta hipersensível que por sua vez inicia a resistência sistêmica (HE, 1996). As moléculas elicitoras podem ser o ácido salicílico, peptídeos (sisteminas), ácido jasmônico e metil-jasmonatos e o etileno (ENYEDI et al., 1992).

2.4. Produção de Fitormônios

A produção de reguladores de crescimento ativos como fitormônios faz parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais e podem ser considerados agentes que causam alteração do crescimento e desenvolvimento vegetal (BASHAN & HOLGUIM, 1997). As bactérias diazotróficas endofíticas podem desempenhar uma função importante na reabilitação e na sustentabilidade dos ecossistemas, por meio da fixação biológica, produzindo substâncias reguladoras do crescimento vegetal, como auxinas, giberelinas e citocininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e utilização de água pelas plantas (BAZZICALUPO & OKUN, 2000).

O resultado da interação entre a planta e a bactéria vai depender da concentração de fitormônio disponível às células vegetais. A interação entre fitormônios microbianos e as plantas pode se dar por meio da transferência de genes bacterianos responsáveis pela síntese de auxinas para a planta (*Agrobacterium tumefaciens*), liberação de auxinas no interior da planta (bactérias endofíticas) ou produção de auxinas na filosfera ou na rizosfera (*Pseudomonas spp*). Entre os efeitos de estímulo de crescimento vegetal, ocorrem estímulos ao desenvolvimento de raízes laterais e alongamento das raízes primárias (OLIVEIRA, 2003). De certa forma a promoção do crescimento vegetal está associada ao nível populacional da espécie microbiana associada, que irá refletir na quantidade de fitormônio disponível à planta, afetando a promoção ou a inibição do crescimento das raízes, ficando sujeito a várias etapas de regulação (PATTEN & GLICK, 1996).

Os mecanismos genéticos de regulação da biossíntese de auxinas por bactérias como *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* estão correlacionados a funções que influenciam a fisiologia e o desenvolvimento da planta hospedeira.

A produção endógena de etileno é uma das respostas dos vegetais a diferentes formas de estresse, inclusive infecções fitopatogênicas. A percepção destas moléculas pelas células vegetais promove o desencadeamento de diversos e diferentes processos de resposta a estresse, que podem levar à senescência das células próximas ao sítio de produção de etileno. O etileno é uma molécula caracterizada como mensageira secundária, e estimula a senescência, abscisão de frutos ou de folhas, desenvolvimento de doenças, inibição do crescimento, síntese de enzimas (quitinase) e antibióticos. Grande parte dos danos produzidos por interações fitopatogênicas está relacionada à resposta da planta a níveis elevados de etileno endógeno. Algumas bactérias promotoras de crescimento vegetal, como *Pseudomonas putida* possuem a capacidade de síntese da enzima ACC deaminase (1-aminociclopropano-1-

carboxilato), que podem atuar na modulação dos níveis endógenos de etileno vegetal (GLICK & BASHAN, 1997; MAYAK et al., 1999; GLICK, 2014).

Várias publicações sobre a produção de giberelinas por bactérias diazotróficas têm surgido. São conhecidas mais de 89 giberelinas (GA - ácido giberélico) e enumeradas de GA1 até GA89, e a mais ativa em plantas é a GA1, que é responsável pelo alongamento do caule. Muitas observações sugerem que a indução ou promoção do crescimento de plantas podem estar relacionadas à associação destas com microrganismos (LUVIZOTTO, 2008).

O ácido abscísico (ABA) também está envolvido na resposta vegetal a estresses bióticos e abióticos. Como hormônio, ele induz o fechamento estomático, inibe a germinação de sementes e amadurecimento de frutos, e está envolvido na dormência de embriões. Serve também para mediar respostas de proteção em relação às condições ambientais adversas (seca, estresse salino e toxicidade de metais, por exemplo). (ADDICOTT & LYON, 1969). O ABA pode ser sintetizado em todas as partes da planta e pode ser translocado rapidamente através dela (TAYLOR et al., 2005). Em espécies como *Azospirillum brasilense* e algumas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, observou-se a produção de ABA em meio de cultura, porém a via biossintética ainda não foi determinada (BOIERO et al., 2007; COHEN et al., 2008). Além disso, sob condições de estresse, o ABA produzido por bactérias pode atenuar o estresse vegetal (BOIERO et al., 2007).

2.5. Bactérias que Compõem o Inoculante para Cana-de-açúcar da Embrapa Agrobiologia

Inoculante é o material que contém microrganismos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas. É composto por um suporte, material excipiente e esterilizado, livre de contaminantes segundo os limites estabelecidos, que acompanha os microrganismos e tem a função de suportar ou nutrir, ou ambas as funções, o crescimento e a sobrevivência destes microrganismos, facilitando a sua aplicação, e deve ser puro, com ausência de qualquer tipo de microrganismos que não sejam os especificados (BRASIL, 2014b). A utilização de inoculantes tem mais de um século com o surgimento da indústria de inoculantes para leguminosas em 1895, e no Brasil a produção de inoculante em nível industrial iniciou-se na década de 1950, sendo a turfa utilizada como veículo inoculante, em sua grande maioria (SILVA, 2009).

Os pesquisadores da Embrapa Agrobiologia selecionaram estirpes de cinco estirpes diazotróficas: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5 - BR11281), *Nitrospirillum amazonense* (CBAmC - BR11145), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54 - BR11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (HCC103 - BR11504) e *Paraburkholderia tropica* (Ppe8 - BR11366) (REIS et al., 2009). Estas cinco linhagens foram previamente isoladas da própria cana-de-açúcar, testadas e selecionadas em estudos de inoculação (OLIVEIRA, 2003; OLIVEIRA et al., 2006). Para a preparação do inoculante as estirpes crescem individualmente, em meio de cultura e posteriormente são misturadas com turfa estéril. O inoculante obtido promove o crescimento vegetal sem a necessidade de aplicação completa de adubos nitrogenados, pois as bactérias fixam nitrogênio do ar e disponibilizam esse nutriente para as plantas. Com isso, ocorre uma redução nos custos de produção e o maior impacto ocorre em lavouras de cana-planta, onde é possível deixar de aplicar 30 quilos de nitrogênio por hectare/ano, sem perda de produtividade, gerando uma economia de cerca de 50 mil toneladas de fertilizantes nitrogenados, por ano, com grandes benefícios para o meio ambiente (BODDEY et al., 1995).

A seguir são apresentadas as características genotípicas e fenotípicas de cada espécie assim como relatos de avanço de conhecimento desenvolvidos com as respectivas espécies:

Nitrospirillum amazonense

Estudos com a sequência 16S rRNA classificam o gênero *Azospirillum* como pertencente à classe *Alphaproteobacteria*, ordem *Rhodospirillales*, família *Acetobacteriaceae*. Em estudos taxonômicos mais recentes (LIN et al., 2014), baseados nas características filogenéticas, fisiológicas, quimiotaxonômicas e fenotípicas, a estirpe foi incluída em novo gênero da família *Rhodospirillaceae* e reclassificada como *Nitrospirillum amazonense* (OREN & GARRITY, 2014). Possuem células com características móveis e vibróides em meio de cultura específico (LGI), exibindo aumento na produção de polihidroxibutirato (PHB) sob condições de estresse, como exposição a metais tóxicos e estresse hídrico. Grânulos de PHB são observados sob condições de crescimento na presença de N_2 , em condições de FBN, e em menor quantidade na presença de nitrogênio disponível na forma de NH_4^+ . A atividade da nitrogenase é mais sensível em *Azospirillum amazonense* que em outras espécies, e seu tempo de geração a baixas concentrações de O_2 é maior (GARRITY, 2005). Estudos ecológicos sobre a população de *Azospirillum amazonense* em plantas de arroz, sorgo e milho mostram uma alta heterogeneidade de estirpes; a planta hospedeira tem efeito altamente significativo na estrutura genética da espécie quando proveniente de isolados endofíticos, ocorrendo o mesmo em relação ao tipo de solo para isolados rizosféricos (AZEVEDO et al., 2005).

Na última década, foi relatado que o óxido nítrico (NO) desempenha um papel central na formação de raízes laterais (CORREA-ARAGUNDE et al., 2004) e desenvolvimento de pelos radiculares (LOMBARDO et al., 2006). *Azospirillum* pode produzir óxido nítrico em condições de baixa concentração de O_2 , por desnitrificação (HARTMANN & ZIMMER, 1994). A estimulação do desenvolvimento das raízes, a capacidade de óxido nítrico atuar como um regulador não convencional de crescimento da planta (BELIGNI & LAMATTINA, 2001), a produção de raízes laterais e pelos radiculares, levaram à investigação sobre a capacidade de *Nitrospirillum* de promover o crescimento da raiz e alterar sua arquitetura básica devido à produção de NO (BARASSI et al., 2007).

O caráter endofítico do gênero foi testado avaliando-se seis estirpes de *Azospirillum*, entre elas *A. amazonense*, em sete diferentes tratamentos de inoculação próprios de ensaios com patógenos de plantas. As bactérias foram aplicadas experimentalmente em folhas e raízes de tomate, pimenta, trigo e algodão e nenhuma delas demonstrou qualquer sintoma de patogenicidade, sendo todas capazes de colonizar as raízes das plantas (BASHAN, 1998).

Em ensaios de inoculação conjunta em plântulas micropropagadas de cana, utilizando a técnica de imunofluorescência *in situ* foi observado *Azospirillum amazonense* aderido à superfície das raízes e em regiões anteriormente relatadas, como a região de emergência de raízes laterais, o ápice radicular e espaços intercelulares na rizoderme (OLIVEIRA et al., 2009).

Bactérias do gênero *Azospirillum* têm sido encontradas associadas com grande número de espécies de cereais e gramíneas forrageiras, tanto em clima tropical como em temperado, porém não são todas as espécies que têm sido encontradas colonizando plantas em diferentes localidades (REIS JUNIOR et al., 2004; BALDANI et al., 2009). *Azospirillum amazonense* foi detectado em amostras de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Havaí, Tailândia e Argentina, além de isolados brasileiros (DÖBEREINER, 1992; MONZÓN DE ASCONEGUI & SIROLLITV, 1985). Esta bactéria tem sido pouco estudada quando comparada com outras espécies do gênero devido à sua baixa distribuição geográfica. *Azospirillum* apresenta alta incidência quando associada a gramíneas forrageiras (BALDANI, 1984; MAGALHÃES & DÖBEREINER, 1984), além de ser encontrada associada a diversas espécies de monocotiledôneas, incluindo *Orchidaceae*, podendo ser isolada de dicotiledôneas herbáceas, arbustivas e arbóreas (LANGE & MOREIRA, 2002) e, quando comparada a *A. brasilense* e *A. lipoferum*, difere destas, pois exibe capacidade de assimilar sacarose em condições de FBN

(FALK et al., 1985), o que pode ser indicativo de sua adaptação endofítica. Exibe sensibilidade relativa ao pH alcalino (GARRITY, 2005), demonstrando *in vitro* melhor adaptação ao pH ácido que *Azospirillum brasilense* ou *Azospirillum lipoferum* (MAGALHÃES et al., 1983). *Azospirillum amazonense* está apto a fixar nitrogênio mesmo quando está disponível no ambiente (HARTMANN et al., 1986), o que é interessante, pois não há restrições com a inoculação desta bactéria em áreas nas quais tenha sido aplicada adubação nitrogenada anteriormente.

Os fitormônios, principalmente o ácido indolacético excretado por bactérias deste gênero, desempenham papel importante na promoção de crescimento vegetal (BASHAN & HOLGUIN, 1997). Na associação *A. amazonense* x *Brachiaria*, foi detectado, além da atividade de FBN, taxas significativas de produção de auxina, demonstrando a habilidade de promoção de crescimento desta espécie (REIS JUNIOR et al., 2004). Quarenta e dois isolados de *Azospirillum amazonense*, confirmados através de hibridização *in situ*, foram avaliados em sua produção de hormônios, como a auxina e a atividade da enzima nitrogenase *in vitro*, seguido de ensaios sobre os efeitos da inoculação destes isolados em plantas de arroz em casa de vegetação. Todas as estirpes testadas produziam hormônios auxínicos, tendo 10% delas exibido taxas elevadas de produção (cerca de $1,33 \mu\text{M mg}^{-1} \text{ proteína}^{-1}$). A atividade da nitrogenase apresentou variações, 9% dos isolados exibiram alta atividade, enquanto 54% deles demonstraram um potencial relativamente baixo (RODRIGUES et al., 2008).

Paraburkholderia tropica

Bactérias do gênero *Burkholderia* são pertencentes à classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales* e família *Burkholderiaceae*, que inclui bactérias tanto facultativas quanto estritamente aeróbicas. São encontradas nos mais variados habitats, e basicamente metade das espécies é patogênica para plantas ou animais. Em estudos mais recentes (SAWANA et al., 2014) foi sugerida uma nova classificação do gênero baseado em análises genômicas, filogenéticas e comparativas, de 45 espécies sequenciadas, com base na sequência de proteínas conservadas da região 16S RNAr para distinguir com segurança os diferentes grupos de espécies de *Burkholderia*. Espécies do gênero foram agrupados em dois grupos principais, o primeiro que contém as espécies fitopatogênicas mantendo o gênero *Burkholderia* e o segundo grupo com as bactérias não-fitopatogênicas com a denominação de gênero *Paraburkholderia*. A estirpe Ppe8 anteriormente classificada como *Burkholderia tropica*, passa a ser classificada como *Paraburkholderia tropica* publicada na lista 164 de validação da revista IJSEM (OREN & GARRITY, 2015).

O gênero *Burkholderia* é formado por bactérias móveis e gram-negativas, que acumulam PHB como reserva de carbono (GARRITY, 2005). Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* são comuns e abundantes em várias espécies de plantas e o conhecimento de sua ecologia é importante para melhor exploração desta associação (PERIN et al., 2006). Presentes em abundância no ambiente, sua plasticidade genômica e sua capacidade de adaptação as tornam aptas a colonizar diversos nichos ambientais, sendo encontradas em associação com ampla gama de hospedeiros, colonizando tecidos internos e superfícies (COMPANT et al., 2008).

As primeiras bactérias do gênero *Burkholderia* capazes de fixar nitrogênio atmosférico, foram isoladas a partir de plantas de arroz em solo vietnamita (GILLIS et al., 1995), tendo sido isoladas no Brasil na rizosfera de banana e abacaxi (WEBER et al., 1999), bem como em folhas desinfestadas de cana-de-açúcar (PERIN et al., 2006) e plantas de milho (CABALLERO-MELLADO et al., 2004).

Além da recorrente associação de *Burkholderia* com os tecidos vegetativos das plantas, isolou-se *B. tropica* a partir do caule e dos frutos de abacaxizeiros no Brasil (CRUZ et al., 2001), além de outras espécies do gênero em raízes, caule, sementes, frutos e polpa de café (VEGA et al., 2005) e em nódulos de leguminosas (COMPANT et al., 2008). Além de habitats endofíticos que ocupam, as bactérias deste gênero colonizam, além das plantas e do solo rizosférico, as hifas e esporos de fungos micorrízicos (COMPANT et al., 2008), o que demonstra o caráter cosmopolita do gênero.

As propriedades benéficas das bactérias do gênero *Burkholderia spp.* indicam sua utilidade potencial como substitutos ou complementares aos agentes químicos aplicados no manejo de enfermidades das plantas (COMPANT et al., 2008). Bactérias deste gênero demonstraram aptidão para biorremediação, sendo capazes de degradar compostos xenobióticos e herbicidas, além de atuarem no controle biológico de inúmeros fungos (PERIN et al., 2006). A capacidade de FBN por *Burkholderia tropica* foi reconfirmada através da avaliação da estrutura gênica e técnica de cultivo em atmosfera controlada rica em $^{15}\text{N}_2$ de várias estirpes pertencentes a sete diferentes espécies endofíticas do gênero, ocasião em que todas tiveram seus genes *nifH* avaliados e foram capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (MARTÍNEZ-AGUILAR et al., 2008).

Além da atividade de fixação biológica de nitrogênio, a rizosfera das plantas hospedeiras de *Burkholderia tropica* são beneficiadas por outras atividades da bactéria, como por exemplo, a alta capacidade de dissolução de fosfatos, detectada em isolados de *P. tropica* obtidos da rizosfera e rizoplane de plantas de tomate no México, e também de elevada produção de sideróforos, indicando que este gênero pode desenvolver grande atividade de biocontrole de patógenos (CABALLERO-MELLADO et al., 2007).

Gluconacetobacter diazotrophicus

Pertencente à classe *Alphaproteobacteria*, ordem *Rhodospirillales* e família *Acetobacteraceae*, o gênero *Gluconacetobacter* é formado por bactérias Gram-negativas, obrigatoriamente aeróbias e não fermentativas, com temperatura de crescimento ideal de 30°C (GARRITY, 2005). A maioria dos representantes deste grupo, também conhecido como diazotróficos, estão geralmente associadas com solo da rizosfera de muitas plantas e também podem estabelecer uma associação mais específica vivendo dentro das raízes, folhas e outros tecidos de plantas como endófito. Seu papel como microrganismo promotor do crescimento de plantas está relacionado com o aumento da biomassa vegetal, solubilização de fosfato e outros minerais e controle de patógeno em plantas (REIS & TEIXEIRA, 2015).

A *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria diazotrófica endofítica ácido-tolerante, que cresce mesmo em alta concentração de sacarose (10%) e pH muito baixo (3,0), tendo capacidade de fixar nitrogênio em condições de microaerofilia (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988). Há indícios de que *Gluconacetobacter diazotrophicus* não sobrevive no solo sem a presença de uma planta hospedeira (o que confirma seu hábito endofítico) e baixas concentrações de oxigênio no ambiente são necessárias para a expressão e funcionamento da enzima nitrogenase (JAMES & OLIVARES, 1998; JAMES et al., 2001). Foram obtidas, inicialmente, a partir de raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar cultivada nos estados de Alagoas, Pernambuco e Minas Gerais, *Pennisetum purpureum*, batata-doce e café (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; PAULA et al., 1991; JIMENEZ-SALGADO et al., 2006), além de variedades de cana-de-açúcar cultivadas na Austrália, Cuba, Argentina e México (LI & MACRAE, 1991; FUENTES-RAMIREZ et al., 1993; DONG et al., 1994; BELLONE et al., 1997), e a partir de arroz e chá na Índia (DUTTA & GACHHUI, 2006; MUTHUKUMARASAMY et al., 2005). Foram detectadas em raízes, caules, palhada, solo da

rizosfera e seiva xilemática de cana-de-açúcar (REIS, 1991; PERIN, 2003). Há registros de detecção de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em hemípteros de cana-de-açúcar, indicando que estes são vetores de disseminação deste microrganismo (ASHBOLT & INKERMAN, 1990).

A *Gluconacetobacter diazotrophicus* é encontrada em elevada quantidade no interior do caule da cana-de-açúcar, sendo a bactéria mais estudada nesta cultura, pois possibilita a fixação de nitrogênio, mesmo na presença de nitrato prontamente disponível no solo (STEFFAN & ATLAS, 1991), já que não possui a enzima redutase do nitrato (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988).

A melhor fonte de carbono para seu crescimento é a sacarose a 10%, mas há crescimento significativo mesmo em concentrações mais elevadas (30%). Quando a sacarose não pode ser transportada ou respirada por *Gluconacetobacter diazotrophicus*, sua assimilação ocorre através da secreção de uma enzima extracelular, capaz de hidrolisar a sacarose em frutose e glicose (GILLIS et al., 1989; MARTINEZ-FLEITES et al., 2005). A população nativa ou inoculada de *G. diazotrophicus* presente em plantas de cana-de-açúcar, diminui de forma drástica com o avanço da idade da planta (PERIN, 2003) e a aplicação de fertilizante nitrogenado a afeta, provocando a redução do número populacional em variedades de cana-de-açúcar cultivadas na Índia (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999). Além de fixar nitrogênio, *Gluconacetobacter diazotrophicus* produz hormônios de crescimento como auxina e giberelina (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993; MADHAIYAN et al., 2006) e apresenta potencial antagonico contra o fungo *Colletotrichum falcatum*, agente etiológico da podridão vermelha da cana, isso ocorre devido à sua capacidade de fermentar os açúcares e reduzir o pH do meio abaixo de 3,0 (MUTHUKUMARASAMY et al., 2006). A produção de ácidos por *Gluconacetobacter diazotrophicus* também é interessante devido à possibilidade de solubilização de fosfatos insolúveis, verificada em ensaios conduzidos em caldo de cana (MAHESHKUMAR et al., 1999). *Gluconacetobacter diazotrophicus* inicia a colonização de plantas de cana geralmente pelas raízes e superfícies epidêmicas da região inferior do caule, utilizando ápices radiculares e junções das raízes laterais para penetrar, distribuindo-se por toda a planta (JAMES et al., 1994).

Herbaspirillum seropedicae

Representantes da classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales* e família *Oxalobacteraceae*, o gênero *Herbaspirillum* é formado por bactérias móveis, vibróides e gram-negativas. São capazes de fixar nitrogênio atmosférico sob condições microaeróbias, apresentando um bom crescimento exclusivamente com esta fonte de nitrogênio, mesmo na presença de 10% de sacarose. As condições ótimas de crescimento são 30 a 34°C e pH 5,3 a 8,0 (GARRITY, 2005), o que demonstra a plasticidade da espécie, que tolera grandes variações de pH. Ocorrem endofiticamente em associação principalmente com *Poaceae*, nas quais colonizam raízes, caules e folhas (GARRITY, 2005). A espécie representa um grupo de estirpes muito uniforme, quando comparadas as suas características fisiológicas (BALDANI et al., 1986).

São endófitos de ampla gama associativa, que colonizam cana de açúcar, arroz, trigo, sorgo e outros cereais (BHATTACHARJEE et al., 2008), e possuem atividade de nitrogenase mais tolerante ao oxigênio, em comparação com o gênero *Azospirillum* (BALDANI et al., 1986), espécies do gênero *Herbaspirillum* colonizam plantas distribuídas entre vários táxons, como trigo, milho, arroz, sorgo, cana-de-açúcar, forrageiras da família *Poaceae*, palmeiras oleaginosas, bananeira, abacaxizeiro e plantas fibrosas C4 (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1997; OLIVARES et al., 1996; JAMES et al., 1997; WEBER et al., 1999;

MAGALHÃES CRUZ et al., 2001; KIRCHHOF et al., 2001), tendo sido recuperada a partir de vários órgãos vegetais, como raízes, folhas e colmos de *Poaceae* de interesse econômico, como cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1997) e ocasionalmente de sementes de cereais (BALDANI et al., 1992).

Como é comum nos organismos endofíticos, *Herbaspirillum seropedicae* apresenta baixa sobrevivência em solo natural, porém é menos afetado em solos estéreis, o que significa que fatores bióticos como a competição microbiana interferem na sobrevivência dessa bactéria no solo nativo (OLIVARES et al., 1996), sendo as bactérias do gênero *Herbaspirillum*, e em especial *H. seropedicae*, as mais eficientes na colonização inicial de raízes de plântulas de cana micropropagadas (OLIVEIRA et al., 2009).

Quando inoculada em folhas de cana, *Herbaspirillum seropedicae* não se difunde nos vasos xilemáticos, permanecendo no local da inoculação (JAMES et al., 1997). Nas raízes, as bactérias aderem-se ao longo do eixo radicular da planta de cana e invadem os tecidos internos principalmente nas junções das raízes secundárias, ocupando os espaços intercelulares e colonizando o xilema (BALDANI et al., 1997), enquanto que em raízes de arroz, colonizam inicialmente as células epidérmicas da superfície radicular e só então invadem os espaços intercelulares (BALDANI, 1995).

Na fase inicial de colonização, *Herbaspirillum seropedicae* fixa-se à superfície radicular, aderindo ao rizoplano, seguida da colonização dos pontos de emergência de raízes laterais e penetração nas discontinuidades da epiderme, aparentemente envolvendo uma secreção de substâncias adesivas, sem degradação de paredes celulares por reações enzimáticas (MONTEIRO et al., 2012). Este padrão de infecção oferece a oportunidade de *Herbaspirillum seropedicae* ocupar o cilindro vascular após a invasão cortical, antes da diferenciação da endoderme (RONCATTO-MACCARI et al., 2003). Estudos com os genes *rfbB* e *rfbC*, envolvidos na biossíntese de lipopolissacarídeo (LPS) em *Herbaspirillum seropedicae* demonstraram que sua expressão é necessária para sua competência rizosférica e a associação endofítica em plantas de milho (BALSANELLI et al., 2010). Plantas de cana da variedade SP70-1143 inoculadas com uma mistura de *Herbaspirillum* (*H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*) apresentaram maior população de *H. seropedicae* associadas às raízes; ambas as espécies foram capazes de colonizar o sistema radicular, mas em locais diferentes, indicando algum antagonismo (OLIVEIRA et al., 2009). Em ensaios com plântulas micropropagadas livres de bactérias e com plântulas não estéreis provenientes de toletes germinados detectaram a bactéria marcada intercelularmente no colênquima e região parenquimática em maiores densidades e frequências que nos feixes vasculares, além de extensiva colonização nos tecidos da base do caule (NJOLOMA et al., 2006). Ensaios com plântulas de milho exibiram a endoderme e o cilindro central colonizados por *H. seropedicae* estirpe RAM4 (marcada com proteína DsRed) vinte e duas horas após a inoculação e 72 horas após a inoculação, a bactéria havia alcançado os vasos xilemáticos (MONTEIRO et al., 2012).

Herbaspirillum rubrisubalbicans

Anteriormente classificada como *Pseudomonas rubrisubalbicans*, e reclassificada em 1996 por Baldani e colaboradores, através de dados de hibridização DNA: rRNA, o epíteto específico deriva de *ruber* (vermelho) e *subalbicans* (esbranquiçado) fazendo referência aos sintomas da “estria mosqueada”, caracterizada pelo desenvolvimento de estrias vermelhas com manchas brancas nas folhas de variedades susceptíveis de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1997). Ainda não foi possível isolar esta bactéria do solo, sugerindo com essa informação seu estabelecimento endofítico, que sabidamente pode exibir patogenicidade ou não, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* pode causar os sintomas de “estria mosqueada” na

variedade comercial B-4362 de cana-de-açúcar (GALLI et al., 1980) e estrias vermelhas em variedades de sorgo. Após investigação de muitos genótipos, não foi detectado outro genótipo de cana susceptível, mesmo em ensaios de inoculação artificial (PIMENTEL et al., 1991). Apesar do exposto, a “estria mosqueada” é considerada uma doença de pouca importância econômica, pois está restrita a poucas variedades e não causa a morte da planta (OLIVARES et al., 1997).

Em condições de aerobiose, tanto *H. seropedicae* quanto *H. rubrisubalbicans* demonstraram produção significativa de compostos indólicos promotores de crescimento vegetal (RADWAN et al., 2005). Investigações sobre os genes expressos pela cana quando inoculada com *G. diazotrophicus* e *H. rubrisubalbicans* geraram uma grande quantidade de dados que demonstraram uma participação ativa do hospedeiro na interação, respondendo a diversos processos metabólicos durante a associação (NOGUEIRA et al., 2001), em especial com a redução da expressão de genes relacionados à defesa contra patógenos (VINAGRE et al., 2006).

H. rubrisubalbicans é capaz de colonizar a parte aérea de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, via infecção das aberturas estomáticas no limbo foliar. E assim como *H. seropedicae*, coloniza todo o eixo radicular, apresentando uma maior frequência de bactérias nas zonas de diferenciação, alongamento e formação de pelos, colonizando o interior das raízes pela infecção nas zonas de emergência laterais e rupturas epidérmicas, ocupando os espaços intercelulares corticais e invadindo o cilindro central, passando ao xilema (OLIVARES, 1997).

Ensaio de imunomarcção da nitrogenase demonstraram a expressão da mesma por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* em densas colônias em espaços intercelulares de folhas de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1996) e no protoxilema de folhas de sorgo (JAMES et al., 1997).

Investigações com uso de inoculação de cinco diferentes espécies de bactérias diazotróficas endofíticas simultaneamente em cana micropropagada, avaliadas por imunomarcção com sondas fluorescentes demonstraram que *Herbaspirillum* (*H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*) exibiam predominância de colonização radicular quando comparada a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, sendo detectadas aderidas à superfície radicular e rizoderme, formando microcolônias no ápice radicular e na região de emergência de raízes laterais (OLIVEIRA et al., 2009).

2.6. Número Mais Provável - NMP

Uma das técnicas mais antigas para avaliar o estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas é a contagem do número de bactérias culturáveis denominada Número Mais Provável (NMP) associado aos meios de cultura. Esta técnica foi idealizada por McCrady (1915) para estimar a densidade da população microbiana em tubos de fermentação e desde então vem sendo utilizada para estimar a densidade de vários microrganismos provenientes de diversas origens e em diferentes sistemas.

O NMP ou método da diluição pode estimar a densidade de um microrganismo, sem necessidade de contagem direta e consiste em diluições sucessivas, amostragens de cada diluição, incubação em meios apropriados e avaliação quanto ao crescimento do organismo desejado. Essa técnica para estimar a densidade é baseada na teoria da probabilidade (COCHRAN, 1950).

A técnica do NMP tem sido muito utilizada para estimar a densidade das populações de bactérias em tecidos de planta, como da família *Poaceae* principalmente em cana-de-açúcar, onde estudos foram usadas para quantificar bactérias diazotróficas (DÖBEREINER et

al., 1995; PERIN et al., 2004; GOMES et al., 2005; GARCIA DE SALAMONE et al., 2012). Para as bactérias diazotróficas endofíticas são utilizados os meios de cultura semissólido, semi-seletivos, com diferentes fontes de carbono e diferentes condições de crescimento (DOBEREINER et al., 1995). Essa técnica tem como vantagem principal a facilidade de utilização e o baixo custo, porém os meios de cultura utilizados não são totalmente específicos, sendo assim uma técnica semi-específica, tornando então necessário a identificação das mesmas ou através da marcação das bactérias alvos por resistência natural a antibióticos (BALDANI et al., 2014). Em 2014 foi publicado um guia metodológico abrangente (BALDANI et al., 2014), onde estão agrupados vários métodos e diferentes formulações de meio semissólido livre de nitrogênio, que podem orientar a comunidade científica que trabalha no campo da fixação biológica de nitrogênio e discute as vantagens e limitações do método, e, inclusive sugere o uso do meio semissólido associado a técnicas moleculares.

A técnica NMP foi utilizada nas culturas de trigo e sorgo inoculadas em condições de campo em conjunto com uma marcação natural de resistência a antibióticos para monitorar o estabelecimento de *Azospirillum spp* (BALDANI et al., 1986). Os autores observaram que as estirpes de *Azospirillum brasilense* Sp107 e Sp245 estabeleceram-se e predominaram sobre a população de *Azospirillum spp* em raízes lavadas ou esterilizadas de trigo analisados em três experimentos independentes. Em contrapartida, as estirpes Sp7 e Cd não se estabeleceram bem nas raízes de trigo. Esses autores verificaram o estabelecimento da estirpe SP S82 de *Azospirillum lipoferum* representando 72% dos isolados de raízes inoculadas com esta estirpe, na cultura do sorgo. Dessa forma, confirmaram o estabelecimento de *Azospirillum spp* e observaram um número de bactérias maior na parte superior das raízes (mais próximas do caule) em comparação com as extremidades. A técnica de NMP também foi utilizada para avaliar a localização (raízes, colmos e folhas) e o número de bactérias endofíticas em quatro genótipos de cana-de-açúcar, onde foi investigada a possível existência de correlação com os resultados apresentados em trabalhos de quantificação da FBN (REIS JUNIOR et al., 2000). Os resultados sugerem que o número dessas bactérias, presentes em cada um dos genótipos, não explica as diferenças encontradas, quanto à contribuição da FBN para nutrição nitrogenada dessas plantas. Em outro trabalho, foi avaliado o uso de ácidos húmicos (AH) e da bactéria endofítica *H. seropedicae* sobre a dinâmica da população de bactérias inoculadas (técnica do NMP) e o crescimento radicular de microtolete de cana-de-açúcar do cultivar RB72454, tratados termicamente ou não (MARQUES JUNIOR et al., 2008). O uso em conjunto ou isolados de AH e bactérias diazotróficas endofíticas não alterou o tamanho populacional das bactérias no tecido radicular em toletes que não receberam termo-terapia, enquanto que nos tratados termicamente, a inoculação combinada ou não com AH, alterou significativamente o tamanho das populações de bactérias nas raízes.

2.7. Utilização da Técnica de PCR em Tempo Real

A técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), é uma tecnologia que possibilita a síntese de fragmentos de DNA, por meio da enzima DNA-polimerase, que também participa da replicação do material genético das células. A DNA-polimerase sintetiza uma sequência complementar de DNA, desde que um pequeno fragmento, o iniciador, ou *primer*, já esteja ligado a uma das cadeias do DNA no ponto escolhido para o início da síntese. O *primer* define a sequência a ser replicada, e com isso ocorrem ampliações de determinadas sequências de DNA com bilhões de cópias.

O sucesso da amplificação de DNA pela técnica da PCR convencional é dependente de diversos fatores, como a presença de inibidores, a quantidade de DNA, o estado de

degradação do DNA, entre outros. Assim, a necessidade de monitorar em simultâneo a quantidade e qualidade do DNA amplificado levou ao desenvolvimento de uma variante da técnica da PCR convencional: a PCR em tempo real. A PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa ou PCR em tempo real quantitativa ou simplesmente qPCR (HIGUCHI et al., 1993). O procedimento é semelhante ao da técnica da PCR convencional diferindo essencialmente em uma característica inovadora: a possibilidade de quantificação em tempo real do DNA amplificado, em cada ciclo de amplificação. Neste método, as fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas, ocorrendo em simultâneo e em tempo real (HEID et al., 1996). O sucesso da técnica levou rapidamente ao seu aperfeiçoamento. Para tal contribuíram, por exemplo, o desenvolvimento de sondas de oligonucleotídeos de dupla-hélice e a descoberta de que a *Taq* polimerase possui atividade exonuclease 5'-3'. Na última década diversas plataformas de instrumentação foram criadas e comercializadas; no entanto, a maioria é composta por um termociclador, com sistema ótico para a excitação e recolha da emissão da fluorescência e um computador com *software* próprio para a aquisição de dados e análise final da reação (MACKAY et al., 2007).

A técnica de PCR em tempo real apresenta como principais vantagens: especificidade, sensibilidade elevada no que se refere à utilização de uma sonda ou de um corante apropriado, rapidez, redução do risco de contaminação pós amplificação, potencial de produção elevado, detecção de quantidades relativamente pequenas de DNA alvo (3 picogramas de material, o que é cerca de 1000 vezes menos material genético), utilização de uma instrumentação de maior fiabilidade e melhoria nos protocolos tornaram a tecnologia de PCR em tempo real como referência para a detecção de DNA (OLIVEIRA, 2010).

ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences-PCR) foi utilizada pela primeira vez como biomarcador para rastrear a identidade de vários isolados de bactérias diazotróficas endofíticas que colonizam milho em diversas fases de crescimento em condições de campo (GUPTA et al., 2013). Neste trabalho foi encontrado que a concentração global de bactérias diazotróficas variou de $0,2 \times 10^4$ - $8,6 \times 10^4$ ufc g⁻¹ de material vegetal após 7 dias após a inoculação e que houve um aumento gradual até 42 dias após a inoculação. A técnica de PCR em Tempo Real (qPCR) também foi aplicada para detectar e quantificar a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, presente no inoculante da Embrapa Agrobiologia em cana-de-açúcar crescida em condições de campo (BOA SORTE et al., 2014). A utilização de iniciadores espécie-específicos (BOA SORTE et al., 2014) torna a técnica sensível para detectar bactérias, e assim determinar o número de células bacterianas que colonizam endofiticamente o tecido das plantas. Estes ensaios podem ser utilizados para avaliar a ocorrência de bactérias em amostras com 0,5 ng a 0,000000005 ng DNA, dependendo dos iniciadores espécie-específicos utilizados (BOA SORTE et al., 2014). Quantificação de bactérias promotoras de crescimento da espécie *H. seropedicae*, na rizosfera de plântulas de milho mostrou que o iniciador HERBAS1 foi capaz de detectar um número de cópias do DNA bacteriano por grama de massa fresca de raiz, entre 10^7 e 10^9 UFC, indicando que esta metodologia pode ser útil no monitoramento da interação planta-bactéria (PEREIRA, 2014). O uso da técnica de qPCR para a detecção de *X. albilineans*, o agente causal da escaldadura das folhas de cana-de-açúcar, mostraram que a qPCR é uma técnica altamente sensível para detecção da bactéria já que forneceu dados confiáveis para realizar uma triagem de resistência da folha à doença em cultivares resistente e susceptíveis (GARCES et al., 2014).

2.8. BOX-PCR

Um método internacionalmente reconhecido de caracterização de estirpes consiste na determinação do perfil de DNA após a amplificação com *primers* (oligonucleotídeos) relacionados a regiões repetitivas e conservadas do DNA, em geral no espaço intergênico, a avaliação por rep-PCR (*repetitive-sequence-based-PCR*) (VERSALOVIC et al., 1991; DE BRUIJN, 1992; VERSALOVIC et al., 1994). Os elementos repetitivos parecem estar localizados em posições distintas intergênicas no genoma, em ambas as orientações. Existem três famílias principais de elementos, incluindo as sequências REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*) (35-40 pb) (STERN et al., 1984), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) (124-127 pb) (HULTON et al., 1991) e BOX-box A (54 pb), box B (43 pb) e box C (50 pb) (MARTIN et al., 1992); neste último caso, apesar da existência de três elementos, somente a subunidade box A parece ser altamente conservada em bactérias (KOEUTH et al., 1995).

BOX-PCR é uma técnica para diferenciar isolados bacterianos filogeneticamente próximos (MENNA et al., 2009) sendo aplicada para análise genotípica de bactérias diazotróficas de maneira eficiente e também para distinguir os isolados abaixo do nível de espécie. Os iniciadores (*primers*) para a amplificação desses elementos podem ser sintetizados a partir de repetições invertidas dos elementos REP, ERIC e da subunidade box A do BOX e, se as repetições estiverem distribuídas no genoma em orientação invertida, então um único *primer* pode ser suficiente para gerar polimorfismo de DNA (VERSALOVIC et al., 1991, VERSALOVIC et al., 1994). A utilização do *primer* BOX A1R permite a caracterização de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pela formação e amplificação por PCR. Como a técnica é baseada na amplificação de regiões repetitivas do genoma, ela tem sido amplamente utilizada por ser considerada de fácil execução, principalmente para análise de grandes populações bacterianas (MEHTA et al., 2002). Como exemplo tem-se o estudo da diversidade bacteriana associada à cana-de-açúcar, com o objetivo de auxiliar na obtenção de bactérias eficientes para promoção de crescimento das plantas, aumentando a produtividade e diminuindo a utilização de insumos (ANTUNES, 2016). Nesse trabalho as bactérias diazotróficas foram isoladas de folhas e colmos de cana-de-açúcar das variedades (RB867515; RB1011 e RB 92579), para análises bioquímicas e moleculares, visando a formulação de inoculantes microbianos com potencial de promover crescimento vegetal em plantas. Em outro trabalho (PRYA et al., 2016) foi feita a tentativa de desenvolver um marcador molecular SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions”) para a autenticação inequívoca de dois inoculantes *Azospirillum*, viz: *A. lipoferum* (estirpe Az204) e *A. brasilense* (estirpe SP7). Além disso, os iniciadores SCAR foram avaliados para a autenticação simultânea, bem como a quantificação de inoculantes de *Azospirillum* preparados comercialmente por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e Número Mais Provável de PCR (NMP-PCR). O ensaio de qPCR e NMP foram capazes de quantificar as formulações comerciais, enquanto MNP-PCR falhou para a estirpe Az204. A quantificação presuntiva desenvolvida nesse trabalho pode contribuir para melhorar o padrão de qualidade de inoculantes comerciais (PRYA et al., 2016). Outro exemplo é a avaliação de uma sequência baseada em BOX-PCR para a identificação específica de *Actinobacillus pleuropneumoniae* e seu uso em um PCR multiplex para detectar adicionalmente *Haemophilus parasuis* e *Pasteurella multocida*, dois outros principais patógenos respiratórios de suínos (ROSSI et al., 2014). O método PCRs com base no fragmento BOX-Scar desenvolvido é rápido, sensível e diferenciou a *A. pleuropneumoniae* de todos os patógenos testados.

3. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho propõe avaliar o estabelecimento das cinco estirpes presentes no inoculante para cana-de-açúcar desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia, em plantas de cana-de-açúcar aos 30 dias após a inoculação, a fim de compreender melhor o efeito provocado pela associação dessas estirpes na colonização de plantas de cana-de-açúcar.

3.1. Objetivo Específico

- Realizar a contagem do número de bactérias inoculadas que se estabeleceram nos tecidos das raízes através da técnica do NMP.
- Realizar a quantificação absoluta do número de cópias 16SrDNA das bactérias do inoculante que estejam presentes nos tecidos das raízes por meio da técnica de PCR em Tempo Real.
- Realizar a análise comparativa do perfil eletroforético a partir da amplificação por Box-PCR de DNA extraído de películas formadas em meio semissólidos de tratamentos inoculados e controle.

3.2. Hipótese

A inoculação dos mini-toletes permite o estabelecimento eficiente das cinco bactérias diazotróficas endofíticas presentes no inoculante da Embrapa Agrobiologia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção do Material Vegetal

Um experimento com toletes da variedade de cana-de-açúcar RB867515 foi instalado no campo experimental da Embrapa Agrobiologia - Seropédica – RJ, em 2014. O campo experimental escolhido não possui registro anterior de experimentos com inoculação. O desenho experimental utilizado foi de blocos ao acaso com 4 repetições, com adubação básica – 50 kg N, 100 kg P₂O₅ e 150 kg K₂O₅. Aos 14 meses após o plantio foram realizadas coletas de caules para obtenção de mini-toletes. Estes foram cortados, mantendo uma gema em cada mini-tolete com aproximadamente 3 cm de largura, e embalados em sacos de polietileno por 24 horas, a fim de estimular a produção do hormônio etileno, para induzir a germinação das gemas. Após esse período, foram selecionados mini-toletes com o mesmo padrão germinativo.

4.2. Cultivo das Estirpes Bacterianas:

Neste trabalho foram utilizadas as cinco estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas (Tabela 1) que compõem o inoculante de cana-de-açúcar. As estirpes encontram-se depositadas na Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia.

As estirpes utilizadas foram cultivadas em meio de cultivo de Dygs (2,0 g L⁻¹ de glicose; 1,5 g L⁻¹ de peptona bacteriológica; 2,0 g L⁻¹ de extrato de levedura; 0,5 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 0,5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O e 1,5 g L⁻¹ de ácido L-glutâmico, pH 6,0) (RODRIGUES NETO et al., 1986), em tubos de ensaio contendo 5,0 mL de meio, em agitação à 180 rpm por 12 horas, a 30°C, quando o objetivo foi a multiplicação rápida das células. Quando o objetivo desejado foi reduzir o risco de contaminação, para selecionar o crescimento exclusivo de bactérias diazotróficas, foram empregados os meios sólidos semi-seletivos de acordo com cada estirpe. Os estoques das diferentes estirpes de bactérias foram preparados a partir desse cultivo. A preservação das culturas de bactérias foi realizada por ultracongelamento e, também, em tubos contendo meio sólido, sob óleo mineral estéril.

Tabela 1. Estirpes bacterianas e meios de cultura semi-seletivos empregados neste estudo.

Espécie Bacteriana	Estirpe	Meio de Cultura	Referência
<i>N. amazonense</i>	BR11115 (CBAmC)	LGI	Magalhães et al., 1983
<i>P. tropica</i>	BR11366 (Ppe8)	JMV	Baldani et al., 1996
<i>G. diazotrophicus</i>	BR11281 (PAL5)	LGI-P	Cavalcanti e Döbereiner, 1988
<i>H. seropedicae</i>	BR11335 (HRC54)	JNFB	Baldani et al., 1996
<i>H. rubrisubalbicans</i>	BR11504 (HCC103)	JNFB	Baldani et al., 1996

4.3. Inoculação de Mini-toletes de Cana-de-açúcar com Bactérias Diazotróficas:

Os pré-inóculos foram preparados em tubos de ensaio a partir de colônias isoladas, contendo 5,0 mL de meio Dygs líquido e mantidos a 30°C e 200 rpm por aproximadamente 24 horas. Uma alíquota correspondente a 10⁶ células bacterianas por mL, em contagem na câmara de Neubauer, foi utilizada para produzir um volume maior de células em erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL do mesmo meio, sendo este então, o volume utilizado para a inoculação dos mini-toletes.

Para a inoculação foi realizada uma nova contagem em câmara de Newbauer para garantir uma concentração de 10^6 células bacterianas por mL. Com isso, foi adicionado um volume de 10 mL de cultura bacteriana crescida em meio de cultura Dygs em solução de açúcar 4 % (m/v), obtendo ao final 1,0 L de solução para inoculação. Os mini-toletes de cana-de-açúcar foram imersos no reservatório contendo o inoculante diluído, por 1 hora. O tratamento controle consistiu da imersão de mini-toletes em recipiente contendo apenas o meio de cultura diluído em solução de açúcar 4 % (m/v) e posteriormente foram colocados em recipiente secos por 30 minutos. Ao final do período de inoculação, os mini-toletes foram levados para casa de vegetação e plantados em bandejas contendo aproximadamente 9 kg de substrato, areia + perlita (2:1) estéril. O experimento foi montado em blocos ao acaso e o delineamento utilizado foi de 7 tratamentos, sendo 1 tratamento não inoculado, 5 tratamentos com cada estirpe de bactéria inoculada individualmente e 1 tratamento com a mistura das cinco estirpes de bactérias (denominado a partir de agora de tratamento Mix), com 4 repetições biológicas. Este procedimento gerou um total de 28 bandejas, cada uma contendo 10 mini-toletes de cana-de-açúcar, totalizando 280 mini-toletes (Figura 2).

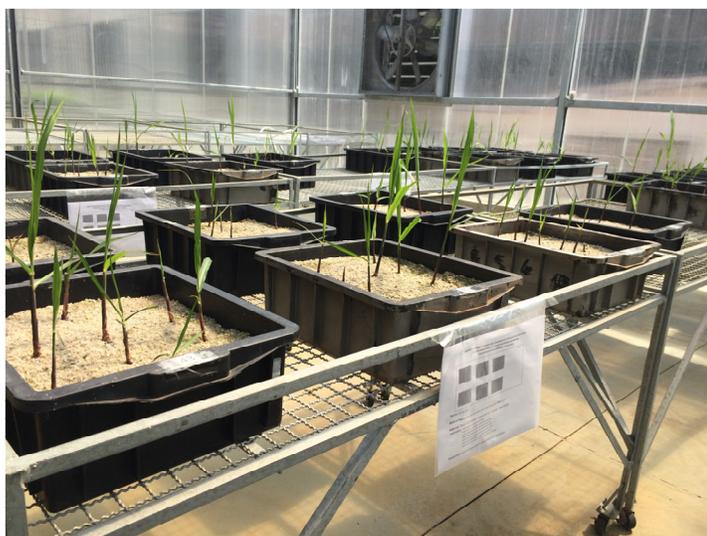


Figura 2. Experimento de inoculação de mini-toletes da var. RB867515 de cana-de-açúcar com as cinco estirpes bacterianas presentes no inoculante da Embrapa Agrobiologia.

4.4. Coleta

A coleta foi realizada 30 dias após a inoculação, fase na qual ocorre a emergência de raízes primárias e brotação das gemas em direção à superfície do solo ao mesmo tempo em que surgem as raízes no tolete, que emergem de banda de raiz primária nos nódulos do tolete. As raízes e a base do caule de 3 plântulas com 30 dias após a inoculação (Figura 3) foram coletadas. No momento da coleta, aproximadamente 1g de raiz (pesadas em balança de precisão) foram separadas para realizar a contagem pela técnica do Número Mais Provável (NMP). E o restante do material colhido, raiz e base do colmo, foram imediatamente armazenados em N_2 líquido e, posteriormente armazenadas à $-70^{\circ}C$ em ultrafreezer até o momento de seu processamento.



Figura 3. Plântula de cana-de-açúcar, inoculada com a bactéria *N. amazonense*

4.5. Análise Microbiológica

4.5.1. Contagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas

A contagem das bactérias diazotróficas seguiu a metodologia descrita por (DOBEREINER et al., 1995; BALDANI et al., 1996). As amostras das raízes das plantas foram lavadas em água corrente e cortadas em pedaços de aproximadamente 10 cm. As frações foram pesadas (1g) e maceradas em 9 mL de solução salina e diluídas serialmente na mesma solução até 10^{-4} . Uma alíquota de 0,1 mL das suspensões 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foi inoculada em meios de cultura semissólidos, semi-seletivos em triplicatas (3 frascos por diluição) para o isolamento das estirpes bacterianas como descrito na Tabela 1.

Os meios de cultura semi-específicos para cada espécie (Tabela 1), foram incubados a 30°C por 7 dias e após este período, foi realizada a contagem do número de bactérias presentes nas amostras pelo método do Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady. O número de tubos positivos foi determinado pela presença de película subsuperficial característica, em forma de véu, no meio semissólido (Figura 4).



Figura 4. Meio semissólido JNFB inoculado com amostra macerada de tecido do tratamento Mix (mini-toletes inoculados com a mistura das cinco estirpes bacterianas).

Posteriormente, as películas foram removidas dos meios semissólidos e armazenadas em tubos tipo Ependorf de 2,0 mL contendo 0,5 mL de água destilada estéril e armazenados

no freezer a 4°C, para posterior análise por BOX-PCR. Para extração do DNA genômico das películas foi utilizado o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Cat. A1120 No. 0000050789), seguindo as recomendações do fabricante. Para a lise celular, foram adicionados 600 µL de solução de lise nucleica ao precipitado de células, sendo o meio homogeneizado e incubado por 5 minutos a 80°C e mantido em temperatura ambiente; após foram adicionados 3 µL de solução de RNase ao precipitado de células, sendo o meio homogeneizado e incubado por 60 minutos a 37°C e mantido em temperatura ambiente e por fim foram adicionados 200µL da solução de precipitação de proteína. A amostra foi homogeneizada e incubada em gelo por 5 minutos, seguido de centrifugação de 13.000-16.000xg por 3 minutos.

Para a precipitação do DNA, o sobrenadante da lise celular foi transferido para tubos limpos, contendo 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente, homogeneizados e centrifugados, descartando o sobrenadante. Ao precipitado foram adicionados 600 µL de etanol 70% a temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 13.000-16.000 xg por 2 minutos. O etanol foi descartado e o tubo aberto para secar o precipitado. O DNA foi reidratado com 100 µL de solução de reidratação e mantido por 1 hora a 65°C, e a solução foi diluída para 100 ng µL⁻¹. A quantificação do DNA foi realizada no equipamento Qubit™ 2.0 Fluorometer.

4.6. Análises Moleculares

4.6.1) Extração de DNA das estirpes isoladas

Para confirmação da identidade das estirpes *G. diazotrophicus* (PAL5), *H. rubrisubalbicans* (HCC103), *H seropedicae* (HRC54), *N. amazonense* (CBAmC) e *P. tropica* (Ppe8) presentes no inoculante da Embrapa, foi extraído o DNA genômico a partir de células bacterianas cultivadas em meio de cultivo líquido Dygs, por 18 horas. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Cat. A1120 No. 0000050789), seguindo recomendações do fabricante, como descrito no item 4.5.1, com o objetivo de ser utilizada posteriormente em PCR convencional.

Para amplificação do fragmento específico de cada uma das estirpes utilizadas na inoculação das plantas, foram utilizados os iniciadores desenhados por BOA SORTE e colaboradores (2014) para regiões diferenciadas do 16S rDNA, com objetivo de diferenciar as estirpes bacterianas que compõem o inoculante da cana-de-açúcar. Análises de *Blast* confirmaram a especificidade para as bactérias alvo. Então reações de PCR foram realizadas para confirmar o produto, testando diferentes condições para cada de iniciador, sendo ajustadas para cada uma das cinco espécies presentes no inoculante. Classificando então, esses iniciadores como espécies-específicos (Quadro 1) (BOA SORTE et al., 2014). Para amplificar esses fragmentos por PCR convencional, utilizando o kit Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Cat. No.M8295) foi preparada uma reação ajustada para as cinco estipes bacterianas com a seguinte composição: 10 ng L⁻¹ de DNA genômico, Buffer Green 1X, 4 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 0,2 mmol L⁻¹ de dNTP, 0,6 mmol L⁻¹ de cada para de iniciadores (Quadro 1) e por fim foi feita a aplicação de 1U de Taq DNA Polimerase em um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler® gradiente (Eppendorf Scientific, Inc., EUA), para as estirpes bacterianas com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, seguidos de 39 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, para anelamento dos iniciadores a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45

segundos, com etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos. Ao final das reações, as amostras foram mantidas a 4°C.

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Foram adicionados 5 µL do produto da PCR, e para tampão de corrida foi utilizado TAE 1X (Tris Base 40 mmol L⁻¹ ácido acético glacial 1 mmol L⁻¹, EDTA 50 mmol L⁻¹, em pH 8,0) por 2 horas e 30 minutos, a 80V. Logo após, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) e visualizado sob luz ultravioleta (UV) em foto-documentador Kodak Logic 100 (Kodak®). O tamanho do fragmento amplificado foi comparado com o marcador de massa molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™). O DNA genômico extraído das cinco espécies presente no inoculante da cana-de-açúcar isoladas, foram utilizados como referência para as análises de qPCR e BOX-PCR.

Quadro1. Iniciadores para quantificar bactérias diazotróficas endofíticas constituintes do inoculante para cana-de-açúcar.

<i>Iniciador</i>	<i>Seqüência (5' - 3')</i>	<i>Amplicom (pb)</i>
<i>GdPAL5f</i>	<i>GGCTTAGCCCCCTCAGTGTGCG</i>	189
<i>GdPAL5r</i>	<i>GAAACAGCCATCTCTGACTGC</i>	
<i>AaCBAmCF</i>	<i>CCGGATGGCCGTGGAGACTGACCG</i>	219
<i>AaCBAmCR</i>	<i>GGCATTGCTGGATCAGGGTTGCC</i>	
<i>Hs4HRC54f2</i>	<i>CTAATACCGCATAACGATCTAC</i>	307
<i>Hs4HRC54r2</i>	<i>TTCTGGATATTAGCCAAAACC</i>	
<i>Hr1HCC103f1</i>	<i>CGGTGGTAGCTAATATCTACT</i>	300
<i>Hr1HCC103r1</i>	<i>CAGTGTTATCCCAGGGGGCTG</i>	
<i>Bt2Ppe8f1</i>	<i>GGAATTCCGCTGAGAGGTGGA</i>	260
<i>Bt2Ppe8r1</i>	<i>GGCTTGGCAACCCCTCTGTTCC</i>	

Gd - *G. diazotrophicus*, Aa - *N. amazonense*, Bt - *P. tropica*, Hs - *H. seropedicae* e Hr - *H. rubrisubalbicans*. Extraído de BOA SORTE, 2013.

4.6.2. Determinação da curva padrão para qPCR

Foram realizadas análises por PCR em tempo real em “7500 fast real timer PCR system” utilizando o “SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems). Utilizou-se uma placa de microtitulação de 96 poços num total de 15 µL contendo 7,5 µL de SYBR Green PCR Mix Master, 20 pmoles de cada iniciador (Quadro 1) e 3,0 µL de DNA (10ng µL⁻¹). A reação foi realizada utilizando o programa 7500 v 2.0.5 nas condições seguintes: 2 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 20s, a 95°C e 30s, a 63°C. Foi gerada a curva da concentração de DNA conhecida versus os valores de Ct obtidos no qPCR, conforme descrito por Boa Sorte e colaboradores 2014. A massa molecular do fragmento de DNA de 1512 pb do 16S rDNA foi utilizada para converter a sua concentração em número de cópias de genes. A massa molecular foi calculada usando o número de Avogadro (6,02x10²³ cópia DNA mol⁻¹), utilizando a equação recomendada pela Applied Biosystems®, e em seguida converter para o número de cópias do gene. Foi utilizado o valor 3,02x10⁸ para calcular o número de cópias de bactérias diazotróficas endofíticas uma vez que seus genomas não foram sequenciados.

Para determinar a curva padrão de *G. diazotrophicus* que tem seu genoma sequenciado e devidamente anotado (BERTALAN et al., 2010) foi utilizado o valor 1,20x10⁹, pois cada genoma bacteriano de *G. diazotrophicus* tem quatro cópias do gene 16S rDNA (BOA SORTE et al., 2014).

A curva padrão (Número de bactérias vs CT) foi construída através da representação gráfica do número de bactérias (calculado como descrito anteriormente), contida em concentrações conhecidas do rDNA 16S de *G. diazotrophicus* (estirpe PAL5), previamente amplificado a partir do DNA total desta, com os iniciadores espécie-específicos (Quadro 1) e diluídas em série a partir de 10^0 até 10^{-6} , o que corresponde de 0,5 ng a 5×10^{-7} ng de DNA 16S, contra o CT (Cycle Threshold) obtidos pelo método de qPCR.

4.6.3. Análise de qPCR

Para análise quantitativa por qPCR foi utilizado o restante do material (raízes) armazenado em super freezer à menos 70°C , que antes de serem utilizadas, foram maceradas em nitrogênio líquido. Posteriormente foi realizada a extração de DNA/RNA (GRIFFITHS et al., 2000). Para esse procedimento foi adicionado aproximadamente 0,5g de raiz macerada em tubos de 2 mL contendo 0,2 g de Sigma Glass Beads Acid Washed, sendo 0,1 g de 425 - 600 microns e 0,1 g de 710 - 1.180 microns, foram adicionados 500 μL de solução A (Solução CTAB + 240mM Potassium Phosphate Buffer) e 500 μL de solução B (Fenol 25: Clorofórmio 24: Álcool isoamílico 1), após foi homogeneizado por 30 segundos no Mini Bead Beater e centrifugado por 5 minutos a 4°C a 13,200 rpm. Foi então removida a fase aquosa e adicionado o volume em um novo tubo de 2 mL contendo o mesmo volume de solução C (Clorofórmio 24:1 Álcool isoamílico), a mistura foi homogeneizada em vórtex e novamente centrifugada por 5 minutos a 4°C , esta etapa foi repetida. E então, novamente removida a fase aquosa da amostra e adicionado o mesmo volume em um novo tubo de 1,5 mL o mesmo volume de solução D (PEG 8000), e incubado por 2 horas em gelo. Posteriormente as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 4°C , e então foi descartado o sobrenadante, e o pellet lavado em 1 mL de etanol 70% (v/v). Foi feita uma nova centrifugação por mais 10 minutos a 4°C e o sobrenadante novamente descartado, deixando o tubo aberto para secar por aproximadamente 30 minutos em temperatura ambiente, após esse procedimento o pellet foi ressuspenso em 70 μL de buffer TE e deixado por mais 30 minutos em temperatura ambiente e armazenadas em superfreezer a -70°C .

Para a separação do DNA e RNA, foi utilizado o All Prep[®] DNA/RNA Mini Kit (Cat. No. 80204), seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração as amostras foram quantificadas em aparelho Qubit. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% e as amostras de RNA em gel de agarose com brometo de etídio 1%, ambos a 80V durante 1 hora e 30 minutos. (SAMBROOK & RUSSEL, 2001).

Em seguida, com o DNA extraído foi realizada uma PCR convencional utilizando os iniciadores espécie-específicos desenhados para região 16S rDNA (Quadro 1) para cada uma das cinco estirpes bacterianas presentes no inoculante da Embrapa. Para a amplificação desses fragmentos foi novamente utilizado o kit Go Taq[®] Flexi DNA Polymerase (Cat. No.M8295), com os iniciadores espécie-específico listados no quadro 1, como descrito no item 4.6.1.

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%(m/v), a 90 V por 2 horas (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Foram adicionados 5 μL do produto da PCR, e para tampão de corrida foi utilizado TAE 1X (Tris Base 40 mmol L^{-1} ácido acético glacial 1 mmol L^{-1} , EDTA 50 mmol L^{-1} , em pH 8,0). Logo após, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e visualizado sob luz ultravioleta (UV) em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak[®]). O tamanho do fragmento amplificado foi comparado com o marcador de massa molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[™]).

As reações de qPCR, a partir do DNA genômico extraído, foram preparadas em “7500 fast real timer PCR system” utilizando o kit Go Taq[®] qPCR Master Mix (Promega) para quantificação absoluta das estirpes utilizadas, com os iniciadores espécies-específico (Quadro

1). Utilizou-se uma placa de microtitulação de 96 poços num total de 15 μL contendo 7,5 μL de SYBR Green PCR Mix Master, 20 pmoles de cada iniciador e 3,0 μL de DNA (10ng μL^{-1}). A reação foi realizada utilizando o programa 7500 v 2.0.5 nas condições seguintes: desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, seguidos de 39 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, para anelamento dos iniciadores a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, com etapa final de extensão a 72°C por 5 minutos.

4.7. Box-PCR

As películas formadas nos meios semissólidos (Figura 4) foram coletadas e armazenadas em tubos de 2 mL contendo 0,5 mL de água MiliQ estéril. Para extração do DNA genômico dessas amostras foi utilizado o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Cat. A1120 No. 0000050789), seguindo recomendações do fabricante, como descrito no item 4.5.1. Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas à amplificação pela técnica de BOX PCR utilizando o iniciador A1R (VERSALOVIC et al., 1994; KOEUTH et al., 1995). Para a amplificação desses fragmentos foi novamente utilizado o kit Go Taq[®] Flexi DNA Polymerase (Cat. No.M8295). Foi preparada uma reação com a seguinte composição: 10 ng L^{-1} de DNA genômico, Buffer Green 1X, 3 mmol L^{-1} de MgCl_2 , 0,3 mmol L^{-1} de dNTP, 2,5 mmol L^{-1} do primer A1R (5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') e 1 mmol L^{-1} de Taq DNA Polimerase em um volume final de 25 μL . A amplificação foi realizada em um termociclador Mastercycler[®] gradiente (Eppendorf Scientific, Inc., EUA), com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação à 94 °C por 1 minuto, para anelamento dos iniciadores a 53 °C por 1 minuto e extensão a 65 °C por 8 minutos, com etapa final de extensão a 65 °C por 16 minutos. Ao final das reações, as amostras foram mantidas a 4 °C.

Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% a 90V por 3 horas (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Foram adicionados 5 μL do produto da PCR, e para tampão de corrida foi utilizado TAE NOVO (Tris Base 40 mmol L^{-1} ácido acético glacial 1 mmol L^{-1} , EDTA 50 mmol L^{-1} , em pH 8,0). Logo após, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e o perfil de bandas visualizado sob luz ultravioleta (UV) em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak[®]). O tamanho do fragmento amplificado foi comparado com o marcador de massa molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen[™]). Os perfis de bandas observados foram transformados em uma planilha binária e em seguida utilizados para obter um dendrograma de similaridade calculado através do Coeficiente de Dice e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average), utilizando o software Bionumerics versão 7.6.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Contagem do Número de Células das Estirpes Inoculadas pela Técnica do Número Mais Provável (NMP)

Os meios semissólidos semi-seletivos foram usados para a contagem das bactérias diazotróficas inoculadas nos mini-toletes por meio do método do Número Mais Provável (NMP) associado à aplicação da tabela de McCrady (REIS et al., 1994). A formação de película característica levemente abaixo da superfície do meio semissólido sem nitrogênio é um indicativo do crescimento de bactérias diazotróficas, que é onde essas bactérias fixadoras de nitrogênio normalmente encontram condições ideais que permitem a ativação da enzima nitrogenase (BALDANI et al., 2014).

Análise de dados pelo NMP mostram que não houve diferença significativa na contagem da população de bactérias diazotróficas endofíticas nos meios semissólidos JNFB, LGI, LGI-P e JMV após 30 dias de inoculação em casa de vegetação (Figura 5). Os resultados evidenciaram uma população bacteriana presente nos tecidos, variando entre 10^3 - 10^5 células g^{-1} de raiz. Estudos realizados por Perin (2003) sobre a colonização de *G. diazotrophicus* em diferentes variedades de cana-de-açúcar encontraram uma população da referida bactéria em torno de 10^5 e 10^6 células g^{-1} de plântulas de 30 a 88 dias após o plantio.

Embora não tenha havido diferença estatística entre os tratamentos, foi realizada uma análise qualitativa para cada tratamento. O comportamento semelhante observado para os tratamentos de inoculação com a estirpe PAL5 e Mix, no meio LGI-P - Figura 5(A), estirpe Ppe8 e Mix, no meio JMV - Figura 5(B), estirpes HRC54, HCC103 e Mix, no meio JNFB - Figura 5(C) sugere que essas bactérias, durante a fase de brotação e emergência da cultura de cana-de-açúcar, têm capacidade de sobreviver e manter populações da ordem de 10^5 g^{-1} de massa fresca de raiz, mesmo na presença de outras bactérias nativas dos toletes.

Na Figura 5(A) também pode se observar que o número de bactérias no tratamento inoculado com a estirpe *G. diazotrophicus* PAL5 e com a mistura de bactérias (Mix) foi maior que o tratamento não inoculado, resultados esses que corroboram com os encontrados por SILVA (2009). A autora mostrou que a mistura das estirpes proporcionou uma colonização ao redor de 3×10^5 g^{-1} de massa fresca para a estirpe PAL5 no momento da inoculação com ligeiro crescimento atingindo um valor populacional ao redor de 10^6 g^{-1} massa fresca aos 30 dias (fase de emergência da cultura da cana-de-açúcar), se estabilizando aos 50 dias após o plantio. Essa concentração de bactérias no momento do plantio deve-se à presença de fontes de carbono prontamente disponíveis, estimulando a multiplicação e sobrevivência celular. A *G. diazotrophicus* é uma espécie que tem capacidade de sobreviver e manter populações elevadas mesmo em condições de limitação nutricional da planta, se desenvolvendo apenas com as reservas do próprio colmo através da quebra dos açúcares (SILVA, 2009). Esta autora também observou um comportamento semelhante ao utilizar o inóculo misto, porém com menores valores populacionais, devido à presença das demais estirpes empregadas nos inoculantes. Muthukumarasamy et al. (2006) avaliaram a colonização de bactérias endofíticas de *Burkholderia vietnamiensis* estirpe MG43 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe ATCC 49037 na variedade Co86032 micropropagada de cana-de-açúcar ao longo do tempo após a inoculação e detectaram uma população de $1,12 \times 10^5$ células g^{-1} de plântulas frescas entre 60 e 120 dias. A contagem de *Herbaspirillum spp* - Figura 5(C), no meio JFNB, em torno de 10^5 células g^{-1} para todos os tratamentos é comparável ao encontrado por Silva (2009) para a mistura de inoculantes no momento da inoculação, e que aos 15 dias após a inoculação. Novamente a mistura dos inoculantes apresentou um valor populacional dez vezes maior, mantendo-se estável ao longo das coletas, independente do tratamento aplicado, provavelmente devido à presença de fontes de carbono prontamente disponível. Em outros

estudos de inoculação com *Herbaspirillum sp* estirpe B501 gfp1 sob as concentrações do inóculo 10^2 e 10^8 células mL^{-1} , em duas variedades (NiF8 e Ni15) de cana-de-açúcar japonesa, mostram uma população com cerca de $2,4 \times 10^7$ células g^{-1} nos tecidos das plantas da variedade Ni15 inoculadas com a maior concentração bacteriana aos 28 dias após a inoculação (NJOLOMA et al., 2006). Já a inoculação, pelo método de infiltração a vácuo, com a estirpe *Herbaspirillum sp* estirpe B501 gfp1 em toletes das variedades NiF8 e Ni15 de cana-de-açúcar mostraram 10^7 células g^{-1} de massa fresca imediatamente após a inoculação (ZAKRIA et al., 2008). A presença da bactéria foi confirmada por microscopia e a população bacteriana inoculada permaneceu estável por um período de cinco dias após a inoculação. No meio de cultura LGI, usado para a contagem de *N. amazonense*, observou-se uma população de bactérias na ordem de 10^3 células g^{-1} diazotróficas nos tratamentos não inoculado e no Mix em relação à inoculação somente com a estirpe *N. amazonense* CBAmC - Figura 5(D). Os resultados foram comparáveis ao encontrado por Silva (2009), onde foram observados valores populacionais ao redor de 10^5 células g^{-1} massa fresca na colonização de *N. amazonense*. O tratamento não inoculado não apresentou células viáveis de *N. amazonense* ficando abaixo do nível de detecção do NMP possivelmente devido à baixa capacidade de colonização das plântulas.

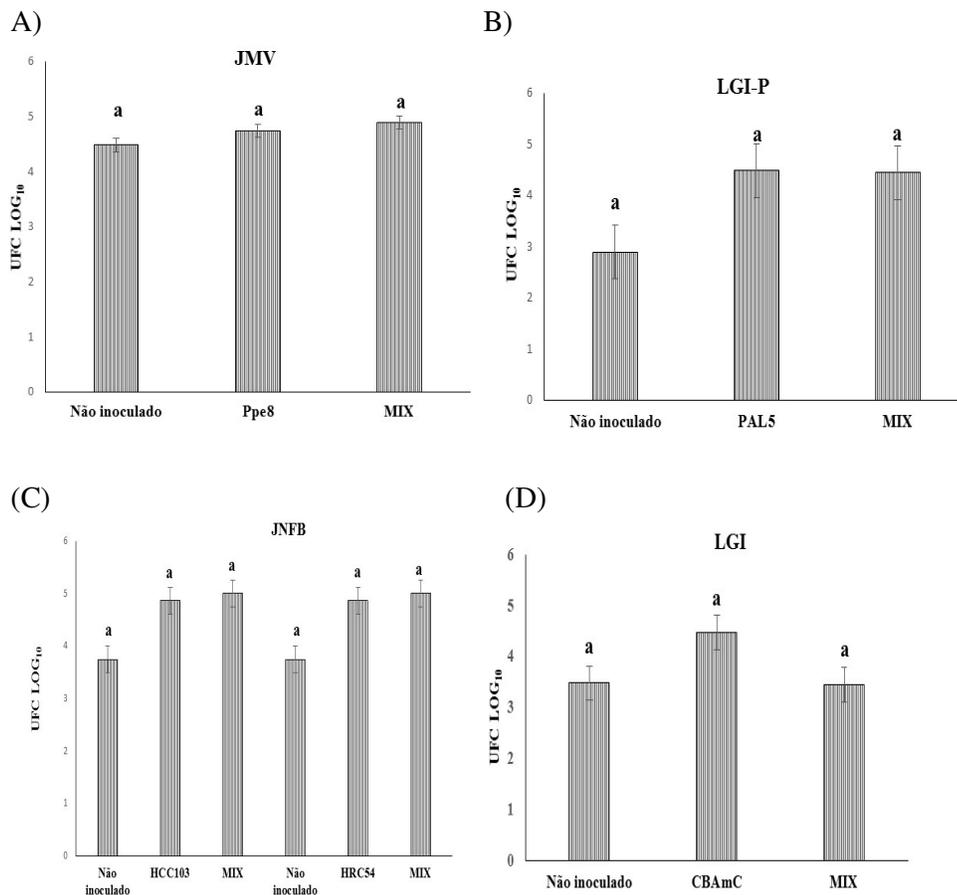


Figura 5. Contagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas em meios semissólidos semi-seletivo originárias dos diferentes tratamentos de inoculação. (A) estirpe PAL5 no meio LGI-P; (B) estirpe Ppe8 no meio JMV; (C) estirpes HRC54 e HCC103 no meio JNFB; (D) estirpe CBAmC no meio LGI. Dados médios de 3 repetições.

Embora não haja diferença estatística foi feita uma comparação entre os tratamentos não inoculado – Figura 6(A) e o inoculado com a mistura de bactérias (Mix) - Figura 6(B). Foi observado um maior número de células bacterianas nos meios semissólidos JNFB e JMV sem inóculo ou no Mix, da ordem de 10^5 células g^{-1} . O número de células no meio LGI sem inoculação foi ligeiramente maior que no inoculado com a mistura das cinco estirpes bacterianas e o inverso foi observado no meio LGI-P indicando que essa diferença não está relacionada com a eficiência de inoculação.

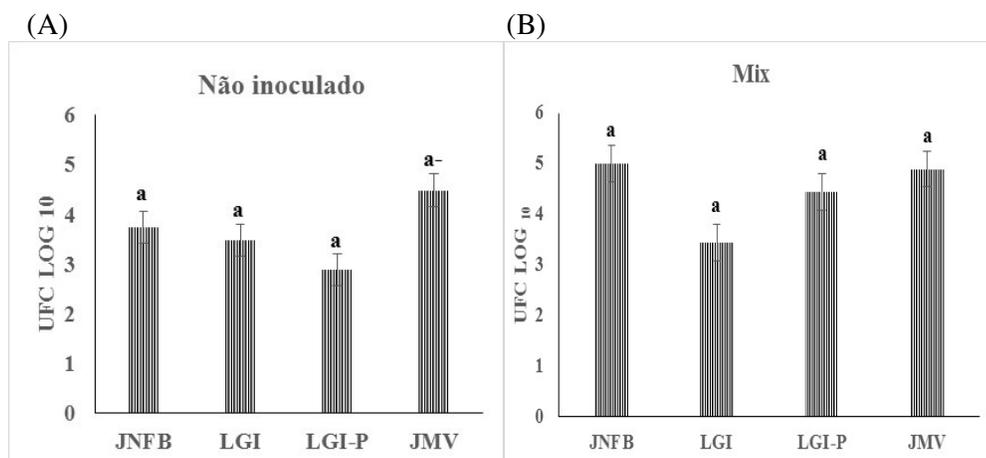


Figura 6. Contagem do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas nos seguintes tratamentos: (A) plantas não inoculadas; (B) Mix - plantas inoculadas com a mistura das cinco estirpes bacterianas. Dados médios de 3 repetições.

O método NMP possui limitações, como por exemplo o crescimento de outros microrganismos levando a uma subestimativa da população bacteriana alvo do estudo. A presença de microrganismos nas amostras do tratamento não inoculado é bem comum, já que os meios de cultivo utilizados na técnica do NMP são semi-seletivos, podendo então, detectar a presença de outros microrganismos diazotróficos (OLIVEIRA et al., 2009; CONCEIÇÃO et al., 2009). Além disso, é conhecido que a planta de cana-de-açúcar, que se propaga vegetativamente, possui uma população endofítica nativa de bactérias diazotróficas bastante alta (REIS JUNIOR et al., 2000).

A ausência de diferença estatística pode ser atribuída provavelmente à presença de um número elevado de bactérias, presentes nas plantas não inoculadas, indicando que a presença de uma microbiota nativa gera uma competição por carboidratos e outras biomacromoléculas com as bactérias endofíticas inoculadas. Este fato pode representar um dreno adicional consumindo a reserva dos microtoletes. Uma explicação adicional reside na competição entre a estirpe inoculada (HRC 54) e as bactérias que naturalmente colonizam o tolete, limitando o estabelecimento endofítico da mesma e, por via de consequência, as respostas positivas sobre o aumento de biomassa da planta hospedeira (REIS JUNIOR et al., 2004). Reis Junior e colaboradores (2000) também observaram que não houve diferença significativa na quantificação de bactérias *Herbaspirillum spp.* e *G. diazotrophicus*, e que estas estavam presentes em maior número nas raízes em relação às outras partes da planta; e que a população de *G. diazotrophicus* decresceu com a aproximação do final do ciclo comercial, enquanto que a *Herbaspirillum* se manteve estável. BOA SORTE (2014) também quantificou as bactérias diazotróficas endofíticas por NMP nos mesmos meios semissólidos após 11 meses de inoculação no campo, e, como neste trabalho, o resultado também variou de 10^1 a 10^4 células g^{-1} massa fresca de raiz. Outros autores, utilizando a mesma técnica, observaram

uma diminuição da população de bactérias diazotróficas endofíticas no final do ciclo da cana-de-açúcar (REIS JUNIOR et al., 2000; GOMES et al., 2005) e declínio populacional de estirpes de *G. diazotrophicus* inoculadas em diferentes variedades de cana-de-açúcar com a idade da planta, independente da variedade, genótipo ou da estirpe bacteriana (MUÑOZ-ROJAS & CABALLERO-MELLADO, 2003).

5.2. PCR em Tempo Real

A análise do DNA genômico das estirpes bacterianas CBAmC de *Nitrospirillum amazonense* (BR11115), Ppe8 de *Burkholderia tropica* (BR11366), PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281), HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504) e HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335), extraído tanto de bactérias originárias de culturas puras e cultivadas em meio líquido como também das películas que se desenvolveram em meio semi-seletivo advindas das contagens, é mostrado nas Figuras 7 e 8. O DNA obtido das culturas puras foi utilizado como controle positivo nas reações de qPCR e Box-PCR para detectar as bactérias nos tecidos da cana-de-açúcar coletada aos 30 DAI.

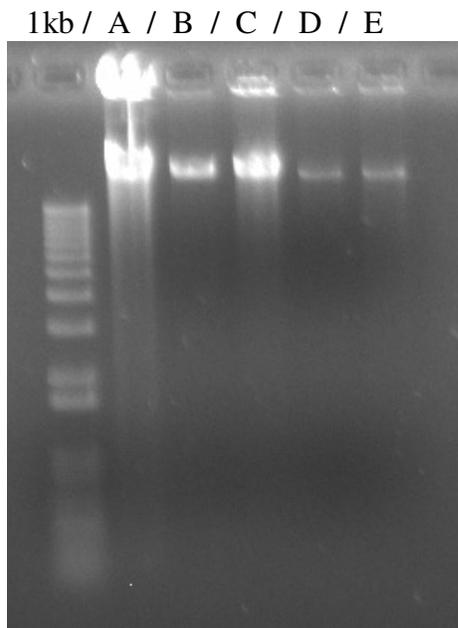


Figura 7. Extração de DNA genômico, submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7%, de A: *H. seropedicae* (HRC54); B: *G. diazotrophicus* (PAL5); C: *H. rubrisubalbicans* (HCC103), D: *P. tropica* (Ppe8) e E: *N. amazonense* (CBAmC).

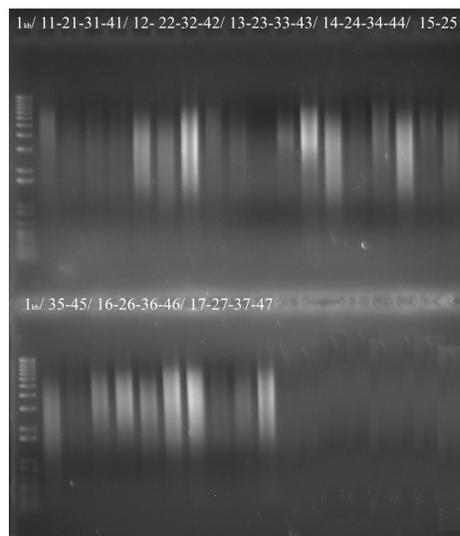


Figura 8. DNA bacteriano extraído de raízes de plantas de cana-de-açúcar coletadas 30 dias após a inoculação individual ou em mistura das 5 estirpes bacterianas presentes no inoculante da Embrapa. Coluna: 1kb (marcador molecular); colunas com os números 11-21-31-41 (tratamento sem inoculação); colunas com os números 12-22-32-42 (tratamento inoculado com Ppe8); colunas com os números 13-23-33-43 (tratamento inoculado com PAL5); colunas com os números 14-24-34-44 (tratamento inoculado com HRC54); colunas com os números 15-25-35-45 (tratamento inoculado com HCC103); colunas com os números 16-26-36-46 (tratamento inoculado com HCC103); colunas com os números 17-27-37-47 (tratamento inoculado com a mistura das cinco estirpes de bactérias).

Com a finalidade de detectar a presença das bactérias inoculadas nos diferentes tratamentos, as amostras de DNA genômico bacteriano extraídos de raízes de cana-de-açúcar foram submetidas à PCR convencional utilizando iniciadores espécie específicos da região 16S rDNA (Quadro 1) conforme sugerido por BOA SORTE e colaboradores (2014). Os iniciadores selecionados permitiram amplificar concentrações de 10 ng de DNA bacteriano nas amostras (Figura 9). A Figura 9 mostra ainda que a maioria das amostras de DNA extraídas de raízes da planta de cana-de-açúcar, apresentaram resultados positivos quanto à amplificação do gene 16S rDNA, ou seja, que a maior parte das amostras apresentou o DNA bacteriano alvo amplificado.

A presença de bandas correspondentes às bactérias presentes no inoculante (*G. diazotrophicus*, *N. amazonense*, *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* e *P. tropica*) em tratamentos não inoculados (Figura 9) não descarta a ideia de que bactérias pertencentes a essas espécies tenham sido adquiridas do ambiente, já que o material (minitoletes) tem sido cultivado ao longo dos anos no campo experimental da Embrapa em áreas comumente plantadas com a cana-de-açúcar, além do que a própria cana se propaga vegetativamente e carrega as bactérias nativas para os cultivos seguintes (REIS et al., 2004). A ocorrência também pode ser devido à colonização de bactérias nas plantas hospedeiras, uma vez que estas bactérias são encontradas em diversas plantas da família *Poaceae* (OLIVARES et al. 1996), tornando possível sua permanência no campo e posterior disseminação para as plantas de cana-de-açúcar. Outra explicação para ocorrência dessas bactérias em plantas não inoculadas é a sua permanência em estágio viável, porém não culturável conforme já sugerido por Olivares e colaboradores (1996).

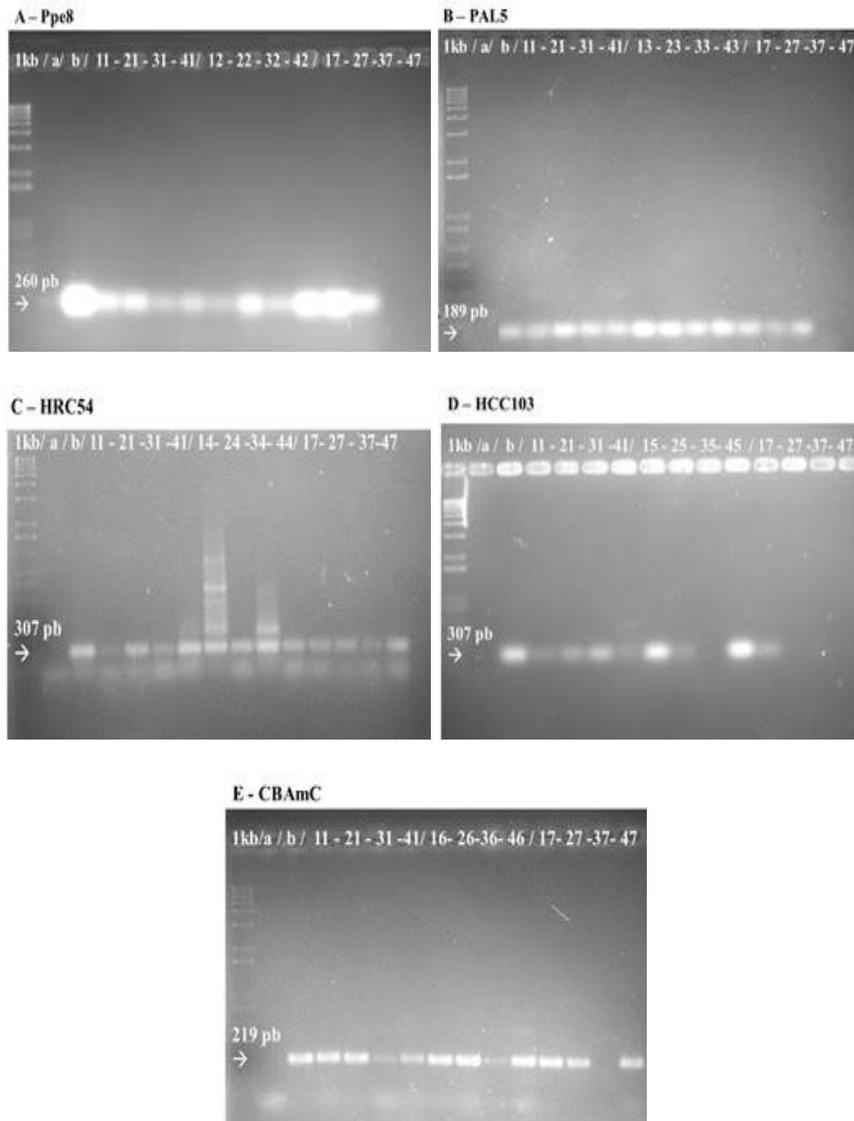


Figura 9. Perfil eletroforético do produto de amplificação dos iniciadores espécie específicos para as estirpes bacterianas. Coluna 1kb - marcador molecular; coluna a: Controle negativo (H_2O livre de DNase e RNase); colunas com os números 11-21-31-41 (tratamento sem inoculação); Figura A: *P. tropica* (Bt2Ppe8f1/Bt2Ppe8f2), colunas com os números 12-22-32-42 (tratamento inoculado com Ppe8); Figura B: *G. diazotrophicus* (GdPAL5f/Gd PAL5r), colunas com os números 13-23-33-43 (tratamento inoculado com PAL5); Figura C: *H. seropedicae* (Hs3HRC54f/Hs3HRC54r), colunas com os números 14-24-34-44 (tratamento inoculado com HRC54); Figura D: *H. rubrisubalbicans* (Hr1HCC103r1/Hr1HCC103f1), colunas com os números 15-25-35-45 (tratamento inoculado com HCC103); Figura E: *N. amazonense* (AaCBAmCF/AaCBAmCR), colunas com os números 16-26-36-46 (tratamento inoculado com CBAmC); colunas com os números 17-27-37-47 (tratamento inoculado com a mistura das 5 estirpes bacterianas), em gel de agarose 2%.

5.2.1. Curva padrão para quantificação absoluta das bactérias inoculadas

A curva padrão foi gerada utilizando os iniciadores GdPAL5f e GdPAL5r, Bt2Ppe8f1 e Bt2Ppe8r1, AaCBAmCF e AaCBAmCR, Hr1HCC103f1 e Hr1CC103r1, Hs4HRC54f2 e Hs4HRC54r2, conforme sugerido por Boa Sorte (2013). As diluições da primeira reação de PCR utilizadas para gerar a curva variaram de 10^2 a 10^8 ng. A regressão linear entre as diluições de DNA e as médias de Ct apresentou um R^2 (coeficiente de regressão) superior a 0,98 para todos os iniciadores. Os valores obtidos dos números de cópias possibilitaram a geração das curvas padrão para número de cópias do 16S rDNA plotando estes valores com os Ct's encontrados para cada espécie microbiana (BOA SORTE et al., 2014).

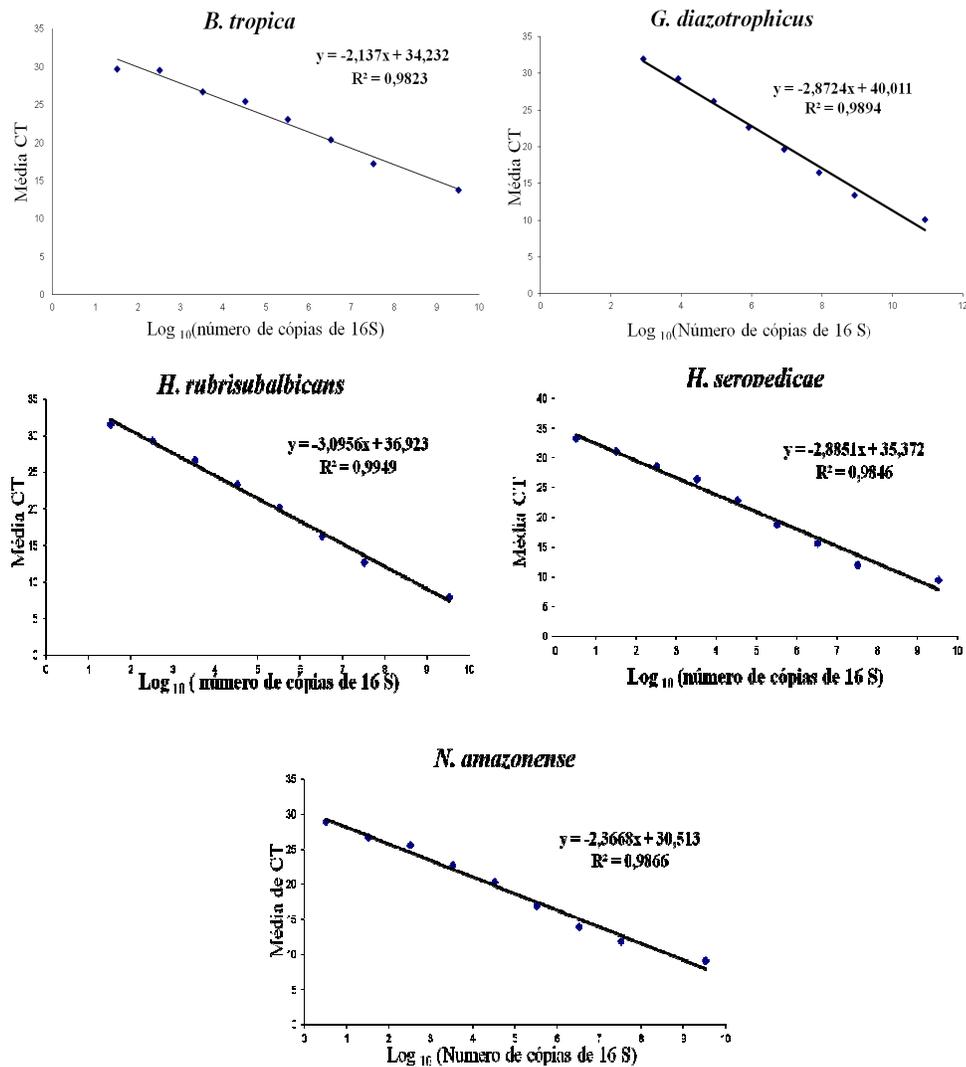


Figura 10. Curva Padrão do número de cópias do iniciador 16S rDNA versus médias de Ct para cada uma das estirpes do inoculante. Foram utilizadas 3 repetições para cada uma das diluições.

5.2.2. Quantificação do número de cópias do gene 16S rDNA de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar por qPCR

O primeiro trabalho descrito na literatura utilizando PCR em tempo real com bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar foi o de Boa Sorte (2013) que quantificou bactérias endofíticas na base de colmos de plantas de cana cultivadas sob condições de campo inoculadas com o inoculante desenvolvido pela Embrapa. O desenho e validação de iniciadores para PCR em tempo real específicos para bactérias diazotróficas endofíticas permitiu a utilização deste método para a quantificação de bactérias presentes no interior dos tecidos dos colmos. Neste trabalho foi utilizada a mesma técnica de qPCR só que aplicada em raízes de cana-de-açúcar com os iniciadores espécie-específicos para cada uma das espécies do inoculante. A quantificação absoluta (número de cópias do gene 16S rDNA) para os produtos de amplificação por PCR em tempo real é apresentada na Figura 11, onde o tratamento de cada estirpe inoculada é sempre comparado com o tratamento não inoculado e o tratamento Mix (mistura das estirpes). Os resultados mostram que houve diferença significativa para a inoculação da estirpe HCC103 já que um menor número de cópias da subunidade 16S rDNA foi observado para as amostras não inoculadas. O número de cópias de 16S rDNA para a estirpe HCC103 também foi maior nas amostras provenientes da inoculação com a Mix (Figura 11A). Em relação à estirpe CBAmC, não foi observada diferença estatística no número de cópias do gene 16S para os tratamentos, embora o controle tenha apresentado um número de cópias inferior em relação aos demais (Figura 11B). Também foi observada diferença estatística entre os três tratamentos para a estirpe Pe8, sendo o número de cópias do gene 16S maior para o tratamento Mix seguida das amostras provenientes com a inoculação individual da própria estirpe (Figura 11C). No caso da estirpe HRC54 não foi observada diferença estatísticas nas amostras inoculadas com a própria estirpe e o Mix, porém diferiu significativamente das amostras não inoculadas (Figura 11D). Já para a estirpe PAL5 houve diferença estatística entre o número de cópias 16S rDNA em relação ao tratamento não inoculado e o tratamento Mix, porém não houve diferença entre o tratamento não inoculado e o tratamento inoculado individualmente com a estirpe PAL5 (Figura 11E). O resultado obtido neste trabalho (entre $10^4 - 10^5$ células de bactérias g^{-1} tecido fresco) para a estirpe PAL5 é comparável ao obtido com Boa Sorte e colaboradores (2014) que detectaram em torno de 10^5 bactérias g^{-1} de tecido fresco, mostrando que a técnica possui uma boa sensibilidade, suficiente para permitir a quantificação de espécies diazotróficas nos tecidos da planta cana de açúcar, mesmo quando a população bacteriana é muito baixa e não detectável por outra técnica. O aumento significativo obtido com o tratamento Mix em relação ao tratamento controle (não inoculado) versus o tratamento inoculado em relação ao tratamento controle (não inoculado) indica que a associação de bactérias pode contribuir para o estabelecimento das estirpes no tecido vegetal entre as outras bactérias nativas que estão presentes. O mesmo se repete para as estirpes HCC103 e Ppe8, onde há também uma diferença significativa entre os tratamentos Mix em relação ao controle e inoculado com a própria estirpe, indicando também que a associação de bactérias pode contribuir para o estabelecimento da bactéria no tecido vegetal entre as outras bactérias nativas que estão presentes.

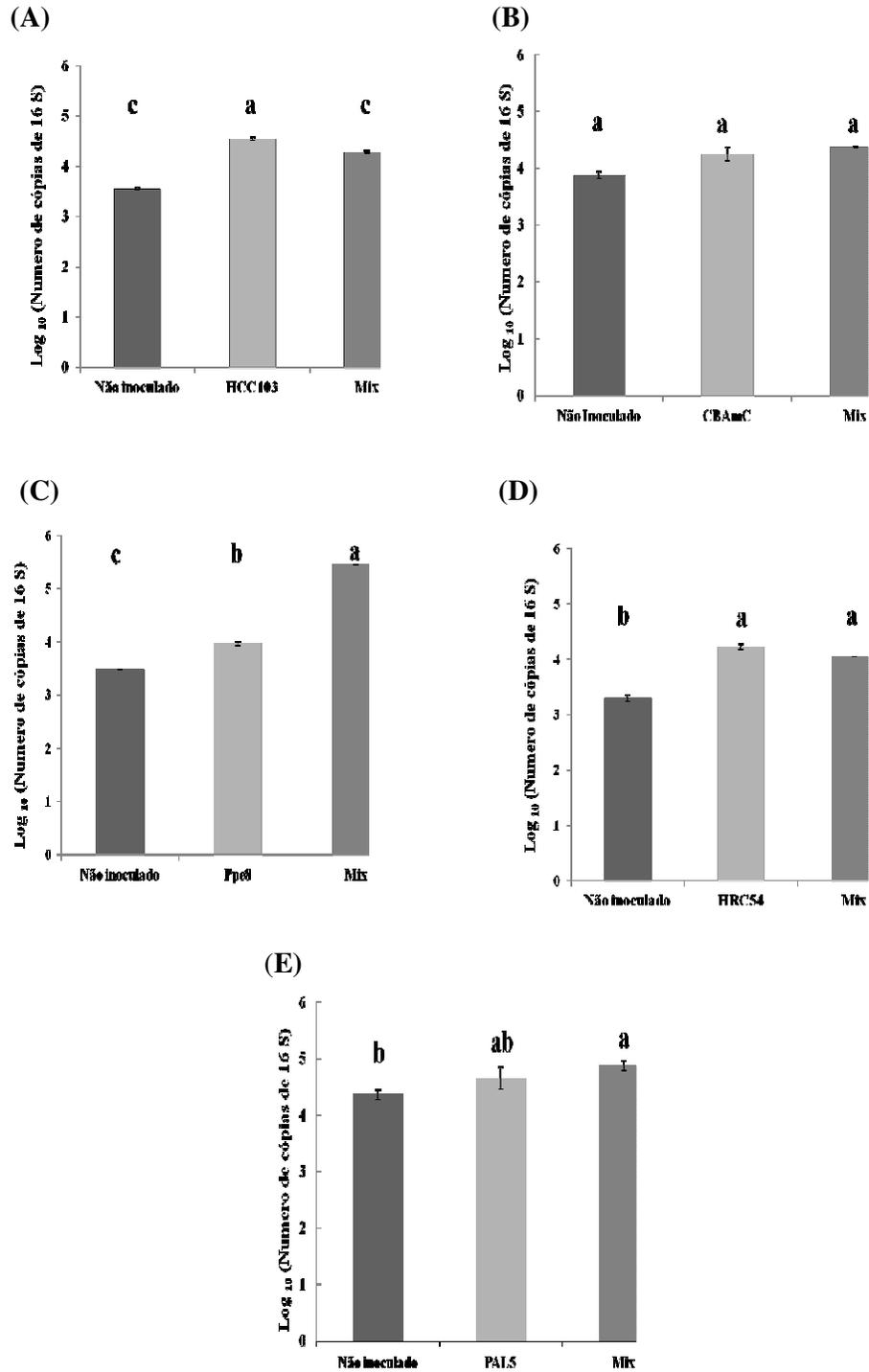


Figura 11. Log_{10} do número de cópias 16S rDNA de bactérias diazotróficas endofíticas, dos tratamentos inoculados comparado com o tratamento não inoculado e o tratamento Mix, obtidas por qPCR aos 30DAI. (A) *H. rubrisubalbican*; (B) *N. amazonense*; (C) *P. tropica*; (D) *H. seropedicae*; (E) *G. diazotrophicus*. Quantificação por reação de qPCR (Teste de Tukey ($p < 5\%$ - Tratamento com letras iguais, não difere estatisticamente entre si)).

Na Figura 12 tem-se o número de cópias do gene 16S rDNA das diferentes estirpes avaliadas com o DNA bacteriano extraído do tratamento não inoculado e do tratamento Mix

(inoculado com as cinco estirpes) utilizando os iniciadores específicos para cada espécie. A análise de variância mostra mais claramente que houve diferença estatística entre todos os tratamentos quando comparado cada estirpe não inoculada com o Mix, sendo o número de cópias do gene 16S rDNA maior no tratamento Mix quando comparada com as amostras não inoculadas. As estirpes Ppe8 e PAL 5 presentes no tratamento Mix apresentaram o maior número de cópias de 16S rDNA, confirmando o que foi indicado anteriormente que a associação de bactérias pode contribuir para o estabelecimento das bactérias no tecido das plantas. Assim estudos realizados por Pereira (2014) mostram a eficiência da técnica de qPCR para detectar e quantificar bactérias diazotróficas da espécie *H. seropedicae* utilizando iniciadores específicos para a cepa SmR1, em plantas de milho inoculadas, obtendo 91% de eficiência e coeficiente de correlação de 0,99, sendo o limite de detecção observado de 101 cópias (correspondendo a 60,3 fg de DNA bacteriano).

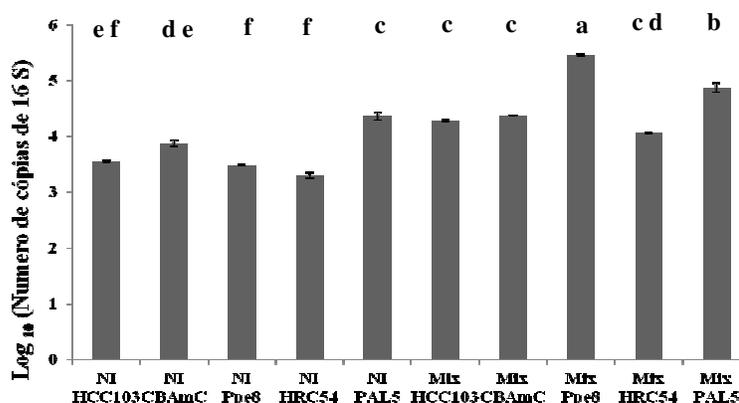


Figura 12. Log₁₀ do número de cópias 16S de bactérias diazotróficas endofíticas, do tratamento não inoculado e o tratamento Mix, obtidas por qPCR aos 30DAI. Quantificação por reação de qPCR. Teste de Tukey (p<5% - Tratamento com letras iguais, não difere estatisticamente entre si).

5.3. Análise de BOX-PCR de DNA Genômico Bacteriano das Películas Formadas em Meios Semissólidos

A comparação do perfil genômico foi realizada levando-se em consideração a presença de bandas das bactérias nas amostras, com tamanho (pb) similar ao do perfil obtido para as amostras de DNA puro das bactérias do inoculante, uma vez que, as amostras advindas das películas das contagens possuem uma alta diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio e também não fixadoras- aquelas consideradas oportunistas e que fazem uso do N fixado pelas bactérias diazotróficas no meio semissólido (ANTUNES, 2016). Os resultados referentes ao perfil eletroforético de bandas para cada película avaliada nos diferentes meios semissólidos está mostrado na Figura 13. Numa análise global pode-se verificar uma elevada diversidade de bandas para cada um dos perfis gerados a partir do DNA extraído de cada película.

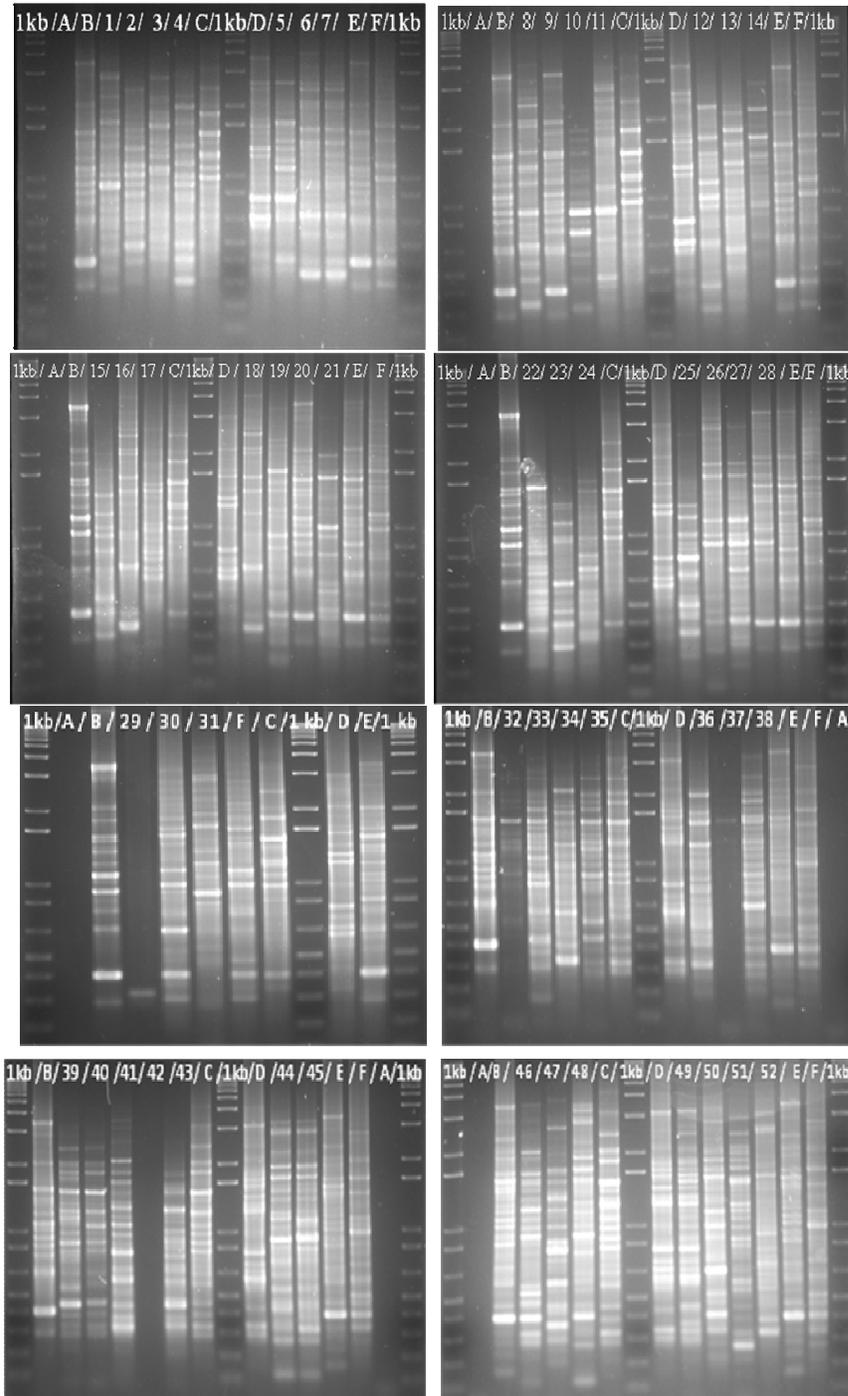


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose (2%) do produto de amplificação do DNA genômico por BOX-PCR das películas crescidas nos diferentes meios semissólidos a partir da inoculação com macerado de raízes dos diferentes tratamentos. A: controle negativo (H₂O livre de DNase e RNase); B: estirpe HRC54; C: Estirpe Ppe8; D: Estirpe PAL5; E: Estirpe HC103; F: Estirpe CBAmC. As colunas de 1 a 52 estão descritas no anexo.

Com base nos dados da Figura 13 foi montado um dendrograma de similaridade, baseado na ausência e presença de bandas, como apresentado na Figura 14. De forma geral, o dendrograma mostra que nenhuma amostra apresentou perfil genômico com 100% de similaridade para as estirpes bacterianas utilizadas na inoculação, ou seja, as 5 estirpes

presentes no inoculante da Embrapa Agrobiologia. Em razão da presença de outras bactérias no DNA na amostra, foi estabelecido como parâmetro da presença da bactéria inoculada um número médio de bandas de mesmo tamanho (pb) compatível com a estirpe pura e que variou de acordo com a quantidade de bandas apresentadas por cada uma das cinco estirpes inoculadas, sendo para a estirpe PAL5 5 bandas, para a estirpe CBAmC 3 bandas, para as estirpes HRC54 e HCC103 4 bandas e para a estirpe Ppe8 6 bandas.

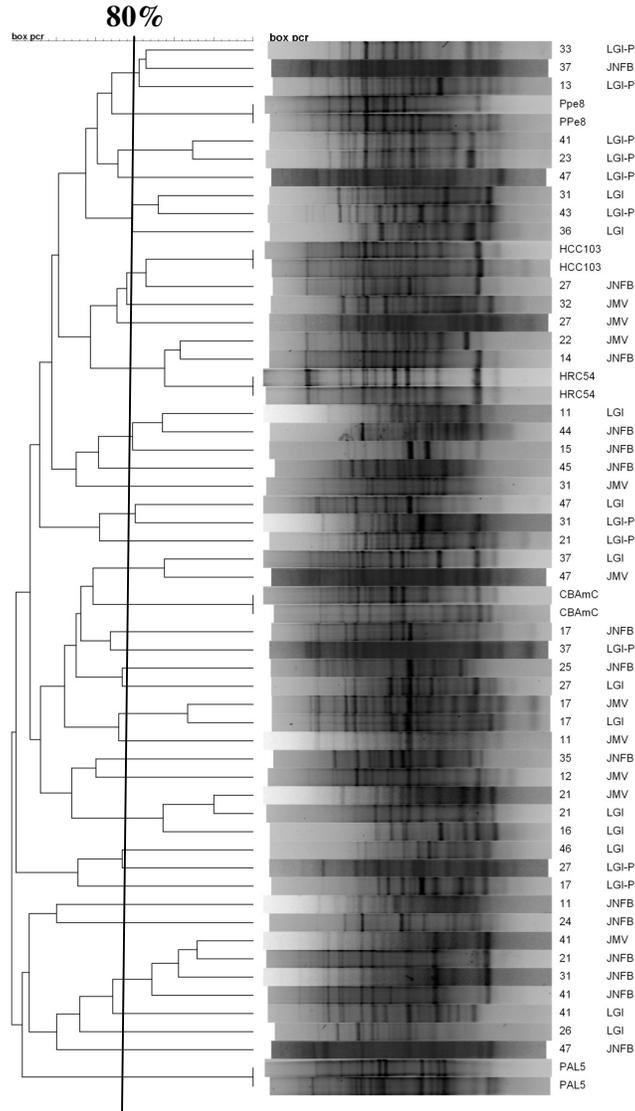


Figura 14. Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de BOX-PCR com o programa Bio-numerics 7.6, seguido do gel de agarose em posição horizontal. Foi analisada a similaridade pelo Coeficiente de Dice. Marcadores contendo as cinco bactérias utilizadas no inoculante e utilizadas como padrão: Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *N. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*. JNFB, LGI, LGI-P e JMV foram os meios de cultura utilizados para coletar as películas. Os números 11-21-31-41 (tratamento sem inoculação); 12-22-32-42 (tratamento inoculado com Ppe8); 13-23-33-43 (tratamento inoculado com PAL5); 14-24-34-44 (tratamento inoculado com HRC54); 15-25-35-45 (tratamento inoculado com HCC103); 16-26-36-46 (tratamento inoculado com CBAmC) 17-27-37-47 (tratamento inoculado com a mistura das cinco estirpes de bactérias).

Em razão da complexidade da análise, optou-se por analisar os dendrogramas por tratamento (Figuras 15 a 19). Cabe salientar que não há relato na literatura sobre o uso da técnica de BOX-PCR para avaliar o estabelecimento da bactéria inoculada a partir de DNA bacteriano extraído de películas. Os trabalhos existentes tratam do uso da técnica para DNA extraído a partir de bactérias puras (ANTUNES, 2016) e não de amostras complexas.

A análise da Figura 15 mostra que nenhum dos perfis gerados a partir do DNA obtido das películas do meio semi-seletivo LGI-P para a estirpe PAL5 apresentou similaridade acima de 80% com a estirpe inoculada PAL5, porém a amostra 11 (não inoculada) apresentou o perfil mais dissimilar (inferior a 40% de similaridade). As amostras 41 (não inoculada) e 23 (inoculada com PAL5) possuem similaridade acima de 80%. As amostras 21 (não inoculada) e as 13, 23, 43 (inoculadas com PAL5) apresentaram cinco bandas com o mesmo tamanho da estirpe PAL5, sugerindo uma possível presença da estirpe PAL5 nas amostras inoculadas, em associação com outras bactérias diazotróficas ou não. Já no caso das amostras 31 e 41 (não inoculadas) e na amostra 33 (inoculada com PAL5), o número de bandas comparativas foi inferior a cinco, sugerindo uma menor probabilidade de presença da estirpe PAL5 na amostra. A presença de bandas em outras alturas reforça a semi-especificidade dos meios de cultura.

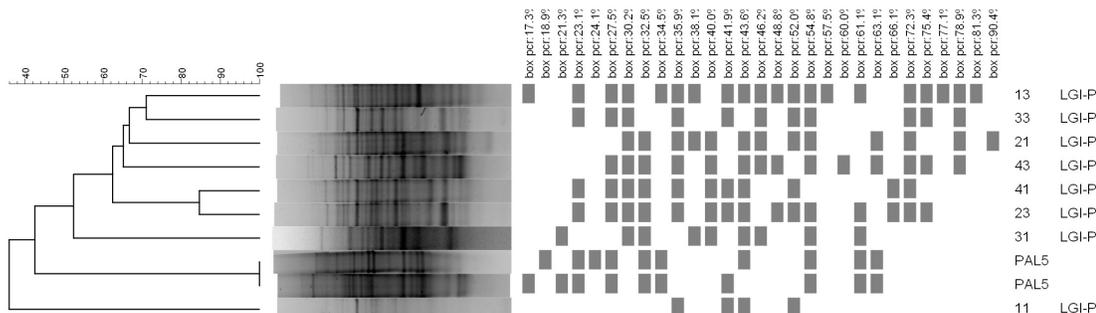


Figura 15. Análise de similaridade com índice de Dice e agrupamento por UPGMA dos tratamentos não inoculados (11, 21, 31, 41) e inoculados com a estirpe PAL5 (13, 23, 33, 43), em meio de cultivo LGI-P.

A análise da Figura 16, referente ao crescimento em meio LGI (semi-seletivo para a estirpe CBAmC), mostra que foram formados dois grupos distintos com similaridade de aproximadamente 50% com a estirpe inoculada CBAmC. A amostra 26 apresentou 40% de similaridade em comparação com o restante das amostras. As amostras 11, 21, 31 (não inoculada) e amostras 16 e 46 (inoculadas com a estirpe CBAmC) apresentaram três bandas com tamanho similar ao da banda da estirpe CBAmC (utilizada como referência), sugerindo uma possível presença da estirpe inoculada nessas amostras. O restante das amostras, 41 (não inoculada), 26 e 36 (inoculada com a estirpe CBAmC) não apresentam o mesmo número de bandas que as amostras acima, sugerindo uma probabilidade baixa de bactéria similar a estirpe CBAmC nessas amostras.

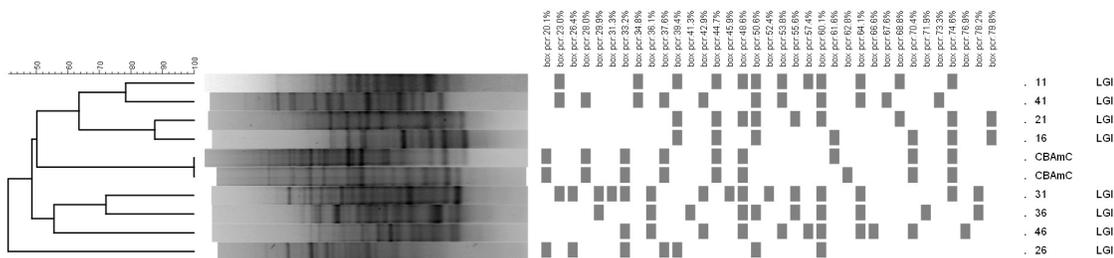


Figura 16. Análise de similaridade com índice de Dice e agrupamento por UPGMA dos tratamentos não inoculados (11, 21, 31, 41) e inoculados com a estirpe CBAmC (16, 26, 36, 46), em meio de cultivo LGI.

O dendrograma apresentado na Figura 17, referente ao DNA bacteriano de películas dos tratamentos crescidos em meio JNFB (estirpes HCC103 e HCR54), mostra agrupamentos próximos com 50% de similaridade entre si para ambas as estirpes. As amostras não inoculadas (11, 21, 31, 41) fazem parte do mesmo subgrupo formado com aproximadamente 50% de similaridade com as duas espécies. A amostra 14 (inoculada com a estirpe HCR54) apresenta 80% de similaridade com a estirpe inoculada em contraste com a amostra 34 (também inoculada com a estirpe HCR54), que não apresentou perfil de bandas bacteriano. As amostras 15, 35 e 45 (inoculadas com HCC103) estão inseridas no mesmo subgrupo da estirpe inoculada com 60% de similaridade. Foi observado em média 4 bandas de mesmo tamanho similar a estirpe inoculada nessas amostras. As amostras 24 e 44 estão inseridas no subgrupo formado com a estirpe HCC103 com 60% de similaridade com a mesma e 50% com a estirpe inoculada. A amostra 25 (inoculada com HCC103) possui 50% de similaridade com as duas estirpes de referência, uma vez que apresentou 2 bandas com mesmo tamanho que as duas estirpes. A amostra, 14 inoculada com a estirpe HCR54, apresentou 80% de similaridade com a estirpe HCR54.

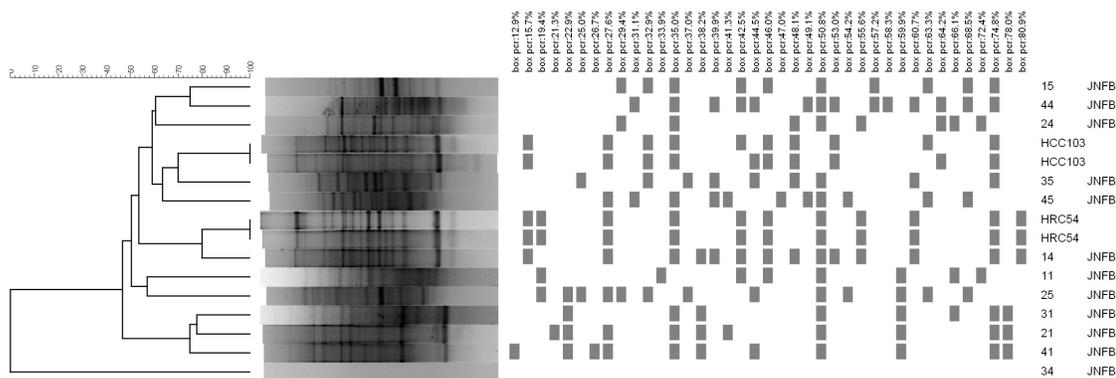


Figura 17. Análise de similaridade com índice de Dice e agrupamento por UPGMA dos tratamentos não inoculados (11, 21, 31, 41) e inoculados com as estirpes HCR54 (14, 24, 34, 44) e HCC103 (15, 25, 35, 45), em meio de cultivo JNFB.

A Figura 18, representada pelo DNA bacteriano da estirpe PPe8 e de DNA de películas formadas no meio JMV, mostrou a formação de 4 agrupamentos. O primeiro formado pelas amostras 11 (não inoculado) e 12 (inoculado com Ppe8) com 50% de similaridade entre si e com aproximadamente 45% de similaridade com a estirpe Ppe8. As amostras 22 (inoculada) e 41 (não inoculada) apresentaram maior número de bandas na mesma posição da estirpe Ppe8 com aproximadamente 60% de similaridade, o que sugere a presença da estirpe na amostra. As amostras 21 e 31 (não inoculada) e 32 (inoculada) apresentaram um baixo grau de similaridade (40%) com a estirpe inoculada enquanto que a amostra 42 não mostrou similaridade com estirpe inoculada.

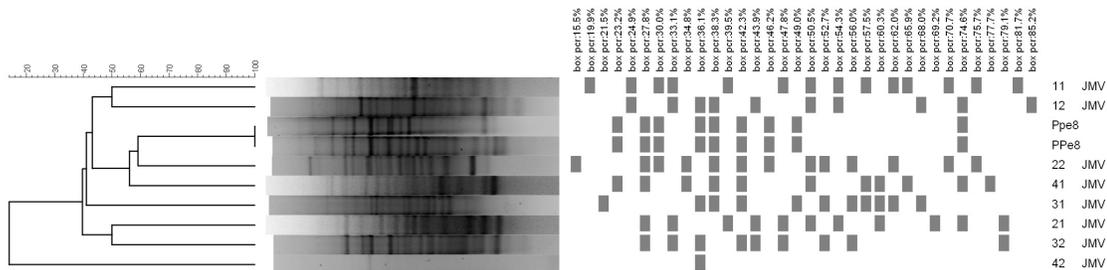


Figura 18. Análise de similaridade com índice de Dice e agrupamento por UPGMA dos tratamentos não inoculados (11, 21, 31, 41) e inoculados com a estirpe Ppe8 (12, 22, 32, 42), em meio de cultivo JMV.

A Figura 19 apresenta o dendrograma da mistura de bactérias (Mix) composta pelas 5 bactérias do inoculante em comparação com o tratamento não inoculado analisados a partir do DNA bacteriano obtidos das películas formadas nos quatro meios de cultivo (JNFB, LGI, LGI-P e JMV). De maneira geral, foi observado a formação de 8 agrupamentos distintos entre si. Nenhuma das amostras analisadas apresentou similaridade acima de 80% com as estirpes inoculadas. Pequenos agrupamentos com grau de similaridade em torno de 70% com as estirpes inoculadas foram formados.

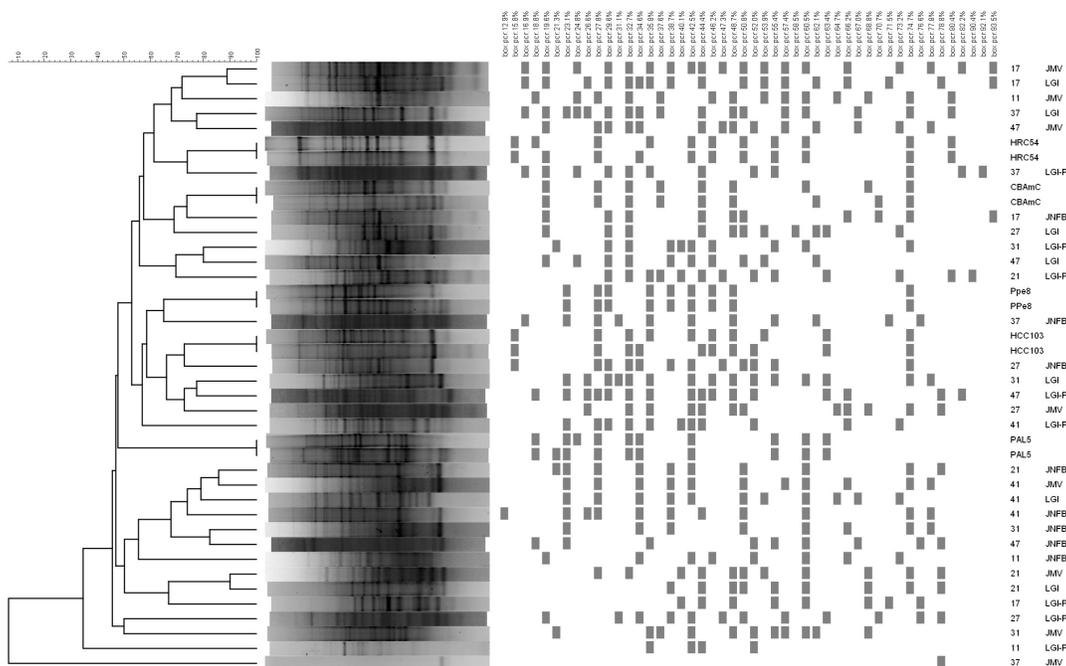


Figura 19. Análise de similaridade com índice de Dice e agrupamento por UPGMA dos tratamentos não inoculados (11, 21, 31, 41) e inoculados com as estirpes (CBAmC, HCC104, HC54, PAL5 e Ppe8), nos meios de cultivo JNFB, JMV, LGI, LGI-P.

A técnica de PCR em Tempo Real é uma ferramenta robusta para a detecção e quantificação do número de cópias de DNA de várias espécies de bactérias em diferentes tipos de amostra (JUNG et al., 2010). Os iniciadores desenhados para detecção das estirpes do inoculante de cana-de-açúcar demonstraram uma alta sensibilidade e especificidade, sendo possível detectar até 5 fg de DNA molde, equivalente a 12 células bacterianas, mesmo com a reação de PCR convencional (BOA SORTE et al., 2014). Os mesmos iniciadores utilizados

neste trabalho se mostram específicos para a detecção das espécies do inoculante e permitiram detectar as estirpes mesmo com a baixa população bacteriana.

A Figura 20 apresenta uma análise comparativa das duas metodologias de quantificação bacteriana utilizadas neste trabalho. O NMP não mostrou diferenças estatísticas significativas em razão do tratamento não inoculado apresentar uma alta diversidade no perfil das bandas (BOX-PCR) o que pode ter contribuído para o baixo estabelecimento das estirpes inoculadas (NMP). A técnica de qPCR por ser mais sensível, permitiu a quantificação das espécies diazotróficas endofíticas que colonizam os tecidos vegetais de cana-de-açúcar, mesmo quando a população bacteriana é muito baixa e que não pode ser detectado pelo método dependente de cultivo. A mesma serviu também como evidência de que as bactérias inoculadas no tratamento Mix podem ser diferenciadas dentro do tratamento mesmo quando em níveis tão baixos. Por outro lado, o BOX-PCR não permitiu indicar similaridade acima de 80% das estirpes inoculadas com os perfis das estirpes controles, porém esta análise semi-quantitativa, sugere que nas amostras em que as bactérias inoculadas apresentam um maior número de bandas semelhantes ao DNA da bactéria pura, podem estar presentes nos resultados obtidos por BOX-PCR. A grande diversidade de bactérias no perfil das bandas por BOX-PCR do tratamento não inoculado pode ter contribuído para a detecção de baixos números das estirpes inoculadas pelo qPCR, assim como também observado pela técnica do NMP.

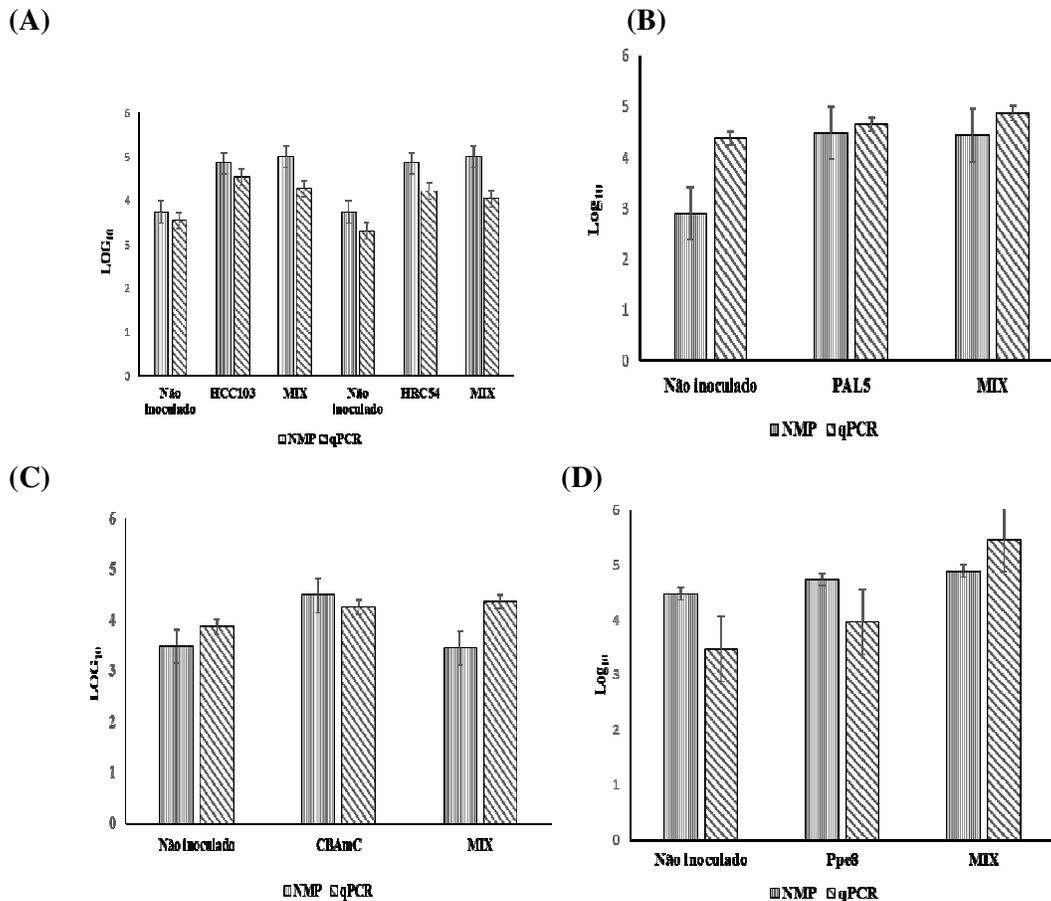


Figura 20. Comparação das técnicas NMP e qPCR, dos tratamentos não inoculados com os inoculados e Mix. (A) *H. rubrisubalbican* e *H. seropedicae*; (B) *G. diazotrophicus*; (C) *N. amazonense*; (D) *P. tropica*.

6. CONCLUSÃO

- A técnica do NMP mostrou que os tratamentos inoculados apresentaram uma maior população de células bacterianas em torno de 10^5 células por massa fresca de raiz, porém não significativa, em relação ao tratamento não inoculado, para todos os tratamentos.
- A metodologia de qPCR mostrou diferença significativa no número de cópias do 16S rDNA, da ordem de 10^5 células bacterianas g^{-1} massa fresca de raiz para algumas estirpes inoculadas em relação ao tratamento controle.
- Os perfis obtidos por BOX-PCR das películas formadas nos respectivos meios semissólidos não mostraram alta similaridade (>80%) com o perfil das espécies inoculadas para a maioria dos tratamentos inoculados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de bactérias competitivas, tolerantes a condições de estresse e eficientes na fixação do nitrogênio têm promovido redução de custos, aumento da produtividade e benefícios ao meio ambiente. Neste contexto, identificar os fatores que conferem tais qualidades a determinadas estirpes de bactérias endofíticas é necessário para o melhor entendimento e o aproveitamento do processo de fixação do nitrogênio.

NMP e qPCR são técnicas robustas e adequadas para a quantificação de bactérias em diferentes amostras, e neste trabalho permitiu detectar concentrações dessas bactérias da ordem de 10^5 células g^{-1} em cana-de-açúcar inoculadas com as bactérias diazotróficas endofíticas. Além disso, permitiu estimar o estabelecimento das bactérias nos tecidos da planta. A utilização da técnica de BOX-PCR, usada para agrupamentos filogenéticos de estirpes, não permitiu estabelecer com precisão a qual estirpe pertence o DNA bacteriano extraído das películas e, portanto, deve ser aprimorada. A aplicação da técnica é inédita para determinação do perfil da comunidade presente nos meios de cultivo semissólidos uma vez que a literatura mostra somente o uso da mesma a partir de bactérias isoladas (puras) de diferentes ambientes. É possível que o sequenciamento das bandas comuns nos géis permita comprovar a presença das estirpes inoculadas, a partir de iniciadores desenhados dessas bandas comuns dos DNAs das estirpes do inoculante. Por outro lado, estudos de monitoramento do estabelecimento das estirpes inoculadas, envolvendo as três técnicas, devem ser realizados ao longo do ciclo da cultura de cana-de-açúcar uma vez que a população das bactérias diazotróficas flutua com a idade e época de coleta.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDICOTT, F. F.; LYON, J. L. Physiology of abscisic acid and related substances. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 20, p. 139 - 164, 1969.

ANTUNES, J. E. L. Bactérias diazotrófica endofíticas em cana-de-açúcar: estratégia para uma agricultura sustentável. Recife, PE. 2016. 154 p. Tese de Doutorado - Universidade Federal Rural de Pernambuco.

ASHBOLT, N. J.; INKERMAN, P. A. Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealybug, *Saccharococcus sacchari*, and its environments. **Applied Environmental Microbiology**, Amsterdam, v. 56, p. 707 - 712, 1990.

AZEREDO, D. F., BOLSANELLO, J., WEBER, M., VIEIRA, J. R. Nitrogênio em cana-planta, doses e fracionamento. **STAB**, Piracicaba, v. 4, n. 5, p. 26 - 32, 1986.

AZEVEDO, M. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; HARTMANN, A.; BALDANI, J. I. Influence of soil and host plant crop on the genetic diversity of *Azospirillum amazonense* isolates. **Pedobiologia**, Amsterdam, v. 49, p. 565 - 576, 2005.

BALDANI, J. I. Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz. Seropédica, RJ, 1984. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

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, **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, D. C., v. 36, n. 1, p. 86 - 93, 1986.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Netherlands, v. 13, n. 1 - 3, p. 65 - 73, 1992.

BALDANI, V. L. D. Efeito de inoculação de *Herbaspirillum spp.* no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Seropédica, RJ, 1995. 236 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

BALDANI, J. I., POT, B., KIRCHHOF, G., FALSEN, E., BALDANI, V. L. D., OLIVARES, F. L., DÖBEREINER, J. Emended Description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a Mild Plant Pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov. and Classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* Species 3, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 46, n. 3, p. 802 - 810, 1996.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants, **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v.29, n. 5/6, p. 911 - 922, 1997.

BALDANI, J. I.; SANTOS, K. R.; SCHUWAB, S. Fixação biológica de nitrogênio da família Poaceae (antiga Gramineae). **Tópicos em Ciências do Solo**, Viçosa, v. 6, p. 203 - 271, 2009.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists, **Plant and Soil**, Netherlands, v. 384, p. 413 - 431, 2014.

BALSANELLI, E.; SERRATO, R. V.; DE BAURA, V. A.; SASSAKI, G.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; MONTEIRO, R. A. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 12, n 8, p. 2233 - 2244, 2010.

BARASSI, C. A.; SUELDO, R. J.; CREUS, C. M.; CARROZZI, L. E.; CASANOVAS, E. M.; PEREYRA, M. A. *Azospirillum spp.*, a dynamic soil bacterium favourable to vegetable crop production. **Dynamic Soil, Dynamic Plant**, Ikenobe, v. 1, n. 2, p. 68 - 82, 2007.

BASHAN, Y.; HOLGUIM, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103 - 121, 1997.

BASHAN, Y. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton and wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 168 - 174, 1998.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 80, n. 2, p. 199 - 209, 2008.

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 409 - 413, 2000.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 6, p. 508 - 509, 2001.

BELLONE, C. H.; BELLONE, S. D. V. C.; PEDRAZA, R. O.; MONZÓN, M. A. Cell colonization and infection thread formation in sugarcane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 29, p. 965 - 967, 1997.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 84, p. 11 - 18, 2009.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; DE PADUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANCA, L.; MAGALHAES, V.; ALQUERES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M. NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMAO, T.; MACEDO, J.; VALADAO, A.; DRECHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; DE SOUZA FILHO, G.;

FLORES, V. M. Q.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; ROSSLE, S. C.; URMENYI, T.; PEREIRA, R. A.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; VON KRUGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P. C. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 1 - 17, 2010.

BOA SORTE, P. M. F. Estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar cultivada em duas regiões do Brasil. Seropédica, RJ, 2013. 107 p. Tese de Doutorado. (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

BOA SORTE, P. M. F.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; MELO, L. H. V.; GALISA, P. S.; LEAL, L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Development of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane grown under fields conditions, **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 8, n. 31, p. 2937 - 2946, 2014.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, The Hague, v. 174, p. 195 - 209, 1995.

BODDEY, R. M.; XAVIER, D.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Brazilian agriculture: the transition to sustainability. **Journal of Crop Production**, Philadelphia, v. 9, p. 593 - 621, 2003.

BOIERO, L.; PERRIG, D.; MASCIARELLI, O.; PENA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Phytohormone production by strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications, **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 74, p. 874 - 880, 2007.

BOTHE, H.; FERGUSON, S. J.; NEWTON, W. E. Eds. **The Biology of the Nitrogen Cycle**. Amsterdam, Elsevier, 2007.

BRASIL. 2014a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Anuário Estatístico da Agroenergia. 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em: 04 ag 2016.

BRASIL. 2014b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Decreto nº 9.384/2014, de 29 de dezembro de 2014. Altera o anexo ao Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004, que aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, 65 inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2014/Decreto/D8384.htm#art1. Acesso em: 08 ag. 2016.

CABALLERO-MELLADO, J., MARTÍNEZ-AGUILAR, L., PAREDES-VALDEZ, G., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric

and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 54, n. 4, p. 1165 - 1172, 2004.

CABALLERO-MELLADO, J., ONOFRE-LEMUS, J., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., MARTÍNEZ-AGUILAR, L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing Burkholderia species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 73, n. 16, p. 5308 - 5319, 2007.

CAVALCANTE, V.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitro-gen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, p. 23 - 31, 1988.

CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Sugarcane Genetic, **Tropical Plant Biology**, Berlin, v. 4, p. 31 - 41, 2011.

COCHRAN, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the most probable number. **Biometrics**, Arlington, v. 6, p. 105 - 116, 1950.

COHEN, A. C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* Sp245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 54, p. 97 - 103, 2008.

COMPANT, S., NOWAK, J., COENYE, T., CLÉMENT, C., BARKA, E. A. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 607 - 626, 2008.

COMPANT, S.; CLÉMENT, S.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 669 - 678, 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento, *Acompanhamento Nacional da Safra de Cana-de-Açúcar*, v. 2, Safra 2015 – Terceiro Levantamento, dezembro, 2015. Disponível em: <<http://www.conabe.gov.br>>. Acesso em: 04 ag 2016.

CONCEIÇÃO, P. M.; VIEIRA, H. D.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; CONCEIÇÃO, P. S. Efeito dos ácidos húmicos na inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em sementes de milho, **Ciência Rural on line**, Santa Maria, 2009.

CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. **Planta**, Berlin, v. 218, p. 900 - 905, 2004.

COSTA, E. M.; CARVALHO, F.; ESTEVES, J. A. NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. Resposta da soja à inoculação e co-inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal e Bradyrhizobium. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, p. 1678 - 1689, 2014.

CRUZ, L. M., DE SOUZA, E. M., WEBER, O. B., BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J., DE OLIVEIRA PEDROSA, F. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 67, n. 5, p. 2375 - 2379, 2001.

- DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 58, n. 7, p. 2180 - 2187, 1992.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 44, p. 310 - 313, 1992.
- DÖBEREINER, J. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. *In: Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Alef, K; Nannipieri, P. Eds. Academic Press, London, p. 134 - 141, 1995.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí, RJ. **EMBRAPA-CNPAB**, Brasília, 60 p. 1995.
- DONG, Z.; CANNY, M. J.; McCULLY, M. E.; ROBOREDO, R. R.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A Nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: a new role for the apoplast. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 105, p. 1139 - 1147, 1994.
- DUTTA, D.; GACHHUI, R. Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 56, p. 1899 - 1903, 2006.
- ENYEDI, A.J.; YALPANI, N.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. **The Cell**, Amsterdam, v. 70, p. 879 - 886, 1992.
- FALK, E. C.; DÖBEREINER, J.; JOHNSON, J. L.; KRIEG, N. R. Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* and emendation of the description of the genus *Azospirillum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 35, n. 1, p. 117 - 118, 1985.
- FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais, **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 68 - 74, 1994.
- FREITAS, R. P. **Bactérias diazotróficas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. Campinas, SP, 2009, 81 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agronômico Campinas.
- FUENTES-RAMIREZ, L. E.; SALGADO, T. J.; ABARCA-OCAMPO, L R., CABALLERO-MELIADO, J. Auxin production by *Acetobacter diazotrophicus*, an indol-acetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, The Hague, v. 154, p. 145 - 150, 1993.
- GALLI, F.; CARVALHO, P. C. T.; TOKESHI, H.; BALMER, F.; KIMATI, H.; CARDOSO, C. O.; SALGADO, C. L.; KRUGNER, T. L.; CARDOSO, E. J. B. N.; BERGAMIN, F. A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**, vol. 2. São Paulo: Agronomica, Ceres, 1980.

GARCES, F. F.; GUTIERREZ, A.; HOY, J. W. Detection and quantification of *Xanthomonas albilineans* by qPCR and potential characterization of sugarcane resistance to leaf scald. **Plant Disease**, Neherlands, v. 98, n. 1, p. 121 - 126, 2014.

GARCIA DE SALAMONE, I. E.; FUNES, J. M.; DI SALVO, L. P.; ESCOBAR-ORTEGA, J. S.; D'AURIA, F.; FERRANDO, L.; FERNANDEZ-SCAVINO, A. Inoculation of paddy rice with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact of plant genotypes on rhizosphere microbial communities and field crop production. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 61, p. 196 - 204, 2012.

GARRITY, G. M. (Ed) **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 2^a Ed, v. 2, parte C. Springer, 2005.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J.; LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. Nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, London, v. 39, p. 361 - 364, 1989.

GILLIS, M.; VAN VAN, T.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 45, n. 2, p. 274 - 289, 1995.

GLICK, B. R.; BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 353 - 378, 1997.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30 - 39, 2014.

GRIFFITHS, R. I., WHITELEY, A. S., O'DONNELL, A. G., BAILEY, M. J. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D. C., v. 66, n. 12, p. 5488 - 5491, 2000.

GOMES, A. A.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1105 - 1113, 2005.

GUPTA, G.; PANWAR, N. J. Natural occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*, a dominant cultivable diazotrophic endophytic bacterium colonizing *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 252 - 261, 2013.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895 - 914, 1997.

- HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v.16, n. 10, p. 463 - 471, 2008.
- HARTMANN, A.; FU, H.; BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum spp.* **Journal of Bacteriology**, Washington, D. C., v. 165, p. 864 - 870, 1986.
- HARTMANN, A.; ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. **Azospirillum/Plant Associations**, p. 15 - 39, 1994.
- HE, S. Y. Elicitation of plant hypersensitive response by bacteria. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 112, p. 865 - 869, 1996.
- HEID, C. A.; S. J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, New York, v. 6, p. 986 - 994, 1996.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology Nature Publishing Company**, v. 11, p. 1026 - 1030, 1993.
- HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation, **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2965 - 2982, 1996.
- HULTON, C. S. J.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 825 - 834, 1991.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M.; KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington D.C., v. 176, p. 1913 - 1923, 1994.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function, **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 1, p. 29 - 54, 1998.
- JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, p. 757 - 766, 1994.
- JAMES, E. K., OLIVARES, F. L., BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J. Herbaspirillum, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 785 - 798, 1997.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. Critical review, **Plant Science**, Boca Raton, v. 17, p. 77 - 119, 1998.
- JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 3854, p. 1 - 13, 2000.

- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS JR., F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 52, n. 357, p. 747 - 760, 2001.
- JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L. E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPERANZA, A. M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional systems in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 210 - 220, 2006.
- JUNG, M. Y.; CHANG, Y. H.; KIM, W. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Lactococcus garvieae*. **Journal Applied Microbiology**, v. 108, p. 1694 - 1701, 2010.
- KIRCHHOF, G., ECKERT, B., STOFFELS, M., BALDANI, J. I., REIS, V. M., HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 51, n. 1, p. 157 - 168, 2001.
- KLOEPPER, J. W. Host specificity in microbe-microbe interactions. **BioScience**, Washington, D.C., v. 46, p. 406 - 409, 1996.
- KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S.; ZEHNDER, G. W.; WEI, G. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance - historical precedence. **Phytopathology**, St. Paul, v. 87, p. 136 - 137, 1997.
- KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, New York, v. 5, n. 4, p. 408 - 418, 1995.
- LANGE, A.; MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, p. 529 - 533, 2002.
- LI, R. P.; MACRAE, I. C. Specific associations of diazotrophic acetobacter with sugarcane. **Soil Biology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 23, n. 10, p. 999 - 1002, 1991.
- LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using the ¹⁵N aided nitrogen balance, **Soil Biology Biochemistry**, Amsterdam, v. 19, p. 165 - 170, 1987.
- LIN, S. Y.; HAMEED, A.; SHEN, F. T.; LIU, Y. C.; HSU, Y. H.; SHAHINA, M.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 1149 - 1162, 2014.

- LINDERMANN, W. C.; GLOVER, C. R. Nitrogen fixation by legumes. **Cooperative Extension Service – College of Agriculture and Home Economics**. Guide A – 129, may, 4p, 2003.
- LOMBARDO, M. C.; GRAZIANO, M.; POLACCO, J. C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. **Plant Signalling and Behavior**, Bethesda, v. 1, p. 28 - 33, 2006.
- LUVIZOTTO, D. M. Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia ssp.* associada a raízes de cana-de-açúcar. Piracicaba, SP. 2008. 94 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- McCRADY, M.H. The numerical interpretation of fermentation-tubes results. **Journal of Infection Disease**, Illinois, v.17, p.183 - 212, 1915.
- MACKAY, I. M.; MACKAY, J. F.; NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. P. **Real-time PCR: History and Fluorogenic Chemistries** in Mackay, p. 1-40, I. M. (Ed.), **Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization**. Caister Academic Press Norfolk, UK, 2007.
- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; HARI, K.; SARAVANAN, U. S.; SA, T. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, n. 2, p. 143 - 154, 2006.
- MAHESHKUMAR, K. S., KRISHNARAJ, P. U., ALAGAWADI, A. R., Mineral phosphate solubilizing activity of *Acetobacter diazotrophicus*: a bacterium associated with sugarcane. **Current Science**, V. 76, p. 874 - 875, 1999.
- MAGALHÃES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 417 - 430, 1983.
- MAGALHÃES, F. M. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, v. 15, p. 246 - 252, 1984.
- MAGALHÃES CRUZ, L. M.; DE SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; DE OLIVEIRA PEDROSA, F. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 67, n. 5, p. 2375 - 2379, 2001.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas**. 2. Ed. Piracicaba: POTAFOS, 319 p. 1997.
- MARQUES JÚNIOR, R. B.; CANELLAS, L. P.; DA SILVA, L. G.; OLIVARES, F. L. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1121 - 1128, 2008.

MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D. A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERY, J. P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 3479 - 3483, 1992.

MARTÍNEZ-AGUILAR, L., DÍAZ, R., PEÑA-CABRIALES, J. J., ESTRADA-DE LOS SANTOS, P., DUNN, M. F., CABALLERO-MELLADO, J. Multichromosomal genome structure and confirmation of diazotrophy in novel plant-associated Burkholderia species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 74, n. 14, p. 4574 - 4579, 2008.

MARTINEZ-FLEITES, C.; ORTIZ-LOMBARDIA, M.; PONA, T.; TARBOURIECH, N.; TAYLOR, E. J.; ARRIETA, J. G.; DAVIES, G. J. Crystal structure of levansucrase from gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 390, p. 19 - 27, 2005.

MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Effect of wild-type and mutant plant growth promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. **Journal of Plant Growth Regulation**, Berlin, v. 18, p. 49 - 53, 1999.

MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing Acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 63, p. 3676 - 3683, 1997.

MENNA, P.; PEREIRA, A. A.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTINEZ-ROMERO, E. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, Netherlands, v. 48, p. 120 - 130, 2009.

MERRICK, M. J.; EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 59, p. 604 - 622, 1995.

MEHTA, A.; GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. Classificação das bactérias fitopatogênicas utilizando técnicas baseadas em DNA. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (ed.). Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUCS, p. 133 - 163, 2002.

MONTEIRO, R. A., BALSANELLI, E., WASSEM, R., MARIN, A. M., BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C., SCHMIDT, M. A., PEDROSA, F. O. Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, The Hague, v. 35, n. 1 - 2, p. 175 - 196, 2012.

MONZÓN DE ASCONEGUI, M. A.; SIROLI, N. S. Presencia de *Azospirillum amazonense* y micorrizas vesículoarbusculares en rizósfera de gramíneas de Corrientes (Argentina). In: CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA, 4., Buenos Aires, 1985. (Resumen, A49)

MOROZKINA, E. V.; ZVYAGILSKAYA, R. A. Nitrate reductases: Structure, functions, and effect of stress factors, **Biochemistry**, Washington D. C., v. 72, n. 10, p. 1151 - 1160, 2007.

MUÑOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Glucanobacter diazotrophic* in sugar cane cultivars and its effect on plant growth. **Microbiology Ecology**, v. 46, p. 454 - 464, 2003.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Diazotrophic Associations in sugar cane cultivation in south India. **Tropical Agriculture**, Surrey, v. 76, p. 171 - 178, 1999.

MUTHUKUMARASAMY, R., CLEENWERCK, I., REVATHI, G., VADIVELU, M., JANSSENS, D., HOSTE, B.; CABALLERO-MELLADO, J. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 277 - 286, 2005.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum spp.* from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility Soils**, v. 2, p. 7 - 14, 2006.

NJOLOMA, J.; TANAKA, K.; SHIMIZU, T.; NISHIGUCHI, T.; ZAKRIA, M.; AKASHI, R.; OOTA, M.; AKAO, S. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum sp.* B501 gfp1. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 43, n. 2, p. 137 - 143, 2006.

NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H. P.; VARGAS, C.; DE PÁDUA, V. L. M.; DA SILVA, F. R.; SANTOS, R. V.; BALDANI, J. I.; CAVALCANTI, P. G. F.; HEMERLY, A. S. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 24, n. 24, p. 199 - 206, 2001.

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

OLIVARES, F. L. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.* Híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. Seropédica, RJ. 1997. 341 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection on mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by the endophytic diazotrophic *Herbaspirillum*. **New Phytology**, v. 135, p. 723 - 737, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 242, n. 205 - 215, 2002.

OLIVEIRA, A. L. M. Inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em duas variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob condições de campo. Seropédica, RJ. 2003. 124p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 284, p. 23 - 32, 2006.

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, Amsterdam, v. 45, p. 106 - 113, 2009.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. Aveiro, Portugal. 2010. 111p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Aveiro.

OLIVEIRA, C. A., Estimativas de fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar por δ **15N**. Campinas, SP. 2012. 92p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Agronômico de Campinas.

OREN, A.; GARRITY, G. M. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 64, p. 2927 - 929, 2014.

OREN, A.; GARRITY, G. M. List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 65, p. 2017 - 2025, 2015.

PAULA, M. A.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* and *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), Sugarcane (*Saccharum* spp.), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 11, n. 2, p. 111 - 115, 1991.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 207 - 220, 1996.

PEREIRA, T. P. Interação entre a bactéria promotora de crescimento vegetal *Herbaspirillum seropedicae* cepa SmR1 e plantas de milho inoculadas: quantificação de DNA bacteriano por qPCR. Florianópolis, SC, 2014. 103 p. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina.

PERIN, L. **Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. Seropédica, RJ. 2003. 63 p. Dissertação. (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 8, p. 763 - 770, 2004.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; ESTRADA-De LOS SANTOS, P.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 56, p. 1931 - 1937, 2006.

PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F. L.; PITARD, R. M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 137, p. 61 - 65, 1991.

PRIYA, P. R.; ANTONY, R. S.; GOPALASWAMY, G.; BALACHANDAR, D. Development of sequence-characterized amplified region (SCAR) markers as a quality standard of inoculants based on *Azospirillum*. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 3, p. 257 - 267, 2016.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indolacético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 10, p. 997 - 1004, 2005.

RAMOS, A. P. S.; FARIAS, A. R. B.; BARBOSA, M. V.; BARROS, M. C. S.; COSTA, D. P. P.; LIRA-CADETE, L.; SILVA, M. O.; FREIRE, F. J.; ANDREOTE, F. D.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Influência do genótipo e fase fenológica de cana-de-açúcar sobre bactérias endofíticas produtoras de ácido indolacético, *In* 56° CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 2010, Guarujá, São Paulo *Anais...* www.sbg.org.br - ISBN 978-85-89109-06-2, p. 80. 20q0.

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

REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter Diazorophic* and confirmation of it endophitic habitat. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 401 - 405, 1994.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS JUNIOR, F. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugarcane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 206, p. 205 - 211, 1999.

REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYIN, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHIMID, 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**, Reading, UK, v. 54, p. 2155 - 2162, 2004.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. Recommendation of a mixture of five nitrogen-fixing bacteria for sugarcane inoculation: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 113435), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366). Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**: Technical circular n. 30, 2009.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. D. S. Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agriculture. **Journal of Basic Microbiology**, Oxford, v. 55, n. 8, p. 931 - 949, 2015.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 5, p. 985 - 994, 2000.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria spp.*, em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 1, p. 103 - 113, 2004.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA J. R. V. A.; VICTOT, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* TIPO B. **Suma Phytopathologica**, São Paulo, v. 12, p. 16, 1986.

RODRIGUES, E. P.; RODRIGUES, L. S., DE OLIVEIRA; A. L. M., BALDANI, V. L. D.; DOS SANTOS TEIXEIRA, K. R. URQUIAGA, S.; REIS, V. M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and soil**, The Hague, v. 302, n. 1 - 2, p. 249 - 261, 2008.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, L. Y.; CHUBATSU, M. YATES, L. S. G.; RIGO, M. B. U.; STEFFENS, E. M.; SOUZA, R. Endophytic Herbaspirillum seropedicae expresses nif genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 39 - 47, 2003.

ROSSI, C. C.; PEREIRA, M. F.; LANGFORD, P. R.; BAZZOLLI, D. M. A BOX-SCAR fragment for the identification of Actinobacillus pleuropneumoniae. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 352, n. 1, p. 32 - 37, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Detection of DNA in agarose gels. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3^a ed., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, p. 5 - 14, 2001.

SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H.; VICTORIA, R. L.; TRIVELIN, P. C. Redistribution of the nitrogen reserves of 15N-enriched stem cuttings and dinitrogen fixed by 90-day-old sugarcane plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, p. 275 - 279, 1988.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA; R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus Burkholderia: proposal for division of this genus into the emended genus Burkholderia containing pathogenic organisms and a new genus Paraburkholderia gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 5, p. 429, 2014.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JR, J. B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 2, p. 261 - 268, 2012.

SCHULTZ, N. J.; SILVA, J. A.; SOUZA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, A. A.; PEREIRA, W.; SILVA, A. F.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S. Inoculação de Bactérias diazotróficas na cultura de cana-de-açúcar, **Revista Brasileira de Ciência do Solo on line**, Viçosa, v. 38, n. 2, Viçosa Mar./Apr., 2014.

SEVILLA, M.; DE OLIVEIRA, A.; BALDANI, J. I.; KENNEDY, C. Contributions of the bacterial endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition: a preliminary study. **Symbiosis**, Netherlands, v. 25, p. 181 - 191, 1998.

SILVA, M. F. Uso de Inoculante Polimérico contendo Bactérias Diazotróficas na Cultura da Cana-de-açúcar. Seropédica, RJ, 2009. 80p. Dissertação. (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

STEFFAN, R. J.; ATLAS, R. M. Polymerase chain reaction: Applications in environmental microbiology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 45, p. 137 - 161, 1991.

STERN, M. J.; AMES, G. F. L.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v. 37, n. 3, p. 1015 - 1026, 1984.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 35, p. 235 - 270, 1997.

TAYLOR, I. B.; SONNEVELD, T.; BUGG, T. D. H.; THOMPSON, A. J. Regulation and manipulation of the biosynthesis of abscisic acid, including the supply of xanthophyll precursors, **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 253 - 273, 2005.

TRIVELIN, P. C. O., VICTORIA R. L., RODRIGUES, J. C. S. Aproveitamento por soqueira de cana-de-açúcar de final de safra do nitrogênio da aquamônia-15N e uréia-15N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 12, p. 1375 - 1385. 1995.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; EGGENBERG, P.; BIRO, B.; KÖVES-PECHY, K.; VÖRÖS, I.; STRASSER, R.J. Synergistic and antagonistic effects of arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 169 - 182, 2000.

VANRHIJN, P.; VANDERLEYDEN, J. The *Rhizobium*-plant symbiosis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 59, p. 124 - 142, 1995.

VAZQUEZ, M. M.; CÉSAR, S.; AZCÓN, R.; BAREA, J. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) and their effects on microbial population and enzyme activities in the rhizosphere of maize plants. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 261 - 272, 2000.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T., LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823 - 6831, 1991.

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., DE BRUIJN, F. J., LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 1, p. 25 - 40, 1994.

VEGA, F. E., PAVA-RIPOLL, M., POSADA, F., BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 371 - 380, 2005.

VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K. D.; JAPIASSU, J.; NOGUEIRA, E. M.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂ fixing endophytic bacteria association. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 559 - 569, 2006.

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

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p. 221 - 224, 1996.

YOUNG, P. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *In*: Stacey, G.; 85 Burris, R.H.; Evans, H.J. (ed.) **Biological nitrogen fixation**. Chapman and Hall Inc., New York, p. 43 - 86, 1992.

ZAKRIA, M.; UDONISHI, K.; SAEKI, Y.; YAMAMOTO, A.; AKAO, S. Infection, multiplication and evaluation of the nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp strain B501gfp1 in sugarcane stems inoculated by the vacuum infiltration method. **Microbes and Environments**, Tóquio, v. 23, n. 2, p.128 - 133, 2008.

9. Anexo

O anexo refere-se à numeração das colunas identificadas nos géis de BOX-PCR, a partir de DNAs extraídos de películas formadas em meio semissólido, utilizados na contagem por Número Mais Provável (NMP).

Tabela 2. Legenda das colunas da figura 13.

Números	Rep. Biológica	Tratamentos	Meio de Cultura	Diluição
1	11	Não inoculado	JMV	-4
2	11	Não inoculado	LGI	-4
3	11	Não inoculado	JNFB	-4
4	21	Não inoculado	JMV	-4
5	31	Não inoculado	LGI-P	-4
6	31	Não inoculado	JNFB	-4
7	41	Não inoculado	JMV	-4
8	41	Não inoculado	LGI	-4
9	22	Ppe8	JMV	-4
10	15	HCC103	JNFB	-4
11	25	HCC103	JNFB	-4
12	35	HCC103	JNFB	-4
13	45	HCC103	JNFB	-4
14	26	CBAmC	LGI	-4
15	21	Não inoculado	LGI	-4
16	21	Não inoculado	JNFB	-4
17	31	Não inoculado	JMV	-4
18	41	Não inoculado	JNFB	-4
19	12	Ppe8	JMV	-4
20	14	HRC54	JNFB	-4
21	24	HRC54	JNFB	-4
22	44	HRC54	JNFB	-4
23	16	CBAmC	LGI	-4
24	36	CBAmC	LGI	-4
25	17	MIX	LGI-P	-4
26	17	MIX	JNFB	-4
27	27	MIX	LGI	-4
28	27	MIX	JNFB	-4
29	37	MIX	JMV	-4
30	37	MIX	LGI	-3
31	47	MIX	JMV	-4
32	11	Não inoculado	LGI	-4
33	21	Não inoculado	LGI-P	-4
34	31	Não inoculado	LGI	-4
35	41	Não inoculado	LGI-P	-4
36	32	Ppe8	JMV	-4
37	42	Ppe8	JMV	-4
38	13	PAL5	LGI-P	-3
39	23	PAL5	LGI-P	-4

Números	Rep. Biológica	Tratamentos	Meio de Cultura	Diluição
40	33	PAL5	LGI-P	-4
41	43	PAL5	LGI-P	-4
42	34	HRC54	JNFB	-4
43	36	CBAmC	LGI	-4
44	46	CBAmC	LGI	-4
45	17	MIX	LGI	-4
46	27	MIX	JMV	-4
47	27	MIX	LGI-P	-4
48	37	MIX	LGI-P	-4
49	37	MIX	JNFB	-4
50	47	MIX	JMV	-4
51	47	MIX	LGI-P	-4
52	47	MIX	JNFB	-4