

DANUBIA RAMOS MOREIRA DE LIMA

**BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ASSOCIADAS A PLANTAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS EM PERNAMBUCO**

RECIFE/PE

FEVEREIRO DE 2012

DANUBIA RAMOS MOREIRA DE LIMA

**BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ASSOCIADAS A PLANTAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS EM PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientadora: DRA. JÚLIA KUKLINSKY SOBRAL

Conselheiro: DR. FERNANDO JOSÉ FREIRE

**RECIFE/PE
FEVEREIRO DE 2012**

Ficha Catalográfica

L732b Lima, Danubia Ramos Moreira de
Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de
cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco / Danubia Ramos
Moreira de Lima. -- Recife, 2012.
110 f. : il.

Orientador (a): Júlia Kuklinsky Sobral.
Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento Agronomia,
Recife, 2012.
Referências.

1. Química do solo 2. Fertilidade do solo 3. Microbiologia do
solo 4. Diversidade genética 5. Diazotróficas 6. Microbiologia do
sol 7. Reinoculação ; *Saccharum* ssp. I. Sobral, Júlia Kuklinsky,
Orientadora II. Título

CDD 631.4


DANUBIA RAMOS MOREIRA DE LIMA

**BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO ASSOCIADAS A PLANTAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS EM PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

**Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 24 de
fevereiro de 2012**

Orientadora:


Dr^a Júlia Kuklinsky Sobral

Examinadores:



Dr. Fernando Dini Andreote



Dr^a Luciana Oliveira Franco


Dr^a Márcia do Vale Barreto Figueiredo

“A educação tem raízes amargas, mas os seus frutos são doces”.

Aristóteles

DEDICO

Aos meus pais, meu marido, minhas sobrinhas, aos meus irmãos, cunhadas, amigos e companheiros de laboratório e a minha orientadora, ou seja, a todos que tornaram possível a realização deste trabalho que na realidade foi um sonho realizado!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a intercessão de nossa Senhora que sempre atuaram em minha vida.

A meu companheiro e amigo, Antônio Ristanley por toda paciência e amor dado nos momentos que mais precisei.

Aos meus pais, Severino Ramos e Maria de Fátima, pelo amor e dedicação a mim dedicados.

Aos meus irmãos, Douglas, Davis, Cesar e Shirley por fazerem parte da minha vida; as minhas sobrinhas, Estefane e Maria Clara por me fazerem sorrir até mesmo nos momentos mais difíceis; As minhas cunhadas, Virginia e Edvânia e também a minha sogra Edileusa, meu sogro Antônio por contribuírem direta ou indiretamente na minha vida.

A Prof^a Dra Júlia Kuklinsky Sobral pelos conselhos, orientações, ensinamentos e por ter tido a oportunidade e privilégio de tela como professora, orientadora e além de tudo conhecer a maravilhosa, admirável, inteligente e paciente, pessoa que hoje eu tenho como um espelho para minha vida profissional, familiar e social.

Ao Prof^o Alberto Einstein pelo apoio ao Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM).

Aos componentes e amigos do LGBM, João Tiago, Andresa, Camila, Everthon, Raquel, Gilka, Williane, Arthur, Isaneli, Aldo, Geraldo, Bruno, Jesimiel, Luana, Adjailton, Jacylene, Narciso, e Jéssica que me ajudaram em análises, isolamentos, montagem, condução de experimento e etc.....também me fizeram sorrir quando as vezes eu queria chorar, arengas científicas, momentos de descontração com sucessivas crises de riso, pessoas estas que dedicaram a mim verdadeiros votos de amizade e companheirismo em todos os momentos no laboratório e fora dele caso precisasse, momentos incontáveis e impagáveis, que mesmo que o tempo passe e a distância coloquem barreira eu não esquecerei.

Aos todos os amigos conquistados na PGCS em especial para Emmanulla, Vanessa, Marilúcia, Wagner, Monaliza e Rozângela por favores prestados, conselhos e compartilhamento do conhecimento através dos grupos de estudos que formávamos para estudar as diferentes disciplinas.

Aos ex e sempre LGBM: Diogo e Pedro por toda ajuda, atenção, amizade e companheirismo prestados.

Ao Prof. Dr Fernando Freire pelo apoio ao projeto e auxílio sempre que necessário.

Ao Prof. Dr Fernando Dini Andreote por todo o apoio científico, suporte estrutural na ESALQ/USP, ensinamentos, conhecimento compartilhado e oportunidade de conviver e aprender com seu grupo de pesquisa (Emiliana, Ademir, Cris, Júlia, Diogo e Pedro).

A todos os componentes (professores, alunos e funcionários) do departamento do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelo suporte profissional, científico.

À Socorro, por todos os favores prestados e pela atenção e carinho com que nos trata.

Inicialmente a FACEPE e, em seguida, a Capes pela concessão da Bolsa de estudos.

A Dra. Maria Carolina Quecine, por ceder a bactéria, *Agrobacterium tumefaciens* NTL4, controle para testar a presença da molécula *Quorum sensing*.

Agradeço, também, a todos que contribuíram de forma direta e indireta para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Mais uma vez obrigada ...

SUMÁRIO

	Lista de Figuras	xi
	Lista de Tabelas	xiv
	Lista de Abreviaturas	xv
	RESUMO	xvi
	ABSTRACT	xviii
1.	INTRODUÇÃO GERAL	1
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	4
2.1.	A cana de-de-açúcar	4
2.2.	Importância da interação bactéria-solo-planta	5
2.2.1.	Fixação biológica de nitrogênio	5
2.2.2.	Produção de fitohormônios do tipo auxinas	7
2.2.3.	Solubilização de fosfato inorgânico	8
2.2.4.	Produção de quorum sensing	9
2.3.	Diversidade genética dos fixadores de nitrogênio	10
2.4.	REFERÊNCIAS	12
3.	CAPITULO I	22
	RESUMO	23
	ABSTRACT	25
3.1.	INTRODUÇÃO	26
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.2.1.	Material vegetal e isolamento bacteriano	27
3.2.2.	Densidade populacional bacteriana	31
3.2.3.	Identificação e análise filogenética dos isolados bacterianos	31
3.2.4.	Análise da diversidade genética pela técnica de BOX-PCR	31
3.2.5.	Análise da comunidade bacteriana independente do cultivo por DGGE	32
3.2.5.1.	PCR do gene 16S rRNA	32
3.2.5.2.	PCR do gene <i>nifH</i>	33
3.2.5.3.	Análise por DGGE	33
3.2.6.	Análise estatística	34
3.3.	RESULTADOS	34
3.3.1.	Isolamento e densidade populacional de bactérias diazotróficas	34
3.3.2.	Variedade genética bacteriana por BOX-PCR	39
3.3.3.	Análise da comunidade bacteriana independente do cultivo por DGGE	42
3.4.	DISCUSSÃO	46
3.5.	CONCLUSÕES	49
3.6.	REFERÊNCIAS	50

4.	CAPITULO II	57
	RESUMO	58
	ABSTRACT	60
4.1.	INTRODUÇÃO	62
4.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.2.1.	Isolados bacterianos	63
4.2.2.	Capacidade para fixação de nitrogênio	64
4.2.3.	Seleção de bactérias produtoras de ácido indol acético	64
4.2.4.	Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico <i>in vitro</i>	65
4.2.5.	Seleção de bactérias produtoras de quorum sensing	66
4.2.6.	Avaliação da promoção de crescimento vegetal por bactérias associadas a plantas de cana soca	66
4.2.7.	Análise estatística	69
4.3.	RESULTADOS	69
4.3.1.	Capacidade para fixação de nitrogênio	69
4.3.2.	Bactérias produtoras de ácido indol acético	68
4.3.3.	Bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico <i>in vitro</i>	70
4.3.4.	Bactérias produtoras de quorum sensing AHLs	76
4.3.5.	Promoção de crescimento vegetal por bactérias associadas a plantas de cana soca	77
4.4.	DISCUSSÃO	82
4.5.	CONCLUSÕES	86
4.6.	REFERÊNCIAS	88

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1.** Densidade populacional estimada pelo número mais provável de bactérias diazotróficas de dois nichos (endofíticas de raiz e rizosfera) em duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579 e RB867515) aos 4 e 10 meses de cultivo. Letras minúsculas comparam os nichos por variedade, letras maiúsculas entre as variedades por tempo de cultivo e os números arábicos estão para as médias obtidas para ambas as idades fenológicas das plantas. Médias seguidas por letras ou números iguais não diferem pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). 36
- Figura 3.2.** Dendrograma da diversidade genética de 77 isolados bacterianos associados à cana soca com 4 meses de idade, realizado pela técnica de BOX-PCR, e analisados através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com *bootstrap* de 1.000 vezes. End: endofítica de raiz; Riz: Rizosfera; Variedade RB92579 (V1) e RB867515 (V2). 40
- Figura 3.3.** Dendrograma da diversidade genética de 34 isolados bacterianos associados à cana soca com 10 meses de idade, realizado pela técnica de BOX-PCR, e analisados através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com *bootstrap* de 1.000 vezes. Endofítica de raiz (End); Rizosfera (Riz); Variedade RB92579 (V1) e RB867515 (V2). 41
- Figura 3.4.** Géis de poliacrilamida com perfis obtidos no DGGE do gene 16S rRNA (A) e *nifH* (B) de comunidades bacterianas endofíticas de raiz, presentes em cana soca das variedades RB92579 e RB867515 aos 4 e 10 meses após a primeira rebrota. 42
- Figura 3.5.** Dendrograma de similaridade das comunidades bacterianas baseadas nos perfis obtidos através da técnica de DGGE do

gene 16S rRNA, e analisados através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com *bootstrap* de 1.000 vezes. Os números nos nós indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso. **EN**: endofítica de raiz; **RZ**: rizosfera; **V1**: RB92579; **V2**: RB867515; **A**: 4 meses; **B**: 10 44 meses.

Figura 3.6. Dendrograma de similaridade das comunidades bacterianas baseadas nos perfis obtidos através da técnica de DGGE do gene *nifH*, e analisados através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com *bootstrap* de 1.000 vezes. Os números nos nós indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso. **EN**: endofítica de raiz; **RZ**: rizosfera; **V1**: RB92579; **V2**: RB867515; **A**: 4 meses; **B**: 10 45 meses.

Figura 4.1. Teste de fixação biológica de nitrogênio *in vitro* em meio de cultura NFb. A: controle negativo, sem crescimento bacteriano; B: teste positivo, com crescimento bacteriano em forma de halo claro e modificação da cor do meio, indicando alteração no pH. 69

Figura 4.2. Quantificação da produção de ácido indol acético, em meio TSA líquido com o acréscimo de L-triptofano, de bactérias associadas à rizosfera (A) e endofíticas de raiz (B) de duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515) com 4 meses após a primeira rebrota. Letras minúsculas para os diferentes nichos de forma isolada e as maiúsculas comparando todas as médias, independente dos nichos avaliados. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. 71

Figura 4.3. Solubilização de fosfato inorgânico por isolados bacterianos oriundos da rizosfera e endofíticos de raiz de plantas de cana soca. A presença de área clara ao redor da colônia

bacteriana indica a solubilização do fosfato.

72

Figura 4.4. Índice de Solubilização de fosfato inorgânico (IS) de bactérias rizosféricas (A) e endofíticas de raiz (B) isoladas de duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515) com 4 meses de cultivo, após a primeira rebrota. Letras maiúscula comparam todas as médias independentes da coleta, nicho e variedade; as letras minúsculas comparam as médias dentro dos nichos; e as médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

74

Figura 4.5. Índice de Solubilização de fosfato inorgânico (IS) de bactérias rizosféricas (A) e endofíticas de raiz (B) de duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515) com 10 meses de cultivo, após a primeira rebrota. Letras maiúsculas comparam todas as médias independentes da coleta, nicho e variedade; as letras minúsculas comparam as médias dentro dos nichos; e as médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

75

Figura 4.6. Detecção da produção de quorum sensing do tipo N-acil homoserinas lactonas (AHL) pro meio da produção de coloração azul da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4), inoculada horizontalmente. A – bactéria negativa e B – bactéria positiva, para a produção de AHLs.

76

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1.** Propriedades químicas e físicas do solo rizosférico de cultivo de cana-de-açúcar oriundo da Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Carpina/Pernambuco, (7°51'03"S e 35°15'17"O). (Análise realizada por prestação de serviços de laboratório especializado). 30
- Tabela 3.2.** Características gerais das variedades, RB92579 e RB867515, de cana-de-açúcar (RIDESA, 2010). 30
- Tabela 3.3.** Identificação de linhagens bacterianas isoladas de cana soca cultivadas em Pernambuco. 37
- Tabela 4.1.** Propriedades químicas e físicas do solo que foi utilizado no ensaio experimental de promoção de crescimento vegetal, em casa de vegetação, de plantas de cana-de-açúcar das variedades RB92579 e a RB867515. 68
- Tabela 4.2.** Origem e identificação de bactérias associadas a plantas de cana soca com capacidade de crescer em meio livre de fonte nitrogenada, de produzir ácido indol acético e quorum sensing, e de solubilizar fosfato inorgânico. 77
- Tabela 4.3.** Caracterização funcional de 10 bactérias, associadas a plantas de cana soca, em meio NFB com diferentes concentrações de NaCl (0%; 2,5%; 5%; 7,5% e 10%) e do pesticida fipronil (100 g/ha, 200 g/ha, 400g/ha), e com duas fontes de carbono (sacarose e ácido málico) em pH 6,8 e pH5,5, índice de solubilização de fosfato de cálcio com três fontes de carbono (glicose, sacarose e manitol), e produção do ácido indol acético na ausência do L-triptofano. 79
- Tabela 4.4.** Avaliação do potencial de crescimento da associação de bactérias inoculadas em duas variedades de cana-de-açúcar. 82

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido indol acético
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
SB	Soma de base
S.F	Solubilização de fosfato
Q.S	Quorum sensing

LIMA, DANUBIA RAMOS MOREIRA DE. MSc. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Fevereiro de 2012. Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco. Orientadora: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral. Conselheiro: Prof. Dr. Fernando José Freire.

RESUMO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura amplamente distribuída e atualmente dispersa em todos os continentes, tendo como principal produtor mundial o Brasil. Diante da ampliação e contínuo crescimento agrícola da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, o desenvolvimento produtivo deve ocorrer em paralelo com técnicas agrícolas que visem a viabilidade econômica e que minimizem a degradabilidade do meio ambiente, como por exemplo, o uso de micro-organismos que promovam o crescimento vegetal. Neste contexto, a fixação biológica de nitrogênio (FBN) desponta como uma opção de uso nos sistemas produtivos. Diante do exposto, os objetivos do trabalho foi isolar bactérias diazotróficas, estimar a densidade populacional, identificar as linhagens bacterianas, avaliar a diversidade genética bacteriana cultivável e não cultivável por meio das técnicas de BOX-PCR e DGGE dos genes 16S rRNA e *nifH*, caracterizar funcionalmente os isolados bacterianos para a produção do ácido indol acético, solubilização de fosfato inorgânico, produção de *quorum sensing*, selecionar isolados promissores para a promoção do crescimento vegetal e avaliar sua interação com plantas de cana-de-açúcar em casa de vegetação. Para tal, primeiramente, foram coletadas amostras de duas variedades (RB 92579 e RB 867515) de cana-de-açúcar da Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, PE, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, destas foram isoladas bactérias potencialmente fixadoras de N₂. Após o isolamento e seleção das linhagens bacterianas fixadoras de N₂ foi realizado a caracterização funcional para produção do ácido indol acético (AIA), índice de solubilização de fosfato (IS), produção da molécula *quorum sensing* (QS) e avaliada variabilidade genética através da técnica de BOX-PCR e PCR-DGGE para o gene 16S rRNA e *nifH*. As bactérias foram identificados por análise da seqüência parcial do 16S rDNA. Dez isolados bacterianos foram selecionados para a reinoculação em rebolos de duas variedades de cana-de-açúcar, cultivadas em casa de vegetação. Nos

resultados obtidos foi evidente a elevada e variável funcionalidade para a FBN, AIA, IS e produção de QS. Independente da técnica utilizada para o estudo da variabilidade genética foi observado elevada diversidade genética para as bactérias oriundas da rizosfera e de raízes de cana soca das variedades RB92579 e RB867515 cultivadas em Pernambuco. Na reinoculação de linhagens bacterianas em cana-de-açúcar foi evidenciado que algumas bactérias beneficiam o desenvolvimento das plantas em relação às plantas controle.

Palavras-chave: diversidade genética, bactérias diazotróficas, interação bactéria-planta, promoção de crescimento vegetal.

LIMA, DANUBIA RAMOS MOREIRA DE. MSc.at Universidade Federal Rural de Pernambuco, February 2012. Nitrogen fixing bacteria associated with plants of sugar cane cultivated in Pernambuco. Advise: Prof^a. Dr^a. Júlia Kuklinsky Sobral. Co-Adviser: Prof. Dr. Fernando José Freire.

ABSTRACT

The sugar cane (*Saccharum* spp.) Culture is a widely distributed and is currently scattered across all continents, with the main world producer Brazil. Given the continued growth and expansion of the agricultural culture of sugar cane in Brazil, productive development should occur in parallel with agricultural techniques aimed at the economic viability and to minimize the degradability of the environment, such as the use of microorganisms that promote plant growth. In this context, biological nitrogen fixation (BNF) has emerged as an option to use in production systems. Objectives of the study was to diazotrophs isolate, estimate the density population, linagens Identify the bacterial genetic diversity assess bacterial culturable and unculturable by the techniques of BOX-PCR and DGGE of 16S rRNA and nifH genes, functionally characterize the bacterial isolates for the production of indole acetic acid, inorganic phosphate solubilization, production of quorum sensing, isolates selecting to promote plant growth and evaluate their interaction with plants of sugar cane in a greenhouse. To do this, first, samples were collected from two varieties (RB92579 and RB867515) of sugar cane at the Estação Experimental de cana-de-açúcar de Carpina, PE, Universidade Federal Rural de Pernambuco, these were isolated potentially fixing bacteria N₂. After isolation and selection of N₂-fixing bacterial strains was realization functional characterization for the production of indole acetic acid (IAA), phosphate solubilization index (SI), production the quorum sensing (QS) and evaluated genetic variability through technical of BOX-PCR and PCR-DGGE for 16S rRNA. Ten bacterial isolates were selected for reinoculation wheels in two varieties of sugar cane grown in the greenhouse. Results was evident in the high and variable functionality for the BNF, AIA, IS and QS production. Regardless of the technique used to study the genetic variability was observed for the high genetic diversity of bacteria from the rhizosphere and roots of ratoon cane varieties RB92579 and RB867515 cultivated in Pernambuco.

Reinoculation of bacterial strains in sugar cane has been shown that some bacteria benefit the development of plants in relation to control plants.

Keywords: genetic diversity, diazotrophic bacteria, interaction plant-bacteria, vegetable growth promotion.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar e de seus derivados, o qual possui uma área total de 8.368,4 mil hectares cultivada com cana-de-açúcar, com estimativa de 68.289 kg/ha para a produtividade de 2011/2012 (MAPA, 2009). Inferiu-se como Estados brasileiros de maior produtividade para o setor sucroalcooleira os Estados de São Paulo com 52,2% (4.370 mil hectares), seguido por Minas Gerais com 8,87% (742,65 mil hectares), Goiás com 8,1% (678,42 mil hectares), Paraná com 7,3% (611,44 mil hectares) Mato Grosso do Sul com 5,70% (480,86 mil hectares), Alagoas com 5,45% (463,65 mil hectares), e Pernambuco com 3,89% (326,11 mil hectares) (CONAB, 2011).

Diante da ampliação e contínuo crescimento agrícola da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, o desenvolvimento produtivo deve ocorrer em paralelo com o uso de técnicas agrícolas que visem à viabilidade econômica com minimização da degradabilidade do meio ambiente. Neste contexto, a aplicação de microrganismos no manejo de sistemas agrícolas representa uma alternativa viável e de grandes perspectivas.

A interação entre bactérias e plantas ocorre em diferentes nichos, no solo perto da superfície das raízes (comunidade rizosférica) ou no interior das plantas (comunidade endofítica) (HARTMANN et al., 2008) nos distintos órgãos (raiz, caule, folha, flores), podendo contribuir beneficemente com o crescimento e desenvolvimento vegetal (ANDREOTE, 2009). É sabido que bactérias endofíticas e rizosféricas caracterizadas como funcionais para a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção do ácido indol acético (AIA), solubilização de fosfato são potencias promotoras do crescimento das plantas (KINKEL et al., 2000; STURZ et al., 2000; PEDRAZA, 2008; TAULÉ et al., 2011; FERRARA et al., 2011).

A FBN é um processo realizado por várias espécies bacterianas que habitam o solo e que podem ser de vida livre ou viver associadas a rizosfera e filosfera. Esses procariontes possuem um complexo enzimático chamado de nitrogenase, que é capaz de romper a tripla ligação do N_2 atmosférico e provocar a sua redução até amônia (NH_3^+) (HUNGRIA, 1997; FRANCHE et al,

2009). O AIA é a principal auxina produzida, a mais abundante, de maior relevância fisiológica, determinada geralmente por espectrometria de massa, é produzida pelas plantas e micro-organismos por diferentes rotas, tais como, via dependente e independente de triptofano (KERBAUY, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Para a solubilização de fosfato no solo, existem mecanismos de transformação mediados por vários grupos de microrganismos que atuam na extração ou solubilização de P, de frações insolúveis no solo e de fosfatos inorgânicos naturais poucos solúveis que por meio da produção de enzimas, compostos quelantes e complexantes pela microbiota que variando a competência na solubilização de acordo com as espécies microbianas e as formas químicas de fosfato (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; NOVAIS et al., 2007; EMBRAPA, 2008).

As bactérias promotoras de crescimento exercem diversas funções, diferem a morfologia, fisiologia, genética e a filogenética, entre os diferentes representantes que apresentam elevada diversidade genética (FAGAN et al., 2007; FRANCHE et al., 2009). Para o estudo da diversidade genética existentes nos diferentes habitats geralmente utiliza-se técnicas moleculares, como BOX, RAPD, ARDRA e PCR-DGGE (*Polimerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), que possibilitam a identificação de grupos distintos de microrganismos, além de permitir a realização de correlações entre ambiente estudado (CHENEY et al., 2000; ANDREOTE et al., 2008).

A técnica de BOX-PCR busca encontrar e amplificar regiões repetidas encontradas no genoma bacteriano, designadas de elementos Box (MARQUES et al., 2008); e o PCR-DGGE é uma técnica independente de cultivo bacteriano que possibilita avaliar a diversidade genética e funcional dos micro-organismos presentes na interação solo-planta e também o acesso a variação da comunidade bacteriana no meio ambiente quando influenciada por fatores bióticos e abióticos na associação com planta/microrganismo em ambientes naturais e agrícolas (SALES et al., 2002; LAVACA et al., 2006).

É sabido que as bactérias exercem inúmeras funções e, estas, estão presentes nos diferentes habitats, fato este que pode ser ocasionado por causa da enorme diversidade genética que falta ser elucidada e explorada

completamente (PROSSER et al., 2007). Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: isolar bactérias diazotróficas, estimar a densidade populacional, identificar as linhagens bacterianas, avaliar a diversidade genética bacteriana dependente e independente de cultivo por meio das técnicas de BOX-PCR e DGGE dos genes 16S rRNA e *nifH*, caracterizar funcionalmente os isolados bacterianos quanto ao potencial para a produção do ácido indol acético, solubilização de fosfato inorgânico, produção de *quorum* sensing, selecionar isolados promissores para a promoção do crescimento vegetal e avaliar sua interação com plantas de cana-de-açúcar em casa de vegetação.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta exótica oriunda da Ásia Meridional, pertencente à família *Poaceae* (*Gramineae*) (SANTOS et al., 2008). Os primeiros exemplares da espécie *Saccharum* spp. foram introduzidas no Brasil aproximadamente em 1515, vindas da Ilha da Madeira (Portugal) e, desde então, fazem parte do contexto histórico brasileiro, sendo um dos principais produtos agrícolas do país (MARQUES, 2009).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2009), o Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar e de seus derivados, o qual possui uma área total de 8.368,4 mil hectares cultivada com cana-de-açúcar com estimativa de 68.289 kg/ha para a produtividade de 2011/2012. Os principais produtos derivados da cana-de-açúcar são o açúcar e o etanol (MARQUES, 2009), com previsão para a safra de 2011/2012 de uma produção nacional de açúcar de 36,9 milhões de toneladas e para a produção de álcool um equivalente de 22.857,6 bilhões de litros de etanol, equivalente a 9.069,3 bilhões de litros de etanol anidro e 13.788,3 bilhões de litros de etanol hidratado.

A cana-de-açúcar é uma cultura que se adapta a diversos ecossistemas, capaz de crescer em uma vasta faixa de habitats e altitudes, é distribuída amplamente nos trópicos e em regiões temperadas, encontrando-se atualmente dispersa em todos os continentes, e tendo como principais produtores mundiais, o Brasil, seguido da Índia, China, Tailândia, Paquistão e México (MARQUES, 2009).

Diante da ampliação e contínuo crescimento agrícola da cultura da cana-de-açúcar no Brasil (CONAB, 2011), o desenvolvimento produtivo deve ocorrer em paralelo com o uso de técnicas agrícolas que visem à viabilidade econômica com minimização da degradabilidade do meio ambiente. Neste contexto, a busca por sistemas de manejo que propiciem a sustentabilidade da cultura, com aumento de produtividade e diminuição de insumos está crescendo a cada dia. Então, a aplicação de microrganismos no manejo de

sistemas agrícolas representa uma alternativa viável e de grandes perspectivas.

2.2. Importância da interação bactéria-solo-planta

A interação entre bactérias e plantas ocorre em diferentes nichos, no solo perto da superfície das raízes (comunidade rizosférica) ou no interior das plantas (comunidade endofítica) (HARTMANN et al., 2008) nos distintos órgãos (raiz, caule, folha, flores), podendo contribuir beneficentemente com o crescimento e desenvolvimento vegetal (ANDREOTE, 2009).

É sabido que bactérias endofíticas e rizosféricas podem apresentar características envolvidas com a promoção de crescimento vegetal, tais como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), biocontrole de doenças, competição por nutrientes no solo, produção de fitohormônios, como o ácido indol acético (AIA) e solubilização de nutrientes, como o fosfato inorgânico, entre outras (KINKEL et al., 2000; STURZ et al., 2000; PEDRAZA, 2008; TAULÉ et al., 2011; FERRARA et al., 2011).

2.2.1. Fixação biológica de nitrogênio

As plantas absorvem o nitrogênio (N) na forma de NH_4^+ ou de NO_3^- ou por meio da fixação biológica do nitrogênio atmosférico. A fonte primária de nitrogênio para as plantas é o N_2 atmosférico, que corresponde a aproximadamente 78% dos gases da atmosfera, no entanto este é altamente estável devido a sua tripla ligação covalente, ficando indisponível para as plantas. Contudo, o N_2 pode tornar-se disponível quando fixados através de reações químicas por processos industriais ou naturais. Entre os processos naturais, o de maior representatividade é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), no qual o N_2 atmosférico é reduzido até a forma de NH_3^+ (TAIZ & ZIEGER, 2004).

É sabido que a maior limitação para a FBN em sistemas não simbióticos é a disponibilidade de fontes de energia para a bactéria, pois para que o processo biológico ocorra é necessária grande quantidade de ATP. Essa

limitação pode ser compensada por microrganismos que são atraídos pelos exsudados das plantas na rizosfera ou rizoplane, fazendo com que os microrganismos sejam atraídos para próximo da planta hospedeira e até possam colonizar internamente seus tecidos, como no caso dos endófitos (TILAK et al., 2006).

A fixação biológica do nitrogênio é um processo realizado por várias espécies bacterianas que podem se associar a diversas plantas em diferentes graus de especificidade levando à classificação como bactérias de vida livre e associativas que podem ser endofíticas facultativas ou endofíticas obrigatórias (BALDANI et al., 1997a; OLIVEIRA et al., 2008; SENTHILKUMAR et al., 2011). Esses procariontes possuem um complexo enzimático chamado de nitrogenase, que é capaz de romper a tripla ligação do N₂ atmosférico e provocar a sua redução até amônia (NH₃⁺) (HUNGRIA, 1997; FRANCHE et al., 2009).

Muitas espécies de bactérias fixadoras de N₂ podem ocorrer endofiticamente, embora esses microrganismos fixadores possam ser encontrados em dicotiledôneas, diversos estudos demonstram que essa ocorrência é mais amplificada em gramíneas e em outras monocotiledôneas, como por exemplo, em palmeiras e *Orchidaceae* (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; FAGAN et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

A associação simbiótica, entre plantas e bactérias, pode ocorrer em plantas não leguminosas e em plantas leguminosas. Nas leguminosas a associação com microrganismos fixadores de nitrogênio é geralmente caracterizada pela formação de nódulo (TAIZ & ZIEGER, 2004). Este tipo de associação é considerada típica da simbiose entre as leguminosas e bactérias denominadas de β e α rizóbios. Os gêneros *Burkholderia* e *Ralstonia* (*Cupriavidus*) pertencem à classe dos β rizóbios. Na classe dos α rizóbios estão incluídos os gêneros *Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobacterium*, *Shinella* e *Devosia* (REIS JUNIOR et al., 2006; BOMFETI et al., 2011).

As bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas podem ser dividida em três grupos, os organismos rizosféricos, que são aqueles que

colonizam o solo próximo às raízes; os endofíticos que são capazes de colonizar internamente os tecidos vegetais e os epifíticos, que colonizam a superfície dos tecidos vegetais (BALDANI et al., 1997). Em vários trabalhos foi observado que as bactérias endofíticas são encontradas em maior densidade populacional nas raízes e posteriormente decrescem progressivamente em direção ao caule e às folhas (LAMB et al., 1996; GOMES et al., 2005), corroborando com estudos feitos por Kuklinsky-Sobral et al. (2004). Mendes et al. (2007) analisando endofíticos de raízes e colmo de cana-de-açúcar observaram maior densidade bacteriana nas raízes.

A literatura relata que, preferencialmente, as raízes e regiões próximas às plantas são utilizadas para realizar estudos que aplicam técnicas moleculares para a identificação da diversidade microbiana endofítica, buscando estirpes que quando reinoculadas sejam eficientes na FBN. Como consequência, geralmente, a planta hospedeira é beneficiada com o nitrogênio fixado incorporado-o nos diferentes compostos bioquímicos presentes na célula vegetal (TAIZ & ZIEGER, 2004; HUNGRIA et. al., 2007.), e desta forma desencadeando benefícios nos diferentes sistemas produtivos suprindo as necessidades dos vegetais, reduzindo o uso de fertilizantes e até mesmo deixando de utilizá-lo, obtendo vantagens no setor econômico e ecológico(REIS JUNIOR et al., 2008).

O nitrogênio fixado por associações microbiológicas pode representar uma alternativa de substituição para os fertilizantes químicos nitrogenados, com as vantagens de ser mais viável economicamente e não poluir o meio ambiente, sendo uma possibilidade de prevenir a degradação do meio e aumentar a segurança alimentar; também pode oferecer subsídios a agricultura de subsistência devido ao baixo custo dos inoculantes (SANTOS et al., 2008).

2.2.2. Produção de fitohormônios do tipo Auxinas

As auxinas são substâncias químicas produzidas, nas plantas, principalmente, nos locais de crescimento ativo, como meristemas, gemas axilares e folhas jovens, embora também haja síntese nas folhas adultas. Dentre as diversas substâncias que pertencem a este grupo, podemos destacar o ácido indol-3-acético (AIA), o ácido indolbutírico (AIB), o ácido

naftalenoacético (ANA) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). O AIA é a principal auxina produzida, a mais abundante, de maior relevância fisiológica, determinada geralmente por espectrometria de massa, e além de ser produzida pelas plantas, também é produzida por microrganismos, por diferentes rotas, tais como, via dependente e independente de triptofano (KERBAUY, 2004; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Segundo a literatura, o AIA produzido, por bactérias endofíticas e rizosféricas, não é influenciado pelo nicho bacteriano (FERRARA et al., 2011); e que uma grande variedade de bactérias endofíticas e epifíticas, como por exemplo, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Enterobacter*, *Pantoea* e *Acinetobacter*, relacionadas à promoção do crescimento vegetal, produzem AIA e existe em elevada frequência na fase inicial de desenvolvimento das plantas (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; LOACES et al., 2011). Jha et al. (2011) observaram que bactérias produtoras de AIA tem a capacidade de crescer em condições adversas de salinidade e estimular a promoção de crescimento em plantas, demonstrando o potencial biotecnológico dessas bactérias.

Mendes et al. (2008) avaliando a diversidade bacteriana produtora de AIA associada a plantas de cana-de-açúcar observaram maior frequência de isolados produtores de AIA em colmos, seguido das raízes e da rizosfera. Saravanan et al. (2007) relata que varias espécies bacterianas realizam a produção do AIA e que este fitormônio está relacionado a promoção de crescimento em cana-de-açúcar. A interação entre bactérias produtoras de AIA e plantas podem resultar na promoção de crescimento das plantas e contribuir para o desenvolvimento de sistemas sustentáveis para a agricultura (HAYAT et al., 2010).

2.2.3. Solubilização de fosfato inorgânico

O solo é um dos maiores reservatório de fósforo (P) com 96 a 182 x 10¹² Kg, geralmente encontrado retido como, por exemplo, em solos intemperizados, onde o P é pouco disponível e encontrado na forma inorgânica não lábil. No entanto, existem mecanismos de transformação do P no solo, por meio da produção de enzimas, compostos quelantes e complexantes de origem microbiana que atuam na extração ou solubilização de P que vão variar de

acordo com as espécies microbianas e as formas químicas de fosfato (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; NOVAIS et al., 2007; EMBRAPA, 2008).

A literatura relata que a capacidade dos micro-organismos em realizar a solubilização de fosfato está ligada aos ciclos biogeoquímicos (REITH et al., 2007). Souza et al. (2007) relatam que há maior disponibilidade de fosfato depende da fonte de fosfato utilizada e do aumento do pH do meio. A solubilização de fosfato também é dita como uma característica fenotípica bacteriana que é geralmente utilizada para a caracterização de micro-organismos correlacionados com a promoção de crescimento das plantas (DIAS et al., 2009; JHA et al., 2011).

Algumas bactérias promotoras do crescimento possuem a habilidade de solubilizar fosfato inorgânico tornando-o disponível para as plantas podendo aumentar a produtividade da cultura (RODRIGUEZ et al., 2007). Taule et al. (2011), avaliando a comunidade diazotrófica associada a plantas de cana-de-açúcar observaram efeito benéfico, oriunda da associação bactéria/planta, de importância agrônômica para a cultura. Semelhantemente foi observado por Saravanan et al. (2008) e Ferrara et al. (2011), também avaliando bactérias associadas a plantas de cana-de-açúcar e por Taurian et al. (2011) em plantas de amendoim.

2.2.4. Indicativo de quorum sensing

Segundo Cha et al. (1998), o quorum sensing (QS) atuam no mecanismo de comunicação microbiana, no qual as bactérias regulam a expressão gênica em resposta à densidade celular. Há descritos na literatura que moléculas QS são responsáveis por regular diversos processos fisiológicos, como por exemplo, a bioluminescência, biossíntese de antibióticos, transferência de plasmídeos (HARDMAN et al., 1998), biocontrole em plantas (MAEYER et al., 2011) e formação de biofilmes (MCLEAN et al., 1997; NADELL et al., 2008).

De acordo com Xavier & Fosten (2007), a formação de biofilme microbiano ocorre no interior da plantas através da colonização vertical, no qual há aumento progressivo de bactérias, ocorrendo o crescimento e dispersão das células microbianas com subsequente aumento na produção do biofilme pelas

inúmeras espécies bacterianas. A colonização por bactérias, nas plantas, depende da troca de sinais do QS entre as células bacterianas. No entanto, existem evidências que as plantas, semelhantemente às bactérias, secretam sinais similares aos sinais do QS que confundem a regulação bacteriana (BAUER & MATHESIUS, 2004).

A comunicação bacteriana por meio dos QS podem gerar malefícios, aumentando a densidade de fitopatogenos favorecendo o estado de virulência e estabelecimento do agente patológico, ou benefícios, como por exemplo, promovendo a proliferação de endófitos diazotróficos através da formação de biofilme, aumentando a densidade populacional do microrganismo benéfico, tornar mais ágil a formação de nódulos e entre outros (RUMJANEK et al, 2004).

Nadell et al. (2008) observaram que bactérias utilizam os sinais do QS no controle de secreção de polímeros para atrair outras bactérias, formar biofilme e conseqüente favorecer o aumento da densidade populacional. Yaryura et al. (2008) relatam que houve formação de biofilme requerido para a colonização de raízes e sementes de plantas de soja por *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. Boyer et al. (2008) analisando o efeito do QS na promoção do crescimento relatou que os endófitos de plantas de arroz observaram que a molécula QS inativou a atividade da pectinase, aumentou a síntese de sideróforos, reduziu a produção do ácido indol acético e não afetou a atividade da celulase e motilidade da comunidade bacteriana.

2.3. Diversidade genética dos fixadores de nitrogênio

A fixação biológica de nitrogênio é um processo biológico mediado por microrganismos ditos diazotróficos, que possuem o complexo enzimático da nitrogenase que apresentam elevada diversidade (FRANCHE et al., 2009), diferindo a morfologia, fisiologia (FAGAN et al., 2007), genética e a filogenética entre os diferentes representantes (FRANCHE et al., 2009; MAGNANI et al., 2010; SAHARAM & NEHRA, 2011).

Como exemplo da ampla diversidade, pode-se citar as Proteobacterias, que possuem espécies em todas as classes. Existem aquelas espécies que são Gram-positivas, com pequena porcentagem de GC, capazes de fixar nitrogênio pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. Já a *Frankia* é uma

bactéria Gram-positiva com grande porcentagem de bases nitrogenadas guanina e citosina (GC), no seu material genético. A maioria dessas espécies são de vida livre, ocorrem em diferentes tipos de solos, na rizosfera e rizoplane (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; NORMAND et al., 2007; FRANCHE et al., 2009). Rodrigues et al., (2007) avaliando a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas, na cultura do arroz inundado, observaram predominantemente a presença de bactérias do gênero *Burkholderia*, maior do que do gênero *Herbaspirillum*, no qual o primeiro apresentou maior representatividade com 63% e o segundo com 34%, porém este foi mais eficiente na fixação de nitrogênio que o gênero *Burkholderia* em plantas de arroz.

Algumas bactérias fixadoras de N₂ são encontradas em simbiose com fungos, diatomáceas e/ou com várias espécies vegetais, enquanto outros estabelecem relações menos especializadas com plantas denominadas, de modo geral, de associações. A elevada variabilidade genética das diazotróficas garante a ocorrência da FBN em um determinado ecossistema como, também, nos mais diferentes tipos de sistemas terrestres (FRANCHE et al., 2009; MOREIRA et al., 2010).

As bactérias exercem inúmeras funções e estão presentes nos diferentes habitats, fato este que pode ser ocasionado devido a alta diversidade genética, que falta ser elucidada e explorada completamente (PROSSER et al., 2007). É importante que o estudo das relações filogenéticas e da diversidade dos genes bacterianos seja baseado não apenas na preocupação taxonômica, mas também na necessidade de explorar completamente o potencial biotecnológico (MEITANIS et al., 2008), obter informações sobre a diversidade genética bacteriana que possibilitem o estudo filogenético e a caracterização da comunidade bacteriana existente no ambiente (WOESE et al., 1994; VALE et al., 2008).

Para o estudo da diversidade genética microbiana existente nos diferentes habitats, geralmente, utiliza-se técnicas moleculares, como os marcadores BOX, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), que possibilitam a realização de correlações entre ambiente estudado e genótipo (CHENEY et al., 2000; ANDREOTE et al., 2008). A técnica de BOX-PCR busca amplificar regiões

repetidas encontradas no genoma bacteriano, designadas de elementos Box (MARQUES et al., 2008); e técnica PCR-DGGE (*Polimerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) possibilita o acesso à diversidade genética de populações bacterianas oriundas diretamente do meio ambiente, sem o cultivo em laboratório, ou seja, é uma técnica independente de cultivo bacteriano que possibilita avaliar a diversidade genética (SALLES et al., 2002; LACAIVA et al., 2006). Além disso, o PCR-DGGE também permite a análise funcional dos microrganismos presentes na interação solo-planta e o acesso a variação da comunidade bacteriana no meio ambiente, quando influenciada por fatores bióticos e abióticos, na associação com planta/microrganismo em ambientes naturais e agrícolas (SAITO et al., 2007).

2.4. REFERÊNCIAS

Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2011 - Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab 2011.

ANDREOTE, F. D.; LACAIVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. **Diversidade molecular de microorganismos endofíticos**. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD; N. P.; SILVA SANTOS, C. E. R. *Microorganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. 1Ed. Guaíba. Agrolivros, 2008. p. 233-258.

BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G. & DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasilensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 69:116, 1997.

BAYER, W. D.; MATHESIUS, U. Plant responses to bacterial quorum sensing signals. **Plant Biology**. 7:429-433, 2004.

BOMFETI, C. A.; FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; CARDOSO, P. G.; GUERREIRO, M. C.; MOREIRA, F. M. S. Exopolysaccharides produced by the symbiotic Nitrogen-fixing bacteria of leguminosae. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 35:657-671, 2011.

CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y. C.; SHAN, P. D.; FARRAND, S. K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant-associated bacteria. **Molecular Plant Microbe Interactions**. 11:1119-1129, 1998.

Cana-de-açúcar. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acessado em: 25/01/2010.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J. C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**. 34:121-128, 2000.

DIAS, A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPÇÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal Microbiol Biotechnol**. 25:189-195, 2009.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; LIER, Q. J.; SANTOS, O. S.; MÜLLER, L. **Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – revisão**. Revista da FZVA. 14:89-106, 2007.

FERRARA, F. I. S.; OLIVEIRA, Z. M.; GONZALES, H. H. S.; FLOH, E. I. S.; BARBOSA, H. R. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant Soil**. 347:1-400, 2011.

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**. 40:1105-1113, 2005.

HARTMANN, A.; LEMANCEAU, P.; PROSSER, J. I. Multitrophic interactions in the rhizosphere. Rhizosphere microbiology: at the interface of many disciplines and expertises. **FEMS Microbiology Ecology**. 65:179, 2008.

HARDMAN, A. M.; STEWART, G. S.; WILLIAMS, P. 1998. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of general and Molecular Microbiology**. 74:199-210, 1998.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**. 60:579-598. 2010.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja (Documentos 283), 2007. 80 p.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; CAMPO, R. J.; GALERANI, P. R. **Adubação nitrogenada na soja?** Londrina: Embrapa Soja (Comunicado Técnico, 57), 1997. 4 p.

JHA, B.; GONTIA, I.; HARTMANN, A. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. **Plant Soil**. 346:1-400, 2011.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2004. 452p.

KINKEL, L.L., WILSON, M., AND LINDOW, S.E. Plant species and plant incubation conditions influence variability in epiphytic bacterial population size. **Microbiology Ecology**. 39:1-11, 2000.

KUKLINSKY –SOBRAL, J. ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**. 12:1244-1251, 2004.

KUSS, A. V. **Fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas em cultivares de arroz irrigado**. Tese (Doutorado em Ciência do solo). Santa Catarina: Rio Grande do Sul. 2006.

LACAVALA, P. T.; ANDREOTE, F. D.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 41:637-642, 2006.

LAMB, E. J., G. A. BOXSHALL, P. J. MILL, AND J. GRAHAME. Nucellicolidae: A new family of endoparasitic copepods (Poecilistomatoida) from the dog whelk *Nucella lapillus* (Gastropoda). **Journal of Crustacean Biology**. 16:142-148, 1996.

LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F. Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microbiology Ecology**. 61:606–618, 2011.

MAEYER, K.; D'AES, J.; HUA, G. K. H.; PERNEEL, M.; VANHAECKE, L.; NOPPE, H.; HOFTE, M. N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing signalling in antagonistic phenazine-producing *Pseudomonas* isolates from the red cocoyam rhizosphere. **Microbiology**. 157:459-472, 2011.

MARQUES, A. S. A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON, R. (2008). BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology**. 31:106-115.

MARQUES, D. **Guia da cana-de-açúcar/Avanço científico beneficia o país**. Conselho de Informações sobre Biotecnologia. 2009. Disponível em: http://www.cib.org.br/pdf/guia_cana.pdf.

MAGNANI, G. S.; DIDONET, C. M.; CRUZ, L. M.; PICHETH, C. F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**. 9:250-258, 2010.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAUJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. 73:7259-7267, 2007.

MEINTANIS, C.; CHALKOU, K.I.; KORMAS, K. AR.; LYMPEROPOULOU, D.S.; KATSIFAS, E.A.; HATZINIKOLAOU, D.G.; KARAGOUNI, A. D. Application of *rpoB* sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillus*. **Letters in Applied Microbiology**. 46:395-401, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. MinasGerais: Editora UFLA, 2006. 729p.

NADELL, C. D.; XAVIER, J. B.; LEVIN, S. A.; FOSTER, K. R. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. **Plos Biology**. 6:1-14, 2008.

NADELL, C. D; XAVIER, J. B; LEVIN, S. A; FOSTER, K. R. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. **PLoS Biology**. 6:1-14, 2008.

NORMAND, P.; LAPIERRE, P.; TISA, L. S.; GOGARTEN, J. P.; ALLOISIO, N.; BAGNAROL, E.; BASSI, C. A.; BERRY, A. M.; BICKHART, D. M.; CHOISNE,

N.; COULOUX, A.; COURNOYER, B.; CRUVEILLER, S.; DAUBIN, V.; DEMANGE, N.; FRANCINO, M. P.; GOLTSMAN, E.; HUANG, Y.; KOPP, O. R.; LABARRE, L.; LAPIDUS, A.; LAVIRE, C.; MARECHAL, J.; MARTINEZ, M.; MASTRONUNZIO, J. E.; MULLIN, B. C.; NIEMANN, J.; PUJIC, P.; RAWNSLEY, T.; ROUY, Z.; SCHENOWITZ, C.; SELLSTEDT, A.; TAVARES, F.; TOMKINS, J. P.; VALLENET, D.; VALVERDE, C.; WALL, L. G.; WANG, Y.; MEDIGUE, C.; BENSON, D. R. Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. **Genome Research**. 17:7-15, 2007.

NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. **Fertilidade do Solo. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. 2007, 1017p.

OLIVEIRA, P. J.; SILVA, M. L. R. B.; LIRA, M. C. C. P.; BURITY, H. A. **Fixação de N₂ associativa e em vida livre**. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. *Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. 2008, p. 97- 118.

PEDRAZA, R.O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. 125:25-35, 2008.

PINTON, R.; DIAS, A.; XAVIER, T. F.; ROUWS, L. F. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; RIBEIRO, R. L. D. Caracterização morfo cultural, biossíntese de autoindutor e formação de biofilme por rizobactérias de hortaliças. **Pesquisa agropecuária brasileira**. 45: 284-293, 2010.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKLETON, R.P.; GREEN, J.L.; GREEN, L.E.; KILLHAM, K.; LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P.W. Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**. 5:384-392, 2007.

REIS JUNIOR, F. B.; FARIA, S. M.; MENDES, I. C.; SIMON, M. F.; LOUREIRO, M. F.; ELLIOT, G. N.; YOUNG, P.; SPRENT, J. **“Beta-Rizóbios”**: os novos simbiotes encontrados em espécies de *Mimosa*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados (Documentos 153). 2006, 20 p.

REIS JUNIOR, B. F.; MENDES, I.C.; REIS, V. M.; HUNGRIA, M. **Fixação Biológica de Nitrogênio: uma revolução na agricultura**. Distrito Federal: Embrapa Cerrados. 2008, 32p.

REITH, F.; LENGKE, M. F.; FALCONER, D.; CRAW, D.; SOUTHAM, G. The geomicrobiology of gold. **The International Society for Microbial Ecology (ISME) Journal**. 1:567-584, 2007.

RODRIGUES, L. S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 41:275-284, 2006.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN, Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. **Developments in Plant and Soil Sciences**. 102: 15-21, 2007.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C.; XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. 33: 35-50, 2004.

SALA, V.M.R. **Resposta da cultura do trigo aos novos endófitos, *Achromobacter* e *Zoogloea*, em condições de campo**. Tese (Doutorado), Esalq-USP, Piracicaba, 2007.

SALLES, J. F.; SOUZA, F. A.; VAN ELSAS, J. D. Molecular Method To Assess the diversity of Burkholderia Species in Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**. 68:1595-1603, 2002.

SAITO, A.; IKEDA, S.; EZURA, H.; MINAMISAWA, K. Microbial community analysis of the phytosphere using culture-independent methodologies. **Microbes and Environments**. 22:93-105, 2007.

SANTOS, J.M.; PIETRAFESA, J.P.; CAMPOS, F.I. **Cultura da cana-de-açúcar, créditos de carbono e desafios do desenvolvimento sustentável**. Dissertação (Mestrado multidisciplinar em sociedade, tecnologia e meio ambiente). Anápolis: Unievangélica, 2008.

SAHARAN, B. S. & NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**. 21: 1-30, (2011).

SARAVANAN, V.S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T.M. Ecological Occurrence of Gluconacetobacter diazotrophicus and Nitrogen-fixing Acetobacteraceae Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**. 55:130-140, 2008.

SENTHILKUMAR, M.; ANANDHAM, R.; MADHAIYAN, M.; VENKATESWARAN, V.; SA, T. Endophytic Bacteria: Perspectives and Applications in Agricultural Crop Production, 61-96 p. in: MAHESHWARI, D. K. Bacteria in agrobiolgy: Crop ecosystems. 2011, 434 p.

SILVA, M. F. **Uso de inoculante polimérico contendo bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Seropédica: Rio de Janeiro. 2009.

SOUZA, C. E. S.; SILVA, M. O.; DUDA, G. P.; MENDES, A. M. S. M. Solubilização de fósforo de fertilizantes fosfatados após tratamento com diferentes resíduos orgânicos. **Revista de biologia e ciência da terra**. 7:120-126, 2007.

STURZ, A.V., CHRISTIE, B.R., AND NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 19:1-30, 2000.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R. et al., 3° ed., Porto Alegre: Artemed, 2004, 719 p.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F.; The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant Soil**. 347:1-400, 2011.

TILAK, S., ABU-GHAZALEH, N. & HEINZELMAN, W.B. **Storage management in wireless sensor networks**. Mobile, Wireless and Sensor Networks, John Wiley publishers, 2006.

TIRONI, S.P.; REIS, M.R.; GALON, L.; FREITAS, M.A.M.; COSTA, M.D.; SILVA, A.A.; BARBOSA, M.H.P.; PETERNELLI, L.A. Ação de herbicidas na atividade de bactérias solubilizadoras de fosfato da rizosfera de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**. 27:747-754, 2009.

VALE, F. F.; ENCARNACÃO, P.; VÍTOR, J. M. B. A new algorithm for cluster analysis of genomic methylation: the *Helicobacter pylori* case. **Genetics and population analysis**. 24:383-388, 2008.

WOESE, C.R. There must be a prokaryote somewhere - microbiologists search for itself. **Microbiology Reviews**. 58:1-9, 1994.

XAVIER, J. B.; FOSTER, K. R. Cooperation and conflict in microbial biofilms. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America – PNAS**. 104:876-881, 2007.

YARYURA, P. M.; LEÓN, M.; CORREA, O. S.; KERBER, N. L.; PUCHEU, N. L.; GARCÍA, A. F. Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for Colonization of Roots and Seeds of Soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. **Current Microbiology**. 56:625-632, 2008.

3. CAPÍTULO I

Diversidade genética de bactérias diazotróficas associadas a variedades de cana soca cultivadas em Pernambuco

LIMA, DANUBIA RAMOS MOREIRA DE. MSc. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Fevereiro de 2012. Capítulo 1. Diversidade genética de bactérias diazotróficas associadas a variedades de cana soca cultivadas em Pernambuco. Orientadora: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral. Conselheiros: Prof. Dr. Fernando José Freire.

RESUMO

As bactérias exercem inúmeras funções, como a fixação biológica de nitrogênio, e estão presentes nos diferentes habitats, fato este que pode ser devido a elevada diversidade genética que falta ser elucidada e explorada completamente, principalmente em associação com plantas não leguminosas, como a cana-de-açúcar. Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivos isolar, identificar e avaliar a densidade populacional de bactérias potencialmente diazotróficas; avaliar a variabilidade genética cultivável e não cultivável da comunidade bacteriana potencialmente diazotrófica da rizosfera e endofítica de raiz de cana soca das variedades RB92579 e RB867515, cultivadas em Pernambuco. O isolamento foi realizado em meio NFb e a densidade populacional estimada por meio do número mais provável, posteriormente sendo realizada a purificação e estocagem das bactérias. A variabilidade genética bacteriana foi avaliada pela técnica de BOX-PCR e a diversidade da comunidade bacteriana não cultivável pela técnica de DGGE, do gene 16S rRNA e do gene *nifH*. A densidade populacional de bactérias diazotróficas foi elevada no habitat rizosférico e endofítico de raiz, independente do tempo de cultivo, bem como, nas variedades RB92579 e RB867515. O presente trabalho encontrou a presença de gêneros, tais como, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* e *Dyella* em plantas de cana soca. As bactérias isoladas em meio NFb semi-sólido, oriundas da rizosfera e de raízes de plantas soca de cana-de-açúcar da variedade RB92579 e RB867515, aos 4 e 10 meses, apresentaram elevada variabilidade genética pela técnica de BOX-PCR. A técnica de PCR-DGGE para os genes 16S rRNA e *nifH* de cultivos de cana soca apresentou elevada diversidade genética nos agrupamentos formados, ou seja, alta variabilidade do gene ribossomal e do gene funcional da fixação biológica de nitrogênio. Portanto, plantas de cana soca, cultivadas em

Pernambuco, apresentam associação com bactérias potencialmente diazotróficas com alta densidade populacional e variabilidade genética.

Palavras-chave: BOX-PCR, DGGE, fixação biológica de nitrogênio, variabilidade genética.

LIMA, DANUBIA RAMOS MOREIRA DE. MSc.at Universidade Federal Rural de Pernambuco, February 2012. Chapter 1 – Genetic diversity of diazotrophic bacteria associated with ratoon sugar cane varieties cultivated in Pernambuco. Advise: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral. Co-Adviser: Prof. Dr. Fernando José Freire.

ABSTRACT

Perform bacteria many functions, such as nitrogen fixation, and are present different habitats, a fact that may be due to high genetic diversity that remains to be elucidated and fully explored, especially in association with non-leguminous plants, such as sugar cane. Given this context this study aimed to isolate, to identify and evaluate the population of diazotrophic bacteria potentially, to evaluate the genetic variability of cultivable and uncultivable bacterial community potentially diazotrophic rhizosphere and root endophytic cane sugar ratoon varieties RB92579 and RB867515 grow in Pernambuco. The isolation was carried through NFB and population density estimated by the number most likely being held later purification and storage of bacteria. The bacterial genetic diversity was assessed by BOX-PCR technique and diversity of uncultivable bacterial community by DGGE technique, the 16S rRNA and *nifH*. The population density of potentially diazotrophic bacteria was high in the habitat rhizospheric and endophytic root, regard less of time of cultivation, as well as the varieties RB92579 and RB867515. The study found the presence of genera such as *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* and *Dyeila* in ratoon sugar cane plants. Bacteria isolated in semisolid Nfb medium, derived from the rhizosphere and roots of plants ratoon sugar cane variety RB92579 and RB867515, at 4 and 10 months, showed high genetic variability by BOX-PCR technique. THE PCR-DGGE for 16S rRNA and *nifH* in ratoon cane showed high genetic diversity in the groups formed, on be high variability of their ribosomal gene and functional gene biological nitrogen fixation. Therefore, plants of sugar cane in Pernambuco cultivated have associated with potentially diazotrophic bacteria with high population density and genetic variability.

Keywords: biological nitrogen fixation, BOX-PCR, DGGE, genetic variability.

3.1. INTRODUÇÃO

As bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas podem ser divididas em organismos rizosféricos, que são aqueles que colonizam próximo às raízes (FRANCHE, 2009); endofíticos, que são capazes de colonizar o interior de raízes e também a parte aérea das plantas (KUKLINSKY-SOBRALE et al., 2004; BALDANI & BALDANI, 2005), e epifíticos, que colonizam a superfície dos tecidos vegetais (BALDANI et al., 1997; ELMERICH & NEWTON, 2007). Geralmente, essas bactérias são encontradas em maior número na rizosfera, endofiticamente nas raízes e, posteriormente, decrescem progressivamente do caule às folhas (LAMB et al., 1996; 2004; GOMES et al., 2005), corroborando com estudos feitos por Kuklinsky-Sobral et al. (2004) que avaliaram plantas de soja. Semelhantemente Mendes et al. (2007) analisando endofíticos de raízes e colmo de cana-de-açúcar observaram que a densidade populacional bacteriana decresceu do colmo às raízes. Gasser et al. (2011) observou uma população bacteriana significativa para a colonização da rizosfera e raízes de cana-de-açúcar que variaram a densidade populacional de acordo com as partes colonizadas levando em conta as partes velhas e jovens das raízes. Também foi observado abundantes micro-colônias ao longo dos espaços dos apoplasto e pequena colonização nos vasos do xilema.

A literatura relata a exploração, preferencial, das raízes e regiões próximas das plantas para a realização de estudos de bioprospecção da diversidade microbiana e do potencial biotecnológico, com ampla aplicação de técnicas moleculares para a identificação dessa diversidade, e da busca de estirpes, que quando reinoculadas sejam eficientes, por exemplo, na fixação biológica de nitrogênio (HERRIDGE et al., 2008; RICHARDSON et al., 2009; CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011). Como consequência dessa simbiose, geralmente a planta hospedeira é beneficiada com o nitrogênio fixado, incorporando-o nos diferentes compostos bioquímicos presentes na célula vegetal (TAIZ & ZIEGER, 2004; HUNGRIA et al., 2007; RICHARDSON et al., 2009;), e desta forma desencadeando benefícios nos diferentes sistemas produtivos, suprimindo as necessidades dos vegetais, reduzindo o uso de

fertilizantes e, até mesmo deixando de utilizá-lo, obtendo vantagens no setor econômico e ecológico (REIS JUNIOR et al., 2008; RICHARDSON et al., 2009; URQUIAGA et al., 2011).

É sabido que as bactérias exercem inúmeras funções e, estas, estão presentes nos diferentes habitats, fato este que pode ser ocasionado por causa da enorme diversidade genética que falta ser elucidada e explorada completamente (PROSSER et al., 2007). É importante que o estudo das relações filogenéticas e da diversidade dos genes bacterianos seja baseado não apenas na preocupação taxonômica, mas também na necessidade de explorar completamente o potencial biotecnológico (MEITANIS et al., 2008), obter informações sobre a diversidade genética bacteriana que possibilitem o estudo filogenético e a caracterização da comunidade bacteriana existente no ambiente (WOESE et al., 1994; VALE et al., 2008).

A variabilidade genética bacteriana pode ser avaliada por técnicas de biologia molecular como o BOX-PCR, que amplifica regiões repetidas encontradas no genoma bacteriano, designadas de elementos Box (MARQUES et al., 2008); e a técnica PCR-DGGE (*Polimerase Chain Reaction – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), que possibilita o acesso à diversidade genética de populações microbianas oriundas diretamente do meio ambiente, sem a necessidade do cultivo em laboratório (SALLES et al., 2002; LACAVA et al., 2006).

Para tanto, é necessária a realização de pesquisas que ampliem o conhecimento acerca da diversidade bacteriana existente nos diferentes nichos ecológicos e que visem elucidar e identificar os microrganismos existentes na interação solo-planta. Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivos: isolar bactérias diazotróficas, estimar a densidade populacional e avaliar a diversidade genética bacteriana dependente e independente de cultivo, por meio das técnicas de BOX-PCR e DGGE dos genes 16S rRNA e *nifH*, da comunidade bacteriana associada a plantas de cana soca cultivadas em Pernambuco.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. *Material vegetal e isolamento bacteriano*

Amostras de solo rizosférico (0-20 cm de profundidade) e de raízes de cana-de-açúcar de duas variedades (RB92579 e RB867515), com 4 meses e 10 meses de cultivo, após a primeira rebrota, foram coletadas na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Carpina/Pernambuco, (7°51'03"S e 35°15'17"O). Após a coleta, as amostras foram levadas para o Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE) para o isolamento de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio.

Para o isolamento de bactérias endofíticas, as amostras das raízes foram lavadas em água corrente para a retirada de resíduos de solo, em seguida passaram por um processo de desinfecção superficial, onde aproximadamente 3g de raízes, de cada amostra, foram imersas em álcool 70% por 1min, depois em hipoclorito de sódio (entre 2 a 2,5% do cloro ativo) por 3min, e novamente submersas em álcool 70% por 30seg, e, ao término do processo, passaram por duas lavagens em água destilada estéril.

Em seguida, as amostras de raiz foram cortadas, assepticamente, em pequenos fragmentos e triturados em 10 mL de tampão *Phosphate Buffered Saline* (PBS), segundo Araújo et al. (2001), com o auxílio de pistilos e almofarizes. Já para o isolamento das bactérias rizosféricas pesou-se 5 g de solo e transferiu-se para 25 mL de tampão PBS. Após o processo, ambas as suspensões, oriundas da rizosfera e das raízes, foram agitadas constantemente em 120rpm, a 28°C por 40min. Após esta etapa, 100 µL desta solução foi inoculada, em triplicatas, em meio semi-sólido NFb, livre de fonte nitrogenada, seletivo para bactérias diazotróficas, e incubados a 28°C, por 8 dias, e repicadas para novos tubos com meio semi-sólido NFb e incubadas por mais 8 dias (Dobereiner *et al.*, 1995). A purificação das colônias foi realizada através da técnica de esgotamento por estrias em meio NFb sólido, acrescido de extrato de levedura (20mg/L), e os isolados bacterianos foram armazenadas

em meio TSA sólido, e acondicionadas a 4°C, além de serem estocadas a -20°C, em meio líquido TSA, acrescido de glicerol 20%.

Tabela 3.1. Propriedades químicas e físicas do solo rizosférico de cultivo de cana-de-açúcar oriundo da Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Carpina/Pernambuco, (7°51'03"S e 35°15'17"O). (Análise realizada por prestação de serviços de laboratório especializado.)

Química											Física			
pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H + Al	SB	CTC	V1	Areia	Silte	Argila	Classe textural
	mg kg ⁻¹ cmol _c Kg ⁻¹					%				g Kg ⁻¹		
5,6	5,83	0,09	0,39	1,70	1,70	0,10	2,81	3,88	6,68	58,0	742,3	73,5	184,2	Franco arenosa

Tabela 3.2. Características gerais das variedades, RB92579 e RB867515, de cana-de-açúcar (RIDESA, 2010).

Variedade	Características							
	Produtividade	Perfilhamento	Brotação	Velocidade crescimento	Porte	Maturação	Teor de sacarose	Teor de fibra
RB92579	Alta	Alto	Boa	Lento	Alto	Média tardia	Alto	Médio
RB867515	Alta	Médio	Boa	Rápido	Alto	Média tardia	Alto	Médio

3.2.2. Densidade populacional bacteriana

A densidade populacional bacteriana foi estimada pelo método do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas em unidades formadoras de colônias por mililitro do meio NFb (UFC/mL), segundo a classificação de McCrady (DOBEREINER et al., 1995).

3.2.3. Identificação dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos selecionados foram levados para o Laboratório do Dr. Fernando Andreote (ESALQ/USP) e preparados para o sequenciamento parcial do 16S rRNA com o *primers* 1492R. As seqüências foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information website* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]) e pelo RDPQuery (<http://www.rdp.cme.msu.edu/>).

3.2.4. Análise da diversidade genética pela técnica de BOX-PCR

Para esta análise, o DNA genômico das bactérias foi extraído por meio da utilização do Genomic DNA Purification Kit (Fermentas), segundo recomendações do fabricante.

A reação de PCR foi realizada com o *primer* BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), em um volume final de 25 µL contendo 0,5 a 10 ng de DNA molde; 1 µM do primer; 1 mM de cada dNTPs; 1x de DMSO (dimetilsufoxamida); 1x do tampão da enzima *Taq Buffer*, 3,5 mM de MgCl₂ e 0,08U da enzima *Taq* DNA polimerase (Fermentas). A reação de amplificação foi realizada em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial a 95°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 2 min, 92°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 min e extensão de *primer* a 65°C por 1 min, seguida de extensão final a 65°C por 10 min. Após a amplificação, a reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,5% p/v) em tampão 1x TAE (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA) e corado com *Blue green loading dye* (LGC Bio), segundo especificações do fabricante, observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado.

3.2.5. Análise da comunidade bacteriana diazotrófica independente de cultivo por DGGE

Foram analisadas as mesmas amostras de solo e de raiz utilizadas para o isolamento de bactérias diazotróficas, relatado no item 3.2.1. A extração do DNA total das amostras de solo rizosférico e das raízes, desinfectadas superficialmente, foi realizada utilizando-se o 'Power Soil DNA kit' (MoBio; EUA), seguindo a metodologia descrita pelo fabricante. Após a extração, a integridade e a qualidade dos DNAs foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% (w/v) em tampão TAE 1x.

3.2.5.1. PCR do gene 16S rRNA

As reações de PCR para a análise de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) do gene 16S rRNA foram realizadas para um volume final de 50 µL, utilizando cerca de 10 ng do DNA total do solo, 0,2 µM dos *primers* 338F-GC (5'-GC-grampo ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') e R518 (5' - ATTACCGCGGCTGCTGG- '3), específicos para o gene 16S rRNA; 0,2 mM de cada dNTPs ; 5,0 µL de Taq 85 buffer 10X; 1,5 mM de MgCl₂ e 2,5U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas). Em seguida, a reação foi levada ao termociclador, com a seguinte condição de ciclo: 1 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 92 °C; 1 min a 55 °C; 1 min a 72 °C e 10 min a 72 °C.

Para a análise da comunidade bacteriana independente de cultivo endofítica de raiz, foram realizadas duas reações de PCR, cada uma para um volume final de 50 µL; utilizando-se cerca de 20 ng do DNA total da raiz e do produto da 1ª reação de PCR, respectivamente; e *primers* específicos. Na 1ª PCR foi utilizado 0,1 µM dos *primers* 799f (5'-AACMGGATTAGATACCKG) e 1492r (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT) (100 mM); 2 µL de dNTPs 2,5 mM ; 1,87 µL de MgCl₂ 25 mM; 2,5 µL de Taq buffer; e 0,3 µL de 5U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas). Em seguida, a reação foi levada ao termociclador, com a seguinte condição de ciclo: 3 min a 95°C; 30 ciclos de 20 seg a 94 °C; 40 seg a 53 °C; 40 seg a 72 °C e 7 min a 72 °C. E para a 2ª PCR, foi utilizado 0,2 µM dos *primers* F968-GC (5'-AACGCGAAGAACCT TAC-3' com o grampo GC na extremidade 5') e pR 1387 (5'-GCCCGGGAACGTATTCACCG-3') (100 mM); 4 µL de dNTPs 25 mM ; 5µL de MgCl₂ 25 mM; 5 µL de Taq buffer 10x; 0,5 µL de formamida; e 0,5 µL da

enzima Taq DNA polimerase (Fermentas). Posteriormente, as reações foram levadas ao termociclador, com a seguinte condição de ciclo: 4 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 56 °C; 2 min a 72 °C e 10 min a 72 °C.

3.2.5.2. PCR do gene *nifH*

Para a amplificação do gene *nifH* foram utilizados os *primers* FGPH19 (5'-TACGGCAARGGTGGNATH-3') e PolR (5'-ATSGCCATCATYTCCCG-3'). A amplificação ocorreu em 25 µL de volume final, contendo 2 µL de dNTP 2,5 mM; 2,5 µL de Taq Buffer (Fermentas); 2,5 mM de MgCl₂; 0,05 µL de BSA (bovine serum albumin), 5 µL de 5U µL⁻¹ de Taq DNA Polimerase (Fermentas); 0,125 µL de cada *primer* (10 pmoles µL⁻¹) e 10 ng de DNA total do solo ou da raiz, sendo o restante do volume completado com água ultra pura autoclavada. As condições da amplificação foram: 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 56 °C; 2 min a 72 °C e 30 min a 72 °C.

O produto da amplificação, os amplicons, foram utilizados numa segunda reação de PCR para o gene *nifH*, utilizando os *primers* PolF-GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCCCGCCCCTGCGAYCC SAARGCBGACTC-3') e AQER (5'-ACGATGTAGATYTCCTG-3'). A amplificação ocorreu em 50 µL de volume final, contendo: 4 µL de dNTP 2,5 mM; 5 µL de Taq Buffer (Fermentas); 2,0 mM de MgCl₂; 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (Fermentas); 0,250 µL de cada *primer* (10 pmoles µL⁻¹) e 2 µL do PCR da 1^o reação (10 ng de DNA), sendo o restante do volume completado com água ultra pura autoclavada. Os ciclos de amplificação foram 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 1 min a 94 °C; 1 min a 48 °C; 2 min a 72 °C e 30 min a 72 °C.

Todos os produtos de PCR, cerca de 10 µL da reação, foram verificados em gel de agarose 1% em TAE 1x, para confirmação da amplificação do produto desejado.

3.2.5.3. Análise por DGGE

As análises por DGGE foram realizadas no equipamento Ingeny PhorU System (Ingeny, Goes, The Netherlands). Para a análise, foram preparados géis de poliacrilamida 6% (w/v), com gradiente desnaturante de 45 a 65% para o produto do PCR do gene 16S rRNA e de 40 a 65% para o do gene *nifH*.

Os géis foram submetidos à eletroforese por 16 h a 100 e 75 Volts para o gene 16S rRNA e *nifH*, respectivamente, à temperatura de 60 °C. Após a corrida da eletroforese, os géis foram corados com SYBR-gold (Invitrogen, Breda, The Netherlands) e TAE 1x na proporção de 1:10000 por 30 min e fotodocumentados.

3.2.6. Análise estatística

Os dados da densidade populacional, organizados em arranjo fatorial 2x2 com 3 repetições (2 nichos x 2 variedades) foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) pelo o software estatístico SISVAR[®] versão 5.3.

Por meio da análise dos géis de agarose e de poliacrilamida, as bandas observadas pela amplificação foram transformadas em dados binários e, a partir destes dados, foi construída uma planilha, analisada pelo software Past 1.90 (HAMMER et al., 2001), empregando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) e aplicado o Coeficiente de Jaccard para análise da matriz de similaridade entre as bactérias analisadas.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Isolamento, densidade populacional e identificação de bactérias diazotróficas

A densidade populacional da comunidade bacteriana potencialmente diazotrófica isoladas em meio NFb variou de $6,5 \times 10^5$ a $4,0 \times 10^7$ e $8,4 \times 10^5$ a $5,2 \times 10^6$ de UFC/mL isolada aos 4 e 10 meses de cultivo da cana soca, respectivamente, em ambas as variedades de cana-de-açúcar e nos diferentes nichos de colonização (Figura 3.1).

A estimativa do NMP da densidade populacional bacteriana potencialmente diazotrófica isolada da rizosfera e de raízes de plantas de cana soca, das variedades RB92579 e RB867515, não diferiu estatisticamente quando comparado os valores médios totais, independente das variedades de cana-de-açúcar e idade fenológica da planta, e para os nichos avaliados,

apenas, aos 10 meses de cultivo. Já para a variedade RB867515, aos quatro meses de cultivo, a densidade bacteriana da rizosfera foi estatisticamente maior que a densidade de bactérias endofíticas de raiz (Figura 3.1). Diante deste resultado poderia especular que o maior valor da densidade populacional bacteriana rizosférica aos 4 meses de cultivo pode ser porque a rizosfera é um nicho que possui elevada densidade de bactérias que sobrepõe o quantitativo populacional dos nichos endofíticos; e/ou porque inicialmente as bactérias rizosféricas tiveram dificuldade em penetrar nas raízes das plantas hospedeiras na fase fenológica inicial do desenvolvimento, com posterior penetração e consequente equilíbrio da densidade populacional das bactérias rizosféricas e endofíticas, não apresentando diferença significativa em idade fenológica mais avançada.

A variedade RB92579 tendeu a apresentar os maiores concentrações de isolados bacterianos potencialmente diazotróficos em ambos os nichos, nos diferentes tempos de cultivos da cana soca (Figura 3.1).

Comparando os diferentes nichos, pode-se observar que os maiores valores foram encontrados na rizosfera em ambas as variedades da planta hospedeira e idade fenológica da planta (Figura 3.1).

Após a estimativa do NMP, foi realizada a purificação das colônias através da técnica de esgotamento por estrias em meio NFb sólido acrescido com extrato de levedura, obtendo-se no 1º isolamento, 78 isolados bacterianos; sendo 47 rizosféricos e 32 endofíticos de raiz, e no 2º isolamento, 47 isolados bacterianos; sendo 21 rizosféricas e 26 endofíticas de raiz, aos 4 e 10 meses de idade de cultivo das plantas, respectivamente. As bactérias isoladas foram armazenadas em meio TSA sólido, e acondicionadas a 4°C, além de serem estocadas a -20°C, em meio líquido TSA, acrescido de glicerol 20%.

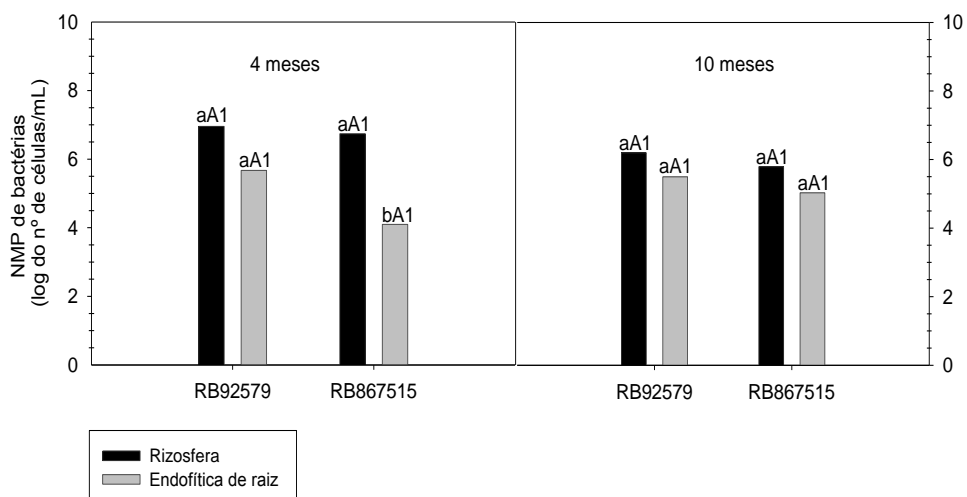


Figura 3.1. Densidade populacional estimada pelo número mais provável de bactérias diazotróficas de dois nichos (endofíticas de raiz e rizosfera) em duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579 e RB867515) aos 4 e 10 meses de cultivo. Letras minúsculas comparam os nichos por variedade, letras maiúsculas entre as variedades por tempo de cultivo e os números arábicos estão para as médias obtidas para ambas as idades fenológicas das plantas. Médias seguidas por letras ou números iguais não diferem pelo Teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Na tabela 3.2 pode-se observar elevada diversidade nas linhagens identificadas aos 4 e 10 meses de cultivo. Aos 4 meses de cultivo identificou-se a presença de *Burkholderia* sp., *Pantoea* sp., *Bacillus* sp., *Erwinia* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. totalizando a presença de 7 gêneros. Já aos 10 meses de cultivo foi identificada a presença de 6 gêneros bacterianos, tais como, *Burkholderia* sp., *Pantoea* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. e *Dyeila* sp.

A distribuição das linhagens identificadas aos 4 meses de cultivo, de acordo com as variedades, foi diversificada, diferentemente ocorreu com as linhagens identificadas e isoladas aos 10 meses de cultivo, pois pode-se observar que houve uma tendência na distribuição dos gêneros de acordo com a variedade, pois a *Pantoea* sp. foi mais frequente na RB92579 e a *Enterobacter* sp. na RB867515, respectivamente (Tabela 3.2).

Tabela 3.3. Identificação de linhagens bacterianas isoladas de cana soca cultivadas em Pernambuco.

Linhagem	Identificação	Similaridade %	Identificação do banco de dados	Origem		
				Nicho	Variedade	Tempo de cultivo
UAGC 857	<i>Burkholderia</i> sp.	92	S000487836	endofítico de raiz	RB92579	4 meses
UAGC 858	<i>Pantoea</i> sp.	88	S001874630	endofítico de raiz	RB92579	4 meses
UAGC 863	<i>Bacillus</i> sp.	91	S002418749	endofítico de raiz	RB92579	4 meses
UAGC 865	<i>Erwinia</i> sp.	92	S001351587	endofítico de raiz	RB92579	4 meses
UAGC 867	<i>Burkholderia</i> sp.	79	S000383215	endofítico de raiz	RB867515	4 meses
UAGC 869	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	62	S002355610	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 871	<i>Burkholderia</i> sp.	85	S002912729	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 879	<i>Enterobacter</i> sp.	85	S000776530	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 882	<i>Pantoea</i> sp.	84	S000859605	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 890	—	—	—	rizosfera	RB92579	4 meses
UAGC 895	<i>Burkholderia</i> sp.	89	S002410252	endofítico de raiz	RB92579	4 meses
UAGC 897	<i>Enterobacter</i> sp.	90	S000712429	endofítico de raiz	RB92579	4 meses
UAGC 901	<i>Enterobacter</i> sp.	84	S001612963	endofítico de raiz	RB92579	4 meses
UAGC 902	<i>Pseudomonas</i> sp.	87	S001016118	endofítico de raiz	RB92579	4 meses
UAGC 903	<i>Enterobacter</i> sp.	91	S001796219	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 904	<i>Burkholderia</i> sp.	87	S000135150	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 906	<i>Pantoea</i> sp.	92	S000730947	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 907	<i>Pantoea</i> sp.	93	S000730947	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 908	<i>Pantoea</i> sp.	86	S001610485	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 913	<i>Burkholderia</i> sp.	76	S000135150	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 917	<i>Enterobacter</i> sp.	87	S000013880	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 918	<i>Enterobacter</i> sp.	84	S002033704	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 923	<i>Enterobacter</i> sp.	73	S000769724	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 925	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	56	S002355610	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 926	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	80	S000859127	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 929	<i>Enterobacter</i> sp.	82	S002409998	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 930	<i>Enterobacter</i> sp.	92	S001198624	rizosfera	RB867515	4 meses

UAGC 936	<i>Enterobacter</i> sp.	90	S000979987	rizosfera	RB92579	10 meses
UAGC 942	<i>Burkholderia</i> sp.	86	S002912291	rizosfera	RB92579	10 meses
UAGC 949	<i>Pseudomonas</i> sp.	92	S000587019	rizosfera	RB867515	10 meses
UAGC 950	<i>Burkholderia</i> sp.	80	S000412948	rizosfera	RB867515	10 meses
UAGC 955	<i>Enterobacter</i> sp.	84	S000825096	endofítico de raiz	RB92579	10 meses
UAGC 958	<i>Enterobacter</i> sp.	92	S002225234	endofítico de raiz	RB92579	10 meses
UAGC 959	<i>Enterobacter</i> sp.	85	S000979987	endofítico de raiz	RB92579	10 meses
UAGC 963	<i>Enterobacter</i> sp.	66	S002409999	endofítico de raiz	RB92579	10 meses
UAGC 965	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	90	S002912751	endofítico de raiz	RB867515	10 meses
UAGC 972	<i>Pantoea</i> sp.	87	S000007016	endofítico de raiz	RB867515	10 meses
UAGC 973	<i>Enterobacter</i> sp.	88	S001574750	endofítico de raiz	RB867515	10 meses
UAGC 975	<i>Pantoea</i> sp.	84	S002225599	endofítico de raiz	RB867515	10 meses
UAGC 976	<i>Pantoea</i> sp.	85	S001610485	endofítico de raiz	RB867515	10 meses
UAGC 977	<i>Pantoea</i> sp.	88	S001610485	endofítico de raiz	RB867515	10 meses
UAGC 978	<i>Pantoea</i> sp.	82	S002350240	endofítico de raiz	RB867515	10 meses
UAGC 980	<i>Dyella</i> sp.	91	S001098256	endofítico de raiz	RB92579	10 meses
UAGC 982	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	88	S002914956	endofítico de raiz	RB867515	10 meses

3.3.2. Variabilidade genética bacteriana por BOX-PCR

A técnica do BOX-PCR foi utilizada para avaliar a variabilidade genética de 77 e 34 isolados bacterianos oriundos da rizosfera e do interior das raízes, respectivamente, das variedades RB92579 e RB867515, de cana soca aos 4 e 10 meses de cultivo. Foi possível visualizar bandas entre 100 e 2000pb, geradas pela utilização do *primer* BOX A1R que amplificaram sequências repetitivas do DNA genômico bacteriano. Os perfis de bandas foram analisados com base na matriz de similaridade genética de Jaccard, sendo possível observar, nos dendrogramas gerados (Figuras 3.2 e 3.3), elevada diversidade bacteriana e baixa similaridade entre os isolados avaliados, independente do nicho de colonização e variedade avaliada.

Contudo, as linhagens endofíticas *Pantoea ananatis*, UAGC 862 da variedade RB92579 e UAGC 880, UAGC 885 da RB867515 aos 4 meses de cultivo (Figura 2); e os *Enterobacter* sp., UAGC 960 da RB92579 e as *Pantoea agglomerans* e *Pantoea* sp. da RB867515 endofíticas de raiz e *Enterobacter* sp. da rizosfera da RB867515 aos 10 meses de cultivo (Figura 3.3) apresentaram elevada similaridade genética, acima de 70%.

Os dendrogramas correspondentes aos isolados oriundos dos 4 e 10 meses de cultivo, semelhantemente, foram subdivididos em um grande grupo, composto por vários subgrupos, que correspondem a 99% das bactérias isoladas, e outra ramificação isolada com apenas uma bactéria, a *Bacillus pumilus* e *Burkholderia* sp. para 4 e 10 meses de cultivo, respectivamente (Figuras 3.2 e 3.3).

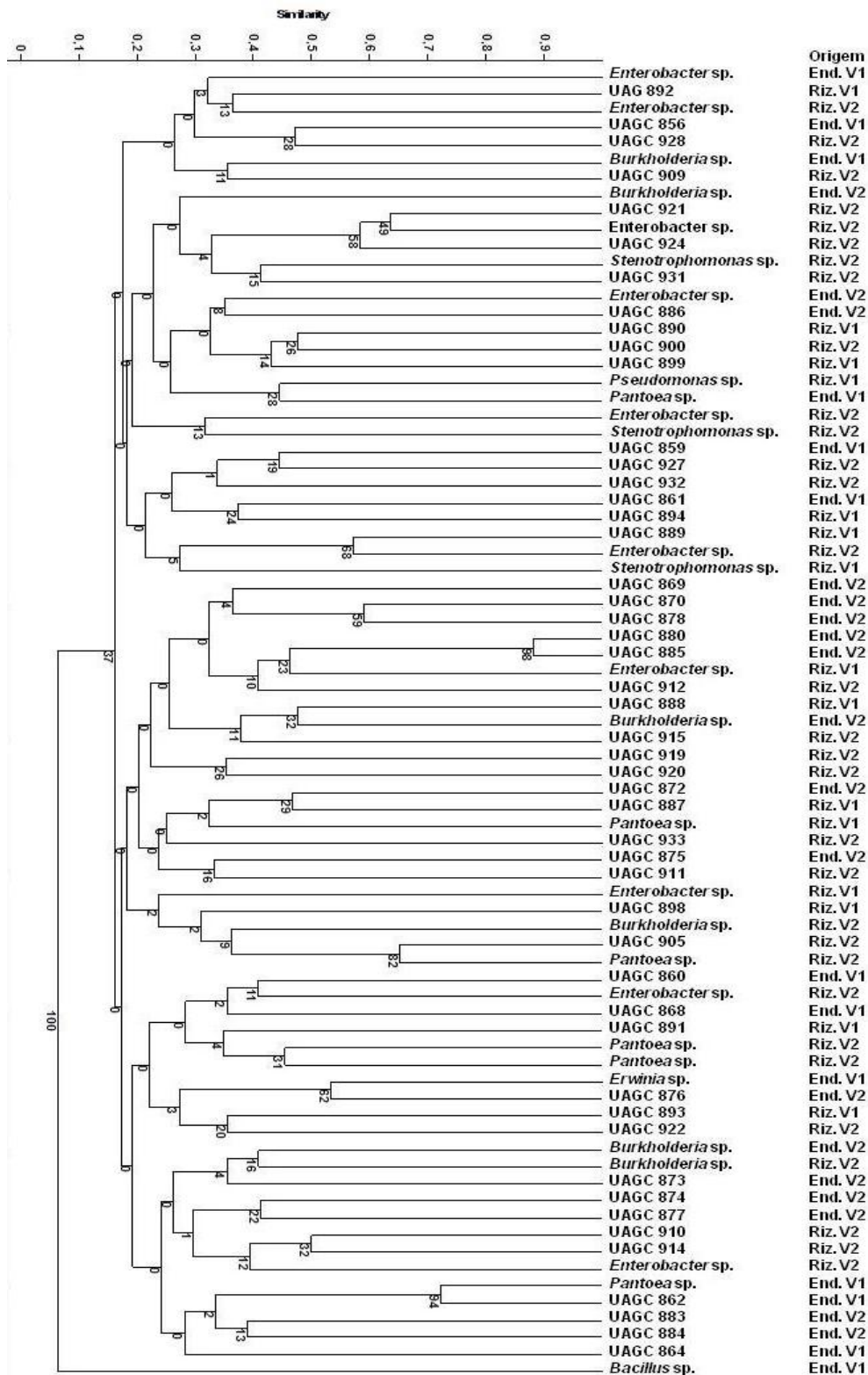


Figura 3.2. Dendrograma da diversidade genética de 77 isolados bacterianos associados à cana soca com 4 meses de idade, realizado pela técnica de BOX-PCR, e analisados através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com *bootstrap* de 1.000 vezes.

End: endofítica de raiz; Riz: Rizosfera; Variedade RB92579 (V1) e RB867515 (V2).

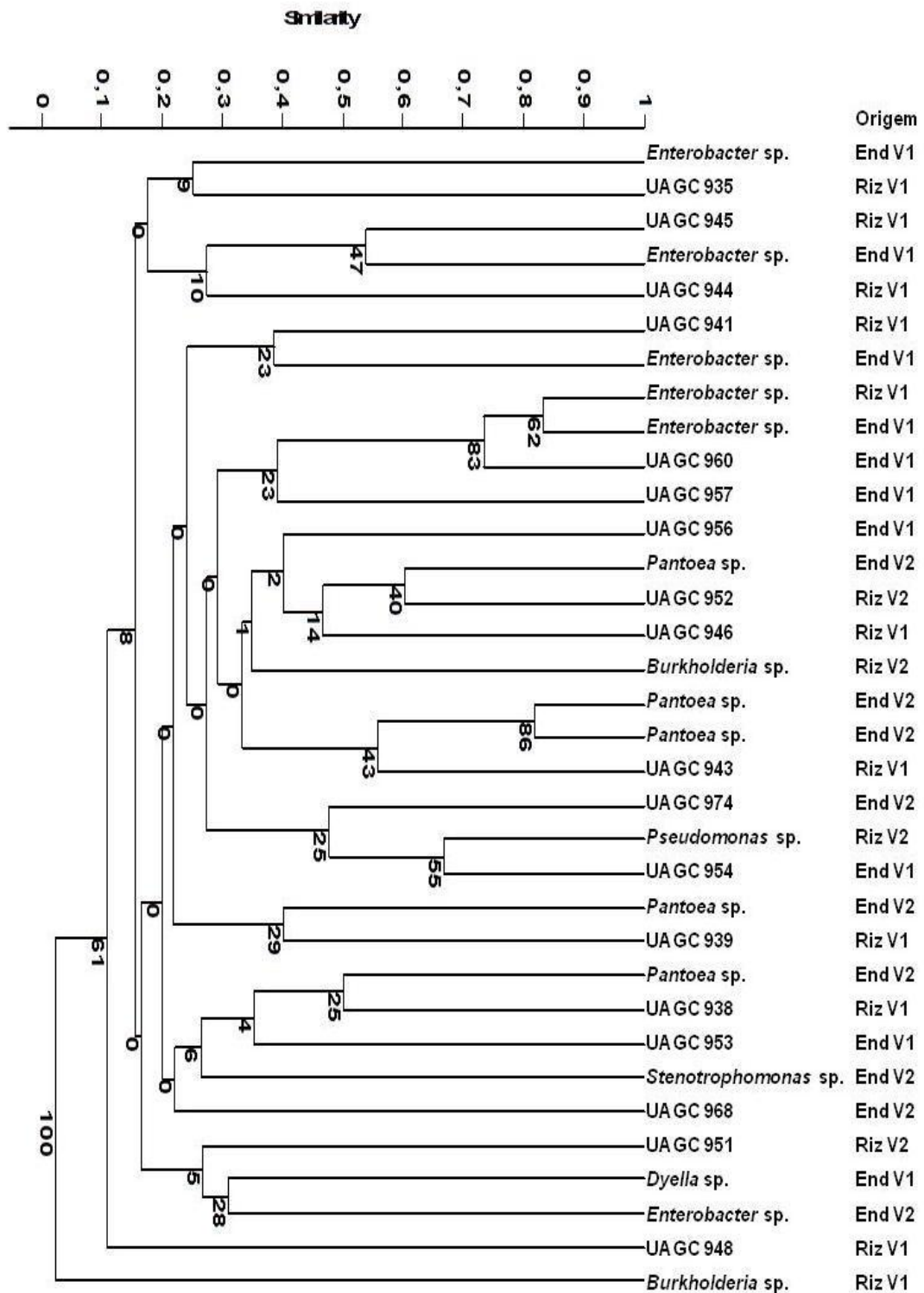


Figura 3.3. Dendrograma da diversidade genética de 34 isolados bacterianos associados à cana soca com 10 meses de idade, realizado pela técnica de BOX-PCR, e analisados através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com *bootstrap* de 1.000 VEZES. Endofítica de raiz (End); Rizosfera (Riz); Variedade RB92579 (V1) e RB867515 (V2).

3.3.3. Análise da comunidade bacteriana independente de cultivo por DGGE

A análise da comunidade bacteriana independente de cultivo por DGGE, através dos genes 16S rRNA e do *nifH*, permitiu o acesso da diversidade bacteriana total e diazotrófica endofítica de raiz e da rizosfera de plantas de cana soca cultivadas em Pernambuco. A figura 4 apresenta géis de poliacrilamida com perfis de bandas dos genes 16S rRNA (figura 3.4 A) e *nifH* (figura 3.4 B), obtidos através do uso da técnica DGGE.

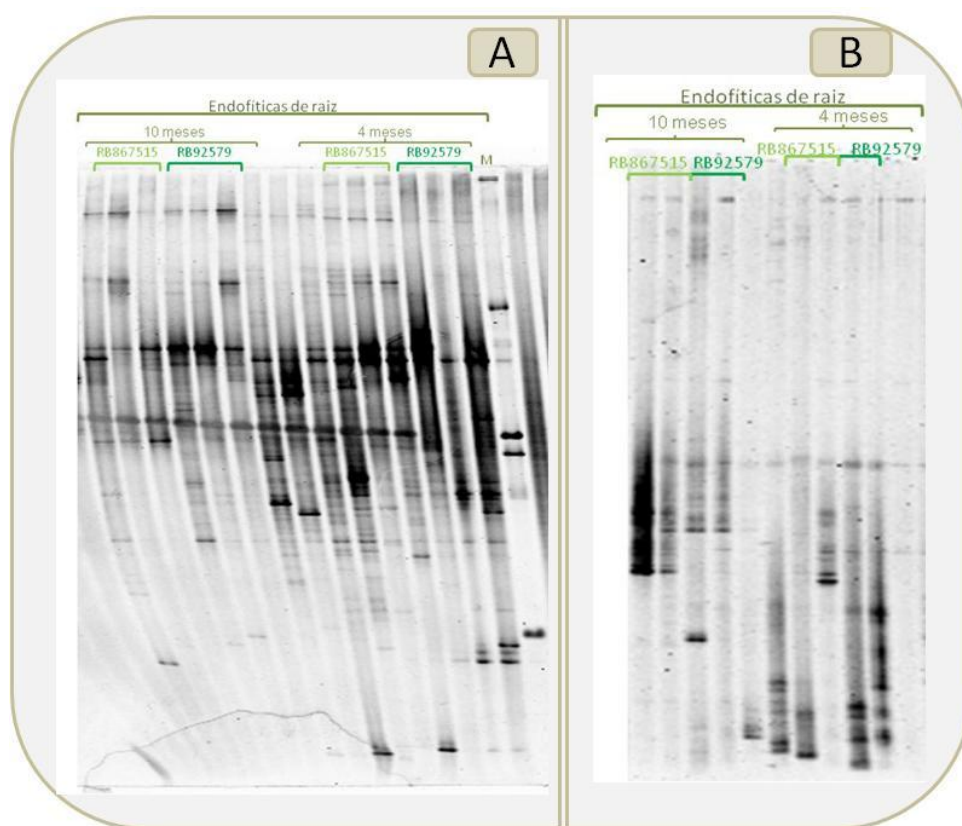


Figura 3.4. Géis de poliacrilamida com perfis obtidos no DGGE do gene 16S rRNA (A) e *nifH* (B) de comunidades bacterianas endofíticas de raiz, presentes em cana soca das variedades RB92579 e RB867515 aos 4 e 10 meses após a primeira rebrota.

A análise da comunidade bacteriana por uso da técnica DGGE, semelhantemente aos resultados obtidos pela técnica de BOX-PCR, evidenciou elevada diversidade genética da comunidade bacteriana existente na rizosfera e nas raízes de cana soca das variedades RB92579 e RB867515 das plantas analisadas, tanto para o gene 16S rRNA e quanto para o *nifH* (Figuras 3.5 e 3.6). É possível observar a heterogeneidade existente nos perfis entre as variedades, tempo de cultivo das plantas e nichos avaliados, bem como, a baixa similaridade da maioria dos grupos formados (Figura 3.5 e 3.6). Consequente houve a formação de poucos grupos dominantes com elevada similaridade genética. Similaridade superior a 70% foi observada em agrupamentos restritos das amostras, como por exemplo, para o gene 16S rRNA para apenas quatro agrupamentos oriundos da rizosfera (Figura 3.4); e dois para o gene *nifH*, oriundos da rizosfera e endofíticos de raiz, respectivamente.

Na figura 3.5 e 3.6 é possível observar que as ramificações dos dendogramas foram geralmente subdivididas apartir dos nichos (rizosférico e endofítico de raiz), sendo este geralmente determinante e de maior importância no agrupamento para a formação de grupos dominantes, nos quais alguns possuem elevada similaridade genética.

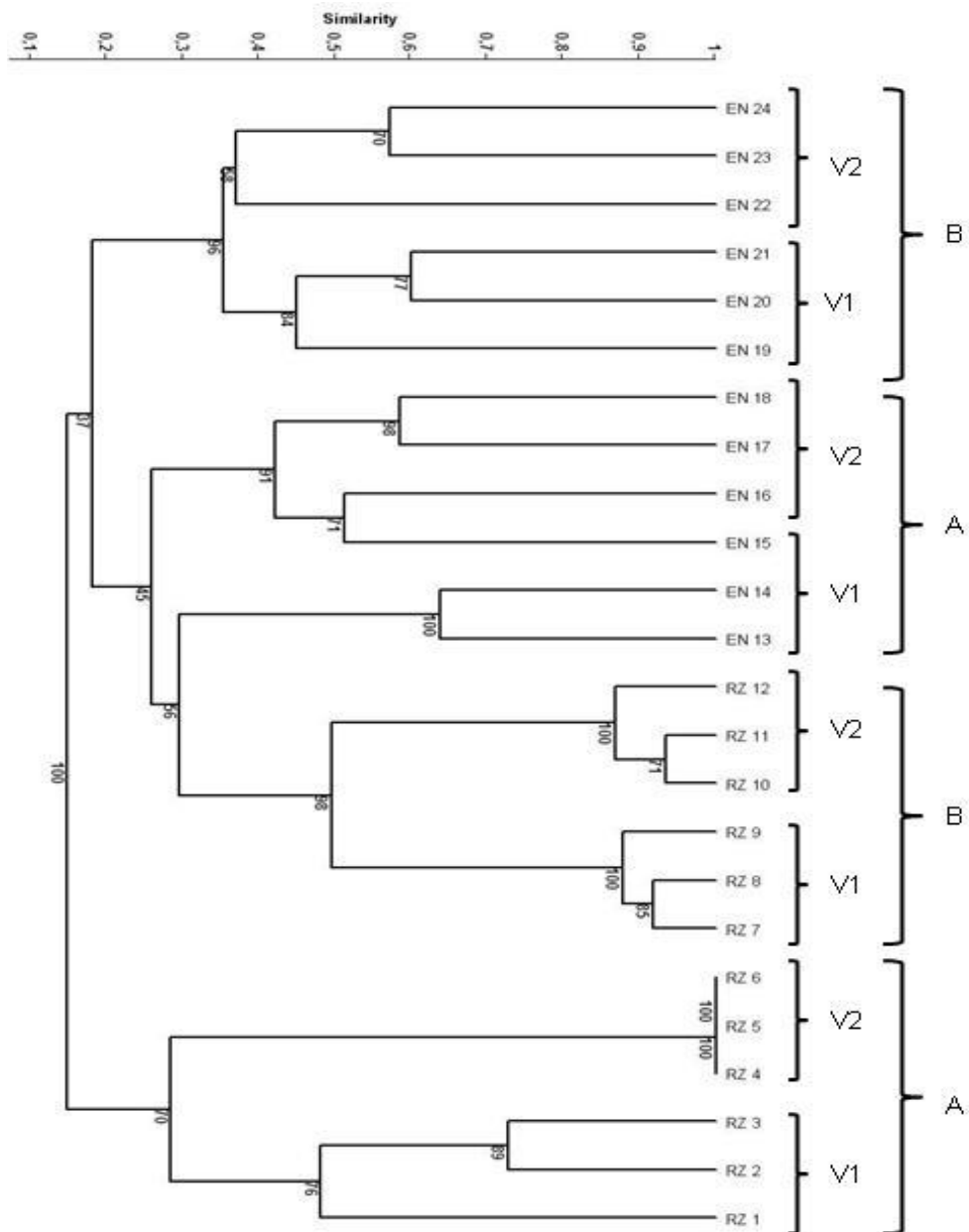


Figura 3.5. Dendrograma de similaridade das comunidades bacterianas baseadas nos perfis obtidos através da técnica de DGGE do gene 16S rRNA, e analisados através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com *bootstrap* de 1.000 vezes. Os números nos nós indicam a porcentagem de vezes que o grupo permanece no consenso. **EN:** endofítica de raiz; **RZ:** rizosfera; **V1:** RB92579; **V2:** RB867515; **A:** 4 meses; **B:** 10 meses.

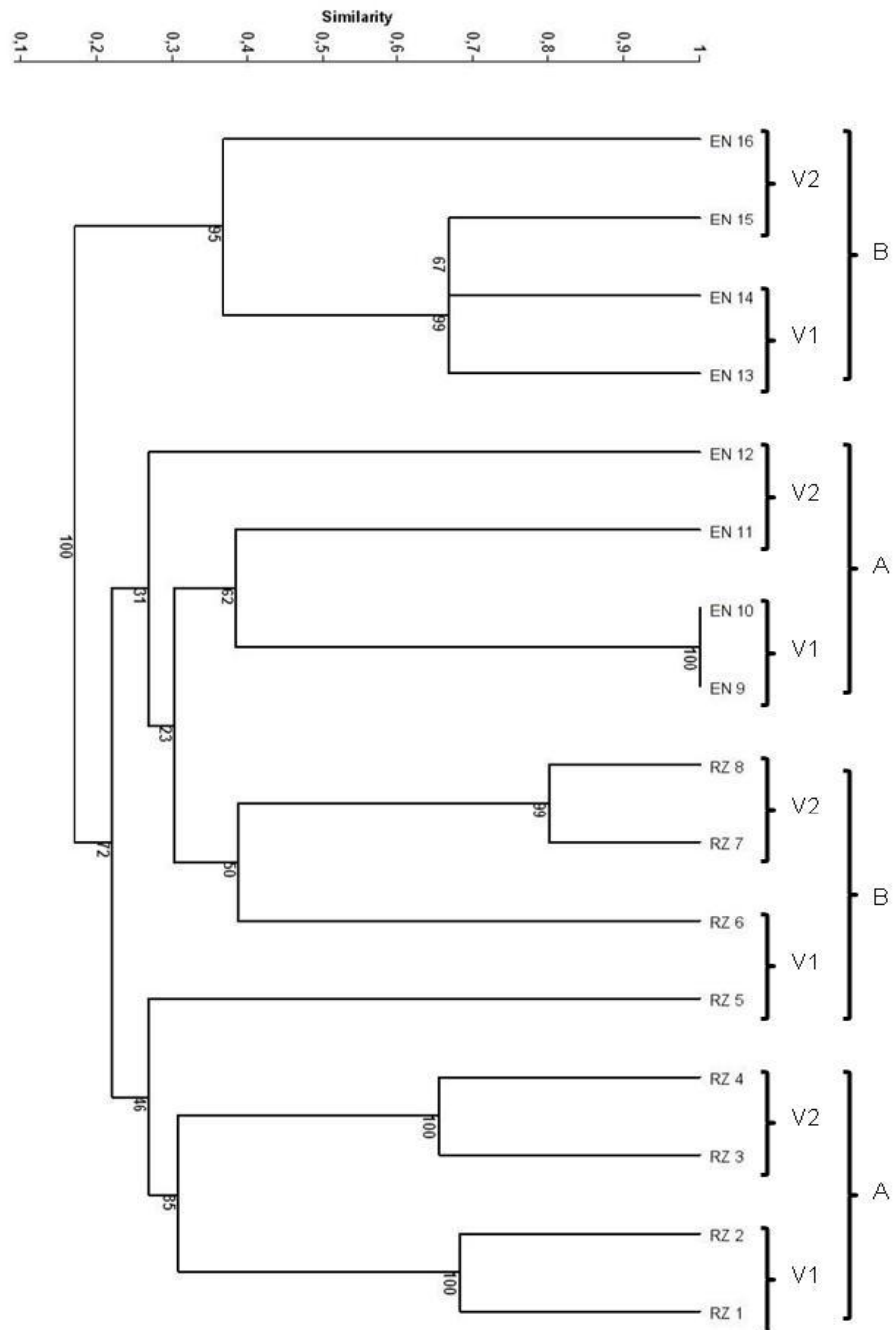


Figura 3.6. Dendrograma de similaridade das comunidades bacterianas baseadas nos perfis obtidos através da técnica de DGGE do gene *nifH*, e analisados através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com *bootstrap* de 1.000 vezes. Os números nos nós indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso. **EN**: endofítica de raiz; **RZ**: rizosfera; **V1**: RB92579; **V2**: RB867515; **A**: 4 meses; **B**: 10 meses.

3.4. DISCUSSÃO

A bioprospecção por bactérias associadas a plantas de cana-de-açúcar com características fisiológicas envolvidas com a promoção de crescimento vegetal e exploração desses mecanismos de interação bactéria/planta/solo são de grande importância para a melhoria da produção desta cultura, em particular na região Nordeste, tanto como no Estado de Pernambuco, como para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável. Desta forma, o presente trabalho contribuiu por meio do isolamento de bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio e a observação de elevada densidade populacional nos diferentes nichos avaliados, fase fenológica da planta hospedeira e variedade avaliadas, corroborando com os trabalhos existentes que relatam a interação de diversas bactérias diazotróficas colonizando diferentes espécies de plantas em diferentes nichos como a rizosfera (FRANCHE, 2009), epifíticas (ELMERICH & NEWTON, 2007) e endofíticas de raízes (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; BALDANI & BALDANI, 2005), inclusive em plantas de cana-de-açúcar (MENDES et al., 2007; GASS et al. 2011; CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem sido estudada em diferentes espécies de gramíneas, tais como plantas de arroz, cana-de-açúcar e milho, encontrando nos nichos avaliados ampla diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio (BHATTACHARJEE et al., 2008). A densidade e a diversidade dos micro-organismos que colonizam as raízes influenciam a variação das respostas benéficas do processo simbiótico entre bactéria-planta (WISSUWA et al., 2009). Em plantas de cana-de-açúcar Boddey et al. (2003), Canuto et al. (2003), Castro-González et al. (2011), Taulé et al. (2011), Urquiaga et al. (2011) observaram que as bactérias diazotróficas, através da FBN contribuem para a promoção de crescimento vegetal.

O presente trabalho encontrou a presença de gêneros, tais como, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Dyeila* em plantas de cana soca, semelhantemente Mendes et al. (2007) avaliando a diversidade da comunidade endofítica de cana-de-açúcar observou a presença de *Burkholderia* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. e

Microbacterium sp.; Magnani et al. (2010) isolou de plantas de cana-de-açúcar o gênero *Pantoea*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Pseudomonas*. As espécies bacterianas, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Herbaspirillum* sp., *Bacillus* sp., *Azospirillum* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Herbaspirillum* sp. são relatados na literatura como diazotróficos de plantas, não leguminosa, como a cana-de-açúcar (FRANCHE et al., 2009; HAYAT et al., 2010; SAHARAM & NEHRA, 2011).

As ferramentas de biologia molecular têm permitido o acesso da variabilidade genética microbiana, dependente e independente de cultivo, de forma a contribuir para o estudo das interações micro-organismos/planta. As técnicas que utilizam marcadores moleculares, como, por exemplo, BOX-PCR, RAPD (random amplification of polymorphic DNA) e ARDRA (Amplified Ribosomal DNA restriction Analysis) possibilitam a análise da variabilidade genética de bactérias fixadoras de nitrogênio, no nível do gênero e espécie, como também permitindo a realização de correlações entre ambiente estudado e genótipo microbiano (CHENEY et al., 2000; ANDREOTE et al., 2008).

Várias análises moleculares que estudam a diversidade genética das bactérias avaliam a presença do gene 16S rRNA, pois é um importante gene para a ecologia microbiana e para a filogenia das bactérias, o mesmo corresponde a uma região amplamente conservada no ribossoma bacteriano (WARTIAINEN et al., 2008; ANDREOTE et al., 2009; ZHANG et al. 2011). Li et al. (2008) estudaram a diversidade genética de bactérias endofíticas em plantas de soja através da técnica ARDRA, 16S rDNA, e pode observar elevada diversidade genética apresentando 98 variedades bacterianas que no BOX-PCR formaram 21 agrupamentos. Similarmente, TORRES et al. (2009) avaliando a diversidade genética de isolados de *Phaseolus vulgaris* L. com a análise de BOX-PCR obtiveram alta variabilidade genética. De acordo com o abordado, ambos os trabalhos corroboram com a presente pesquisa que também observou elevada diversidade genética das linhagens bacterianas analisadas pela técnica do BOX-PCR. Corroborando com o presente estudo Mendes et al. (2007) observaram a formação de vários grupos genotipicamente distintos nos isolados endofíticos do colmo, das raízes e rizosféricos de cana-de-açúcar. Mosivand et al. (2009) e Ramos (2011), também avaliaram a

diversidade genética de plantas de cana-de-açúcar e observaram elevada diversidade genotípica dos isolados avaliados.

O PCR-DGGE é uma das técnicas de cultivo independente que possibilita avaliar a diversidade genética e funcional dos microrganismos presentes na interação solo-planta, e também o acesso a variação da comunidade bacteriana no meio ambiente, quando influenciada por fatores bióticos e abióticos, na associação com planta/microrganismo em ambientes naturais e agrícolas (SAITO et al. 2007). Ramos (2011) analisando a diversidade genética bacteriana, da rizosfera e raízes de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco, através da técnica de DGGE do gene 16S rRNA, observou diferentemente do presente trabalho, alta homogeneidade nos perfis de *amplicons* das comunidades bacterianas distinguidas.

Em diversas espécies de bactérias os genes *nif*, entre eles o *nifH*, são necessários para síntese e funcionamento da enzima nitrogenase que atua na FBN, transformando o N₂ em amônia, disponibilizando-o para a planta (ARNOLD et al., 1988; FRANCHE et al, 2009; ZHAN & SUN, 2011). Resultados semelhante ao presente trabalho foi encontrado por Romagnoli (2011), avaliando a diversidade e abundância de fixadores de nitrogênio de vida livre (BFNVL) e microrganismos amônio-oxidantes em solos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo, observou a partir dos perfis de *amplicons* após o PCR-DGGE do gene 16S RNAr de AOA (arqueias amônio oxidantes) e AOB (bactérias amônio oxidantes) e do gene *nifH* de BFNVL diferenças estruturais nas comunidades destes microrganismos, nos solos das três áreas estudadas, evidenciando a diversidade genética das populações bacterianas encontradas. Resultados semelhantes são verificados por Coelho et al. (2009) que utilizou o PCR-DGGE para o gene *nifH* observou elevada diversidade das comunidades bacterianas rizosféricas, sendo estas, mais diversificada que a do solo.

Diante dos resultados e da discussão comparativa tornou-se evidente e comprobatória a elevada densidade populacional bacteriana, além da alta diversidade encontrada independente dos nichos, variedade e tempo de cultivo da cana-de-açúcar no presente trabalho e nos argumentos relatados.

3.5. CONCLUSÕES

A densidade populacional de bactérias diazotróficas é elevada no habitat rizosférico e endofítico de raiz, independente do tempo de cultivo e das variedades RB92579 e RB867515 de cana soca avaliadas.

Foi observado em plantas de cana soca a presença de gêneros bacterianos, tais como, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Dyeila*.

Bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio, associadas a plantas de cana soca cultivadas em Pernambuco, apresentaram elevada variabilidade genética pela técnica de BOX-PCR.

A técnica de PCR-DGGE para o gene 16S rRNA e *nifH* de cultivos de cana soca das variedades RB92579 e RB867515, aos 4 e 10 meses de cultivos após a primeira rebrota, apresentou elevada diversidade genética nos agrupamentos formados.

3.6. REFERÊNCIAS

ANDREOTE, F. DI.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**. 40:417-432, 2009.

ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. **Diversidade molecular de microorganismos endofíticos**. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD; N. P.; SILVA SANTOS, C. E. R. Microorganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. 1Ed. Guaíba. Agrolivros, 2008. p. 233-258.

ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; KUKLINSKYSOBRAL, J. PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Guia prático: Isolamento e caracterização de microorganismos endofíticos**. Piracicaba: CALO, 2001. 167p.

ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, U. B.; PÜHLER, A. Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Molecular Biology**. 203:715-738, 1988.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 77:549-579, 2005.

BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G. & DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasilensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 69:116, 1997.

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**. 80:199-209, 2008.

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

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

CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; SANTOS, P. E.; CABALLERO-MELLADO, J. High diversity of culturable Burkholderia species associated with sugarcane. **Plant Soil**. 345:155-169, 2011.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C., GERMON, J. C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**. 34:121-128, 2000.

COELHO, M. R. R.; MARRIEL, I. E; JENKINS, S. N.; LANYON, C. V.; SELDIN, L.; O'DONNELL, A. G. Molecular detection and quantification of nifH gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. **Applied Soil Ecology**. 42:48-53, 2009.

DAROS, E.; OLIVEIRA, R. A.; ZAMBON, J. L. C.; BESPALHOK FILHO, J. C. **Catálogo Nacional de Variedades "RB" de Cana-de-açúcar**. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro-RIDESA. 2010. 136p.

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), 1995. 60p.

ELMERICH, C.; NEWTON, W. E. Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. **Springer**, 2007. 321p.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant Soil**. 321:35-59, 2009.

GASSER, I.; CARDINALE, M.; MÜLLER, H.; HELLER, S.; EBERL, L.; LINDENKAMP, N.; KADDOR, C.; STEINBÜCHEL, A.; BERG, G. Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of *Burkholderia terricola* ZR2-12. **Plant Soil**. 347:125-136, 2011.

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**. 40:1105-1113, 2005.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**. 60:579-598, 2010.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant Soil**. 311:1-18, 2008.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja. (Documento, 283), 2007. 80 p.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**. 6:1244-1251. 2004.

LACAVAL, P. T.; ANDREOTE, F. D.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 41:637-642, 2006.

LAMB, E. J., G. A. BOXSHALL, P. J. MILL, AND J. GRAHAME. Nucellicolidae: A new family of endoparasitic copepods (Poecilistomatoida) from the dog whelk *Nucella lapillus* (Gastropoda). **Journal of Crustacean Biology**. 16:142-148, 1996.

LI, J. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology & Biochemistry**. 40:238-246, 2008.

MARQUES, A. S. A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON, R. (2008). BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology**. 31:106-115.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAUJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. 73:7259-7267, 2007.

MEINTANIS, C.; CHALKOU, K.I.; KORMAS, K. AR.; LYMPEROPOULOU, D.S.; KATSIFAS, E.A.; HATZINIKOLAOU, D.G.; KARAGOUNI, A. D. Application of *rpoB* sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillus*. **Letters in Applied Microbiology**. 46:395-401, 2008.

MOSIVAND, M.; RAHIMIAN, H.; SHAMS-BAKHSH, M. Phenotypic and genotypic relatedness among *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolates from sugarcane, stone fruits and wheat. **Iranian Journal of Plant Pathology**. 45:19-21, 2009.

RAMOS, A. P. S. **Bactérias associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco: diversidade genética e produção de ácido indol acético.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2011.

REIS JUNIOR, B. F.; MENDES, I. C.; REIS, V. M.; HUNGRIA, M. **Fixação Biológica de Nitrogênio: uma revolução na agricultura.** Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 2008. 32 p.

RICHARDSON, A. E.; BAREA, J. M.; MCNEILL, A. M.; PRIGENT-COMBARET, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant Soil.** 321:305-339, 2009.

ROMAGNOLI, E. M. **Diversidade e abundância de fixadores de nitrogênio de vida livre e micro-organismos amônio-oxidantes em solos de Mata Atlântica do Estado de São Paulo.** Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-Universidade de São Paulo. 2011.

PROSSER, J.I.; BOHANNAN, B.J.M.; CURTIS, T.P.; ELLIS, R.J.; FIRESTONE, M.K.; FRECKLETON, R.P.; GREEN, J.L.; GREEN, L.E.; KILLHAM, K.; LENNON, J.J.; OSBORN, A.M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C.J.; YOUNG, J.P.W. Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology.** 5:384-392, 2007.

SALLES, J. F.; SOUZA, F. A.; VAN ELSAS, J. D. Molecular Method To Assess the diversity of *Burkholderia* Species in Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology.** 68:1595-1603, 2002.

SAITO, A.; IKEDA, S.; EZURA, H.; MINAMISAWA, K. Microbial community analysis of the phytosphere using culture-independent methodologies. **Microbes and Environments.** 22:93-105, 2007.

SAHARAN, B. S. & NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**. 21: 1-30, 2011.

WISSUWA, M.; MAZZOLA, M.; PICARD, C. Novel approaches in plant breeding for rhizosphere-related traits. **Plant Soil**. 321:409-430, 2009.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R. et al., 3° ed., Porto Alegre: Artemed, 2004. 719 p.

TORRES, A. R.; CURSINO, L.; MURO-ABAD, J. I.; GOMES, E. A.; ARAÚJO, E. F.; HUNGRIA, M.; CASSINI, S. T. A. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Rhizobia from the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. 40:852-856, 2009.

URQUIAGA, R. P. X.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant Soil**. 346:1-400, 2011.

VALE, F. F.; ENCARNACÃO, P.; VÍTOR, J. M. B. A new algorithm for cluster analysis of genomic methylation: the *Helicobacter pylori* case. **Genetics and population analysis**. 24:383-388, 2008.

WARTIAINEN, I.; ERIKSSON, T.; ZHENG, W.; RASMUSSEN, U. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy—nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. **Applied Soil Ecology**. 39:65-75, 2008.

WOESE, C.R. There must be a prokaryote somewhere - microbiologists search for itself. **Microbiology Reviews**. 58:1-9, 1994.

ZHAN, J.; SUN, Q. Diversity of free-living nitrogen-fixing microorganisms in the rhizosphere and non-rhizosphere of pioneer plants growing on wastelands of copper mine tailings. **Microbiological Research**. 167:157-165, 2011.

ZHANG, Y. Z.; WANG, E. T.; LI, M.; LI, Q. Q.; ZHANG, Y. M.; ZHAO, S. J.; JIA, X. L.; ZHANG, L. H.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Effects of rhizobial inoculation, cropping systems and growth stages on endophytic bacterial community of soybean roots. **Plant Soil**. 347:147-161, 2011.

4. CAPÍTULO 2

Caracterização fisiológica bacteriana e reinoculação de bacterias diazotróficas em variedades de cana-de- açúcar

LIMA, DANUBIA RAMOS MOREIRA DE. MSc. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Fevereiro de 2012. Capítulo 2. Caracterização fisiológica bacteriana e reinoculação com bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar. Orientadora: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral. Conselheiro: Prof. Dr. Fernando José Freire.

RESUMO

Para a agricultura é importante ampliar o conhecimento sobre a interação dos micro-organismos com plantas, para que seja possível obter benefícios econômicos e ambientais, como por exemplo, redução de custo com fertilizantes, lixiviação de nitrogênio, promoção de crescimento vegetal. Diante desta perspectiva, este trabalho teve como objetivos caracterizar fisiologicamente bactérias, isoladas da rizosfera e endofíticas de raiz de cana soca, quanto ao potencial para a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção do ácido indol acético (AIA), índice de solubilização de fosfato inorgânico (IS), produção de quorum sensing (QS) assim como selecionar isolados para avaliação da promoção do crescimento de plantas de cana, em casa de vegetação. Foram avaliadas 125 linhagens bacterianas oriundas do solo rizosférico e de raízes de plantas de cana soca das variedades RB92579 e RB867515, destas 78 e 47 linhagens foram obtidas aos 4 e 10 meses de cultivo, respectivamente. As bactérias foram avaliadas quanto a capacidade de crescer em meio NFb para a FBN, quanto a capacidade de produzir AIA por método colorimétrico, quanto a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico pela estimativa do IS em meio contendo fosfato de cálcio, e a capacidade de produzir molécula QS detectada pelo biossensor *Agrobacterium tumefaciens* NTL4. Dez isolados foram selecionados para o teste de promoção de crescimento vegetal e avaliados para a FBN em diferentes fontes de carbono e pH, sob concentrações crescentes de NaCl e presença do pesticida fipronil; o IS em diferentes fontes de carbono e a produção de AIA na ausência de L-triptofano. As dez linhagens bacterianas (UAGC 857, 858, 865, 867, 869, 890, 895, 903, 904 e a 913 pertencentes ao gênero *Burkholderia*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, não identificado, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Burkholderia* e *Burkholderia*, respectivamente) foram

reinoculados em rebolos de cana-de-açúcar em casa de vegetação, onde foi avaliado a promoção de crescimento das plantas. Foi observado nos resultados que as 125 linhagens bacterianas isoladas de plantas soca de cana-de-açúcar possuem alta variabilidade funcional e elevada frequência, com percentuais de 97,6%, 100%, 80,8% das linhagens bacterianas, oriundas das variedades RB92579 e RB867515 do habitat rizosférico e endofítico de raiz, foram capazes de realizar a FBN, AIA, IS, respectivamente. No experimento de reinoculação, é importante ressaltar que os valores médios dos tratamentos que evidenciaram diferença estatística, em relação às plantas do tratamento controle, apresentaram médias superiores a 50% e 100% de diferença para a massa fresca e seca da parte aérea e da raiz, respectivamente; e o número de perfilhos, em alguns tratamentos, chegaram a duplicar e triplicar os valores, para as variedades RB92579 e RB867515, respectivamente. As linhagens avaliadas exibiram funcionalidade variada e elevada, além de capacidade para o potencial de promoção de crescimento vegetal.

Palavras-chave: ácido indol acético, promoção de crescimento vegetal, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico.

LIMA, DANUBIA RAMOS MOREIRA DE. MSc.at Universidade Federal Rural de Pernambuco, February 2012. Chapter 2. Physiological characterization and bacterial reinoculation with diazotrophic bacteria in plant cane sugar. Advise: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral. Co-Adviser: Prof. Dr. Fernando José Freire.

ABSTRACT

For agriculture it is important to increase knowledge about the interaction of micro-organisms in plants, so that it is possible to obtain economic and environmental benefits, such as cost reduction with fertilizers, leaching of nitrogen, plant growth promotion. Given this perspective, this study aimed to characterize physiologically bacteria, isolated from the rhizosphere and endophytic root ratoon cane, about the potential for biological nitrogen fixation (BNF), production of indole acetic acid (IAA), rate of solubilization of inorganic phosphate (IS), production of quorum sensing (QS) as well as select isolates for evaluation of growth promotion of sugar cane plants in the greenhouse. We evaluated 125 bacterial strains derived from the rhizosphere and roots of plants of sugar cane ratoon and RB867515 variety RB92579, 78 and 47 of these strains were obtained at 4 and 10 months of cultivation, respectively. Bacteria were evaluated how the ability to grow in a Nfb medium to BNF, the ability to produce by IAA colorimetric method, and the ability of inorganic phosphate solubilization by estimating the IS in a medium containing calcium phosphate, and the ability to produce the QS biosensor detected by *Agrobacterium tumefaciens* NTL4. Ten isolates were selected for the test for promoting plant growth and to BNF evaluated in different carbon sources, and pH in increasing concentrations of NaCl and presence of the pesticide fipronil; IS different sources of carbon and the production in the absence of IAA L-tryptophan. The ten bacterial strains (UAGC 857, 858, 865, 867, 869, 890, 895, 903, 904 and 913 belonging to the genus *Burkholderia*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *unidentified*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Burkholderia* and *Burkholderia*, respectively) were reinoculated on wheels of sugar cane in a greenhouse, which assessed the promotion of plant growth. It was observed that the results in 125 bacterial strains isolated from sugar cane

plants ratoon are high functional variability and high frequency, with percentages of 97.6%, 100%, 80.8% of bacterial strains, originating from varieties RB92579 and RB867515 habitat rhizospheric and endophytic root, were able to perform the BNF, AIA, IS, respectively. Reinoculation experiment, it is important to note that the mean values of treatments that showed a statistically significant difference compared to control plants, had averages above 50% and 100% difference for the fresh and dry shoot and root, respectively, and the number of tillers, in some treatments, reached double and triple values, for the varieties RB92579 and RB867515, respectively. The lines evaluated exhibited high functionality and varied, and the potential capacity for growth promotion.

Keywords: indol acetic acid, plant growth promotion, nitrogen fixation, solubilization of inorganic phosphate.

4.1. INTRODUÇÃO

A interação entre bactérias e plantas ocorre em diferentes nichos, no solo perto da superfície das raízes (comunidade rizosférica) ou no interior das plantas (comunidade endofítica) (HARTMANN et al. 2008) nos distintos órgãos (raiz, caule, folha e flores), podendo contribuir beneficemente para o crescimento e desenvolvimento vegetal (ANDREOTE, 2009; TAURIAN et al., 2010; SOUZA et al., 2011).

Durante as interações benéficas, em que as bactérias beneficiam de alguma forma a planta hospedeira, as bactérias endofíticas e rizosféricas podem exercer diversas funções, tais como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitohormônios, como o ácido indol acético (AIA), solubilização de fosfato inorgânico, entre outras, sendo potenciais promotoras do crescimento das plantas (KINKEL et al., 2000; STURZ et al., 2000; PEDRAZA, 2008; TAULÉ et al., 2011; FERRARA et al., 2011).

Atualmente, têm sido realizados diversos estudos avaliando a associação desses microrganismos promotores de crescimento vegetal em plantas de diferentes espécies, como morango (DIAS et al., 2009), cana-de-açúcar (FERRARA et al., 2011), milho (HUNGRIA et al., 2010), soja (ZANG et al., 2011). De acordo com Dias et al. (2009), a promoção do crescimento das plantas, por isolados bacterianos, mostraram correlação com AIA e a solubilização do fosfato em plantas de morango, proporcionando aumento do número de folhas, comprimento e massa seca das raízes e parte aérea. Taulé et al. (2011), observaram que bactérias potencialmente fixadoras de nitrogênio, quando reinoculadas apresentaram significância na FBN para variedades de cana-de-açúcar.

Em particular para a agricultura, é importante ampliar o conhecimento sobre o uso de microrganismos no solo e em associação com os vegetais, podendo assim, obter benefícios (ROECH et al., 2010), econômicos e ambientais, como por exemplo, redução de custo com fertilizantes, diminuir a lixiviação de nitrogênio (KENNEDY et al., 2004, Roech et al., 2010) e promover

o crescimento vegetal (DIAS et al., 2009; HUNGRIA et al., 2010; ZANG et al., 2011).

Para tanto, é necessário a realização de pesquisas que estudem a interação bactéria-solo-planta possibilitando fornecer subsídios para o uso na produção agrícola e surgimento de técnicas alternativas que tenham viabilidade financeira e sustentabilidade ambiental. Diante deste contexto, este trabalho teve como objetivos caracterizar funcionalmente bactérias, isoladas da rizosfera e endofíticas de raiz de cana soca, quanto ao potencial para produção de ácido indol acético, solubilização de fosfato inorgânico, produção de quorum sensing, assim como selecionar isolados promissores para a promoção do crescimento vegetal e avaliar sua interação com plantas de cana em casa-de-vegetação.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. *Isolados bacterianos*

Foram avaliadas 125 bactérias associadas a plantas de cana-de-açúcar, sendo isoladas de plantas com 4 e 10 meses de cultivo, após a primeira rebrota, com 47 e 21 oriundas da rizosfera, e 31 e 26 endofíticas de raiz, respectivamente. As plantas de cana soca das variedades RB92579 e RB867515 foram coletadas na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Carpina/Pernambuco (7°51'03"S e 35°15'17"O), nos meses de novembro de 2010 e setembro de 2011.

Esses isolados são pertencentes à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE), são bactérias fixadoras de nitrogênio, pois foram isoladas em meio semi-sólido, isento de fonte nitrogenada (NFb), segundo Dobereiner *et al.* (1995), para mais detalhes consultar o capítulo 1.

4.2.2. Capacidade para fixação de nitrogênio

Apesar das bactérias avaliadas terem sido isolados em meio NFb, segundo Dobereiner et al. (1995), todos os isolados foram novamente repicados em meio sem fonte nitrogenada para confirmação do potencial para fixação de nitrogênio *in vitro* e comparados com o controle positivo (*Burkholderia* sp.) oriundo da coleção microbiana do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana da Unidade Acadêmica de Garanhuns, Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco(LGBM/UAG-UFRPE).

A partir de colônias isoladas, 100 µL de cultura bacteriana foram inoculadas em triplicatas, em meio semi-sólido NFb, seletivo para bactérias diazotróficas, e incubados a 28°C, por 8 dias, e repicadas para novos tubos com meio semi-sólido NFb e incubadas por mais 8 dias (Dobereiner *et al.*, 1995).

Dez bactérias selecionadas para o experimento de promoção de crescimento vegetal, descrito a seguir no tópico 4.3.5., foram avaliadas quanto a influência da fonte de carbono, da salinidade e do pesticida fipronil (inseticida largamente utilizado nos canaviais de Pernambuco) sobre a capacidade de crescimento em meio semi-sólido NFb.

Para isso, o mesmo procedimento acima relatado foi realizado diferenciando-se os seguintes fatores no meio de cultura: ensaio 1 – diferentes concentrações de NaCl (0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10%); ensaio 2 - diferentes fontes de carbono (sacarose e ácido málico) X diferentes pHs (5,5 e 6,8); ensaio 3 – diferentes concentrações de fipronil (0, 100, 200 e 400 g/ha, sendo 200g/ha a dose recomendada para o campo.

4.2.3. Seleção de bactérias produtoras de ácido indol acético

A seleção de bactérias produtoras de ácido indol acético (AIA) foi realizada por meio de método colorimétrico específico para caracterizar a quantificação da produção do fitohormônio (CROZIER et al., 1988). Colônias isoladas foram inoculadas em meio líquido TSA 10% (*Trypcase Soy Agar*) (1,5 g/L de triptona; 0,5 g/L de peptona de soja; 1,5 g de NaCl; pH 7,3) e mantidas por 24h em agitação constante, posteriormente 10 µL deste inóculo foram reinoculados, em triplicata, em meio TSA líquido suplementado com 5 mM de

L-triptofano. Após 24h de agitação constante (140rpm), 2 mL do cultivo bacteriano foram centrifugados por 5 minutos à 11764g , em seguida 1400 µL do sobrenadante foram acrescidos de 600 µL do reagente de Salkowski (2% de FeCl₃ 0,5M em 35% de ácido perclórico), incubados, na ausência de luz, por 30min a 28° C. O resultado positivo foi caracterizado pela formação de uma coloração rósea, o qual foi quantificado através do espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm. A concentração do AIA foi estimada por meio de uma curva padrão previamente estimada, utilizando valores conhecidos de AIA sintético (Vetec) 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300 e 350 µg mL⁻¹, em meio de cultura esterilizado não inoculado (BARBOSA, 2010; ARAUJO & GUERREIRO 2010; BALDOTTO et al., 2010). Foi utilizada como controle positivo a linhagem EN303 (*Pseudomonas oryzihabitans*), bactéria endofítica de soja que é produtora de auxina (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004).

Dez bactérias selecionadas para o experimento de promoção de crescimento vegetal, descrito a seguir no tópico 4.3.5, foram avaliadas quanto a capacidade de produzir AIA sem a presença de triptofano no meio de cultura, ou seja, por via metabólica alternativa à que não utiliza o triptofano como precursor. Para isso, o mesmo procedimento acima relatado foi realizado, diferenciando-se, apenas, no não acréscimo do L-triptofano em meio TSA.

4.2.4. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico in vitro

A avaliação da capacidade de bactérias em solubilizar fosfato inorgânico, *in vitro*, foi realizada por meio de inoculação dos isolados bacterianos, em triplicata, a partir de colônias isoladas, em meio de cultura sólido contendo fosfato de cálcio insolúvel (10g/L de glicose; 5 g/L de NH₄Cl; 1 g/L de MgSO₄.7H₂O; 4 g/L de CaHPO₄; 15 g/L de Ágar; pH 7,2), incubadas a 28°C por 72h. A formação do halo, área clara ao redor das colônias, indicou a solubilização do fosfato e possibilitou calcular o índice de solubilização (IS), que expressa à relação do diâmetro médio do halo de solubilização pelo diâmetro médio do halo da colônia.

Dez bactérias selecionadas para o experimento de promoção de crescimento vegetal, descrito a seguir no tópico 4.3.5., foram avaliadas quanto a influência da fonte de carbono na capacidade de solubilizar fosfato inorgânico. Para isso, o mesmo procedimento acima relatado foi realizado,

diferenciando-se apenas as fontes de carbono no meio de cultura (10 g/L): glicose; sacarose e manitol.

4.2.5. Seleção de bactérias produtoras de quorum sensing

A seleção de bactérias produtoras de quorum sensing do tipo N-acil homoserinas lactonas (AHL) foi realizada por bioensaio com utilização da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), biossensor de AHLs (SZENTHE & PAGE, 2002; QUECINE, 2010). A *A. tumefaciens* foi inoculada linearmente na extremidade de placas de Petri contendo meio LB (Luria Bertani), acrescido de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside) por toda a superfície. Os isolados bacterianos, associados a plantas de cana-de-açúcar, foram inoculados transversalmente à *A. tumefaciens*, e as placas foram incubadas 28°C por 48 horas. A linhagem biossensor de *A. tumefaciens* contém o promotor TraR (fusão do gene TraG :: LacZ), que regula a expressão do operon da LacZ. O quorum sensing AHLs se ligam ao promotor TraR e ativam a expressão do gene LacZ, tendo como resultado a codificação da enzima β -galactosidase, a qual quebra a molécula X-gal, tornando a célula azul (SZENTHE; PAGE, 2002). Portanto, a observação de colônias de *A. tumefaciens* com pigmentação azul indicou a produção de AHLs pelos isolados bacterianos avaliados, indicando o potencial para formação de biofilme microbiano.

4.2.6. Avaliação da promoção de crescimento vegetal por bactérias associadas a plantas de cana soca

Dez bactérias foram selecionadas para o teste promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar, baseado na capacidade de crescer em meio livre de fonte nitrogenada, produzir ácido indol acético, quorum sensing e de solubilizar fosfato inorgânico.

A partir de colônias isoladas, as 10 bactérias (UAGC 857, 858, 865, 867, 869, 890, 895, 903, 904 e a 913) foram repicadas em meio TSA líquido, sob agitação constante (120rpm) por 18h. Em seguida, as culturas bacterianas foram diluídas em solução tampão PBS (8 g/L de NaCl; 0,2 g/L de KCl; 1,44 g/L de Na_2HPO_4 ; pH 7,4) de forma a atingir densidade óptica ($\text{DO}_{600\text{nm}}$) de 0,0095.

O material diluído foi acrescido com 50 µg/mL do fungicida Cercobin 700 (Thiophanate Methyl), os rebolos de cana-de-açúcar das variedades RB92579 e RB867515 foram imersos e deixados por aproximadamente 30 minutos e a cada 10 minutos o material foi agitado manualmente. Após este período, os rebolos foram plantados utilizando dez repetições para cada um dos 12 tratamentos impostos a cada variedade de cana (RB92579 e RB867515), dispostos em linhas com aproximadamente 10 cm de distância, distribuídos aleatoriamente: T1 - testemunha / sem inóculo bacteriano; T2 – Composição de isolados bacterianos (solução com as concentrações iguais das bactérias UAGC 857, UAGC 867, UAGC 903 e UAGC 913); T3 - UAGC 867; T4 - UAGC 857; T5 – UAGC 858; T6 – UAGC 865; T7 – UAGC 869; T8 – UAGC 890; T9 – UAGC 904; T10 – UAGC 913; T11 – UAGC 895; e T12 – UAGC 903. Sendo acrescentado à identificação de cada variedade de cana utilizada: V1 (RB92579) e V2 (RB867515).

O canteiro, em casa de vegetação, foi constituído por uma camada de solo franco arenoso (Figura 4.1) (3 cm), uma de brita (3 cm) e outra de solo franco arenoso (20 cm) (Tabela 1) com as seguintes dimensões de 1,3 m x 3,5 m x 0,20 m. As plantas foram mantidas em condições hídricas satisfatórias, regadas diariamente duas vezes ao dia.

Para avaliar a promoção de crescimento nas plantas de cana-de-açúcar reinoculadas com diferentes linhagens bacterianas, foram mensuradas variáveis fisiológicas no final do período experimental (90 dias após o inóculo) tais como: índice de germinação, através da contagem dos rebolos que apresentavam cerca de 1,5 cm; número de folhas, estabelecendo-se apenas folhas completamente expandidas e verdes; número de perfilhos; altura da planta, medida com o auxílio de uma trena; diâmetro do colmo, mensurado com o auxílio de um paquímetro manual de precisão de 1 mm; massa fresca da parte aérea e das raízes, pesada logo após o término da fase experimental em casa de vegetação; e massa seca da parte aérea e das raízes, após secagem em estufa a 60°C por 72 horas.

Tabela 4.1: Propriedades químicas e físicas do solo que foi utilizado no ensaio experimental de promoção de crescimento vegetal, em casa de vegetação, de plantas de cana-de-açúcar das variedades RB92579 e a RB867515.

Química											Física			
pH	P	K	Na	Ca	Mg	Al	H + Al	SB	CTC	V1	Areia	Silte	Argila	Classe textura
	mg kg ⁻¹	cmol _c Kg ⁻¹								%	g Kg ⁻¹			
6,1	2,67	0,16	0,26	1,30	0,90	0,05	1,65	2,62	4,27	61,4	798,7	19,2	182,0	Franco arenosa

4.2.7. *Análise estatística*

Os dados do índice de solubilização de fosfato, produção do ácido indol acético, germinação, nº de folhas, nº de perfilhos, altura da planta, diâmetro do caule, massa fresca e seca da parte aérea e das raízes foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas por meio do teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) pelo o software estatístico SISVAR[®] versão 5.3.

O teste do qui-quadrado (χ^2), com probabilidade de 5%, foi utilizado para verificar a possível influência dos nichos e variedades de cana-de-açúcar sobre a expressão funcional bacteriana quanto a realização da fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de moléculas quorum sensing AHLs, ácido indol acético (AIA) e solubilização de fosfato inorgânico.

4.3. RESULTADOS

4.3.1 *Capacidade para fixação de nitrogênio*

Dentre as 125 bactérias avaliadas, 97,6% dos isolados foram capazes de formar um halo de crescimento bacteriano, característico de diazotróficas, em meio semi-sólido NFb (Figura 4.1), por duas vezes consecutivas, reforçando o potencial para a fixação biológica de nitrogênio *in vitro*. Considerando-se o período de cultivo da planta hospedeira, 100% e 93,6% das bactérias isoladas de plantas de cana soca com 4 e 10 meses de cultivo, respectivamente, foram capazes de se desenvolverem em meio NFb.

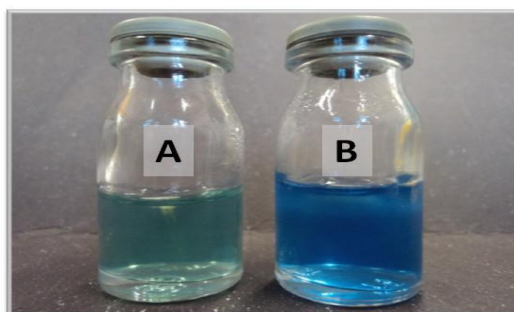


Figura 4.1. Teste de fixação biológica de nitrogênio *in vitro* em meio de cultura NFb. A: controle negativo, UAGC 980 (*Dyella* sp.), crescimento bacteriano sem

formação do halo bacteriano; B: teste positivo realizado com o isolado UAGC 857 (*Burkholderia* sp.), com crescimento bacteriano em forma de halo claro e modificação da cor do meio, indicando alteração no pH.

4.3.2. Bactérias produtoras de ácido indol acético

A seleção de bactérias produtoras de AIA, via dependente de triptofano, foi realizada com bactérias isoladas de plantas com 4 meses de cultivo, totalizando 78 bactérias avaliadas. Foi observado que 100% das bactérias foram capazes de produzir AIA *in vitro* e que apresentaram variabilidade na expressão fenotípica desta característica.

A quantificação da produção de AIA por isolados bacterianos associados à rizosfera de plantas de socas de cana-de-açúcar com 4 meses de cultivo, foi subdividida em 5 grupos, de acordo com as diferenças significativas observadas no teste de produção média: valores médios nos intervalos de 77 - 82 µg/mL (1º grupo), 55 - 65 µg/mL (2º grupo), 34 - 52 µg/mL (3º grupo), 17 - 33 µg/mL (4º grupo), 3 - 14 µg/mL, (5º grupo) (Figura 4.2.A).

Em relação às endofíticas de raízes, os isolados se subdividiram em 4 grupos: valores médios nos intervalos de 90 - 103 µg/mL (1º grupo), 51 - 67 µg/mL (2º grupo), 32 - 45 µg/mL (3º grupo), 2 - 17 µg/mL (4º grupo) (Figura 2B). O 3º grupo e o 4º grupo possuem os isolados que produziram AIA em menor quantidade, e nestes foi observado maior frequência de bactérias rizosféricas oriundas da variedade RB867515. Também foi possível observar que o grupo 1 possui o menor número de representantes, no entanto, neste encontra-se as bactérias UAGC 888, da variedade RBRB92579, e UAGC 907, da RB867515, que apresentaram maior nível de produção de AIA (Figura 4.2).

De forma geral, apenas três isolados produziram AIA em quantidade maior que 90 µg/mL, UAGC 861 e UAGC 866, oriundas da variedade RB92579; e UAGC 870, oriunda da variedade RB867515 (Figura 4.2).

4 meses de cultivo

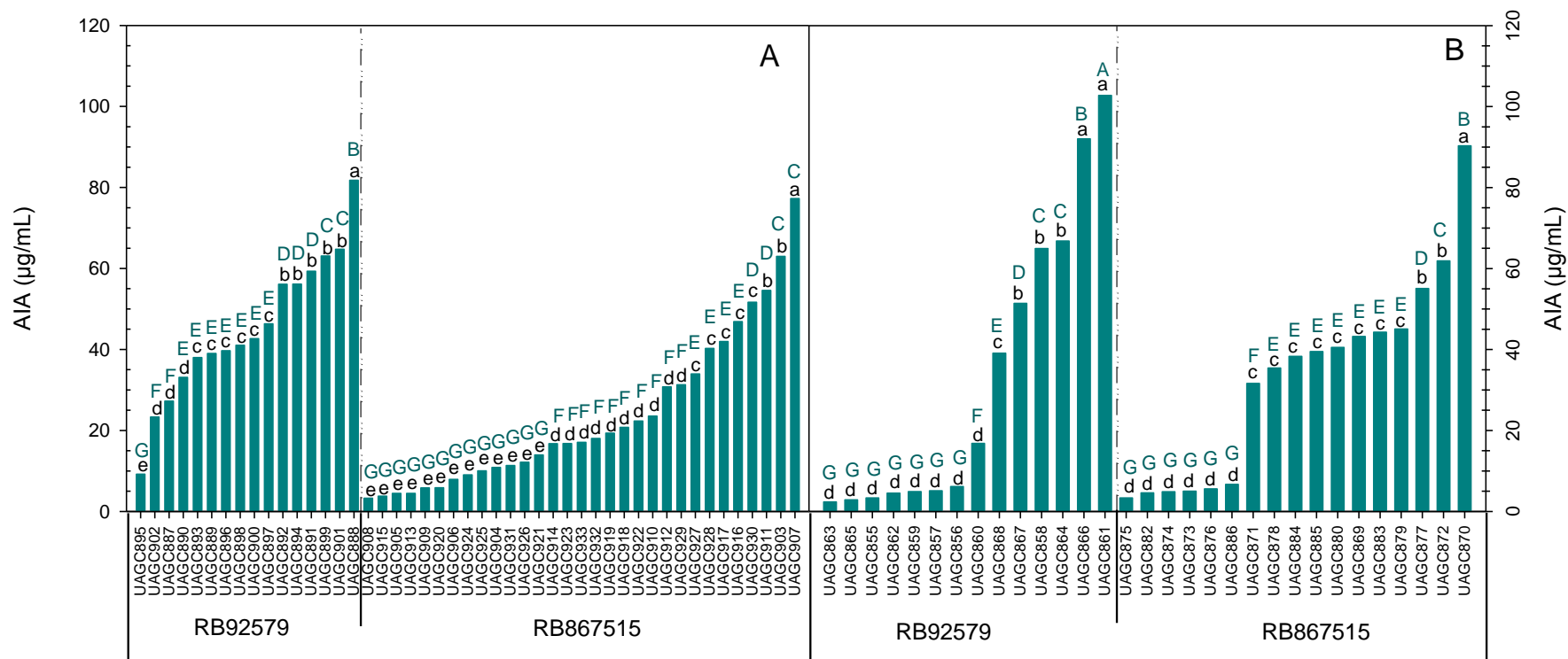


Figura 4.2. Quantificação da produção de ácido indol acético, em meio TSA líquido com o acréscimo de L-triptofano, de bactérias associadas à rizosfera (A) e endofíticas de raiz (B) de duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515) com 4 meses após a primeira rebrota. Letras minúsculas para os diferentes nichos de forma isolada e as maiúsculas comparando todas as médias, independente dos nichos avaliados. Médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.3.3. *Bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico in vitro*

Dentre as 125 bactérias avaliadas, 80,8% dos isolados foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico, em meio de cultura sólido acrescido de fosfato de cálcio (Figura 4.3). Considerando-se o período de cultivo da planta hospedeira, 89,7% e 65,9% das bactérias isoladas de plantas de cana soca com 4 e 10 meses de cultivo, respectivamente, foram capazes de solubilizar fosfato. Quando considerado o nicho de colonização bacteriana, 84,2% das bactérias endofíticas de raiz e 77,9% da rizosféricas foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico.

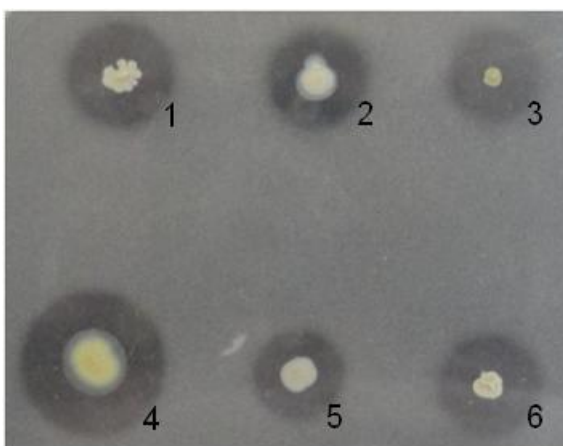


Figura 4.3. Solubilização de fosfato inorgânico por isolados bacterianos numerados de 1 a 6, referentes aos isolados UAGC 854, 855, 856, 859, 860, 861, oriundos da rizosfera e endofíticos de raiz de plantas de cana soca. A presença de área clara ao redor da colônia bacteriana indica a solubilização do fosfato.

A avaliação semi-quantitativa da solubilização de fosfato inorgânico em meio de cultura sólido foi realizado por meio da estimativa do índice de solubilização (IS). Como na quantificação da produção do AIA, as bactérias associadas a plantas de cana soca também apresentaram variabilidade na expressão da solubilização do fosfato (figuras 4.4.A e 4.4.B).

Dentre as bactérias isoladas de plantas de cana com 4 meses de cultivo, foi observado que o índice de solubilização de fosfato inorgânico do isolado UAGC859, rizosférica da variedade RB92579, apresentou maior índice

de solubilização de fosfato, logo em seguida desta destacam-se das demais a UAGC913 e UAGC916 da RB867517; UAGC896, UAGC900 e UAGC902 da RB92579 (Figura 4.4). Contudo, entre as bactérias isoladas de plantas com 10 meses, foi observado que os maiores valores de IS para isolados da variedade RB867515, a UAGC940 oriunda da rizosfera; e UAGC968 e UAGC971 endofíticas de raiz.

As bactérias solubilizadoras de fosfato, associadas à rizosfera de plantas com 4 meses de cultivo subdividiram-se em três intervalos de valores, de acordo com o índice de solubilização: alto (2,7 - 3,5); médio (2,0 - 2,5) e baixo (1,0 - 1,8) (Figura 4.4.A). Essas bactérias endofíticas de raiz formaram um grupo a mais, apresentando maior variabilidade nos intervalos do IS: muito alto (4,34) com apenas a linhagens UAGC 859, alto (1,9 - 2,3), médio (1,5 - 1,8) e baixo (1,0 - 1,3) (Figura 4.4.B).

Dentre as bactérias isoladas de plantas com 10 meses de cultivo, foi observado que os isolados podem ser agrupados, de acordo com o IS, em 3 níveis de solubilização de fosfato, em ambos os nichos: alto (> 3), médio (2,5 - 2,9) e baixo ($< 2,4$) (Figura 4.5). Após essa descrição, pode-se observar que os valores médios do índice de solubilização de fosfato, de forma geral, variaram entre 1,0 e 3,9 (Figura 4.4 e 4.5).

4 meses de cultivo

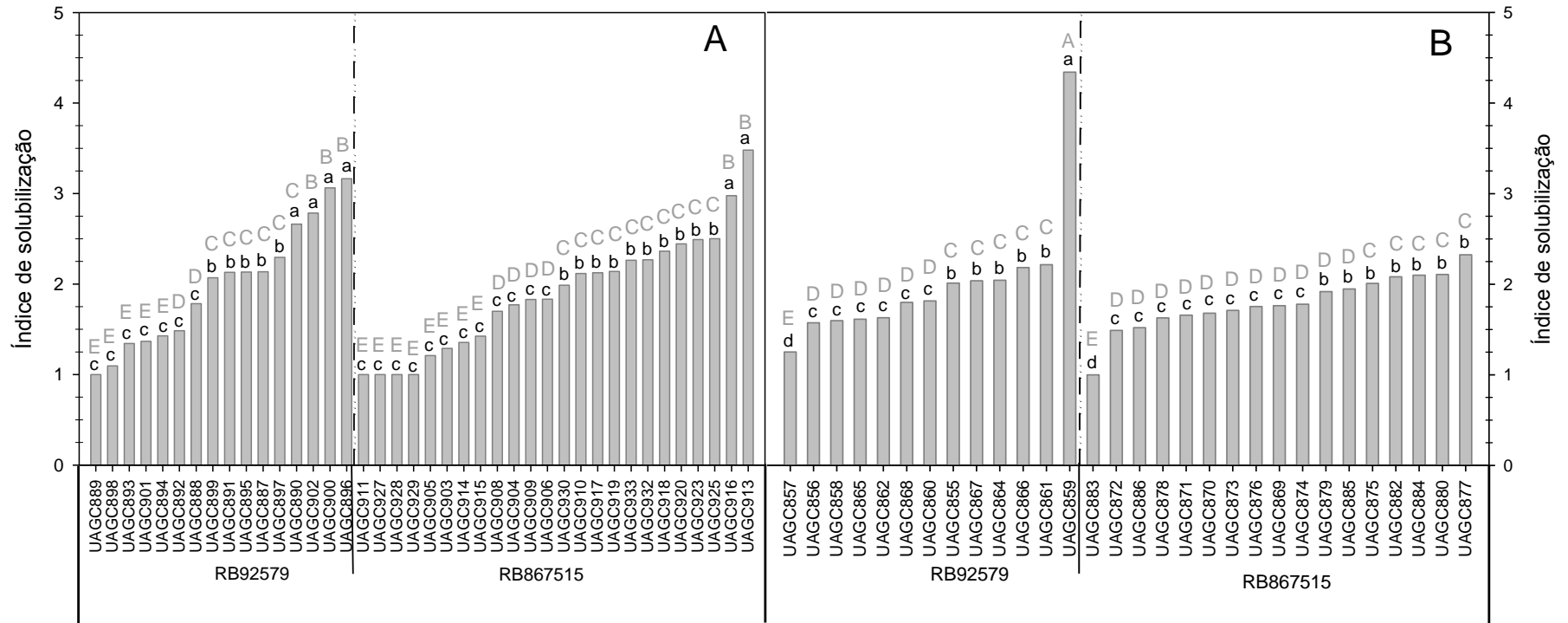


Figura 4.4. Índice de Solubilização de fosfato inorgânico (IS) de bactérias rizosféricas (A) e endofíticas de raiz (B) isoladas de duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515) com 4 meses de cultivo, após a primeira rebrota. Letras maiúscula comparam todas as médias independentes da coleta, nicho e variedade; as letras minúsculas comparam as médias dentro dos nichos; e as médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

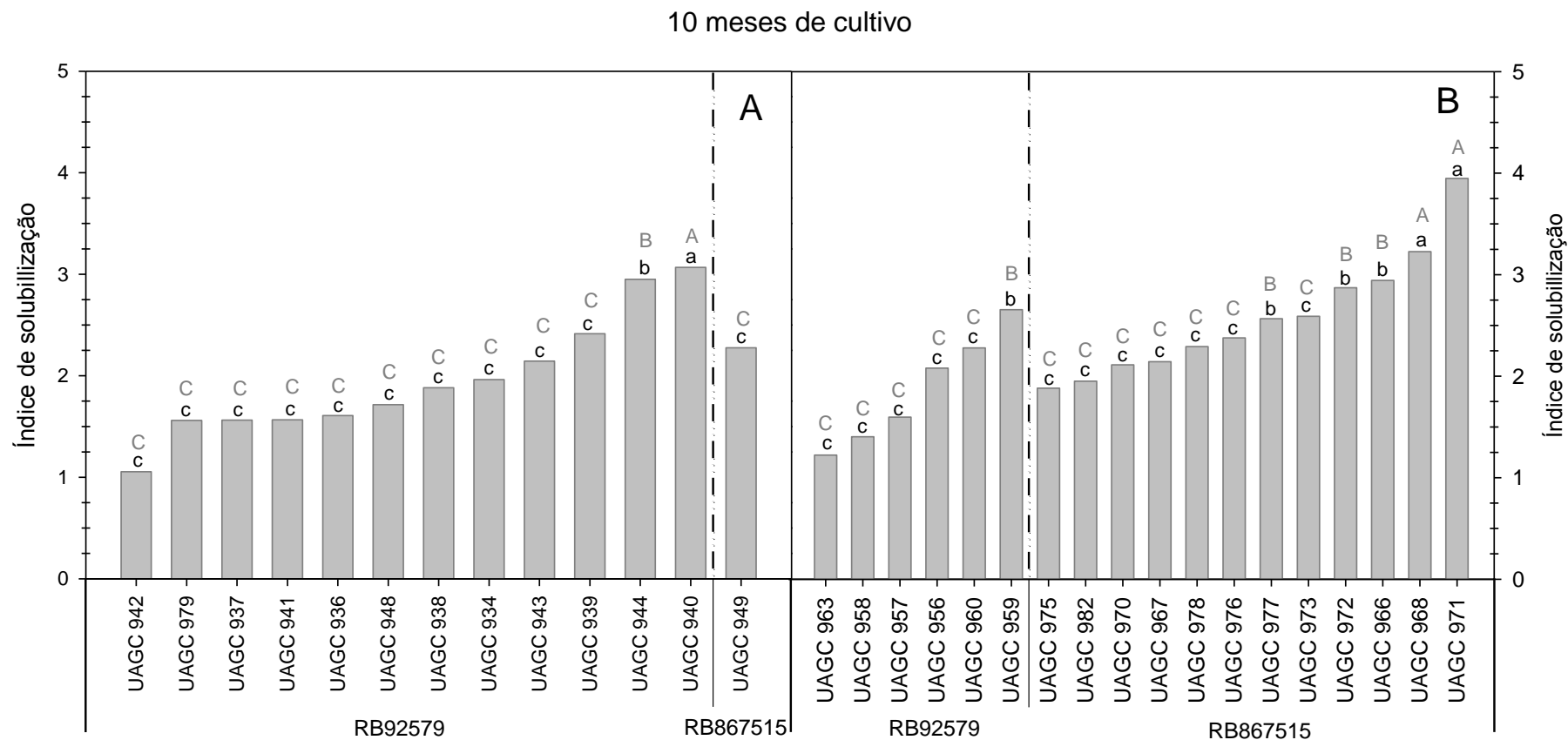


Figura 4.5. Índice de Solubilização de fosfato inorgânico (IS) de bactérias rizosféricas (A) e endofíticas de raiz (B) de duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515) com 10 meses de cultivo, após a primeira rebrota. Letras maiúscula comparam todas as médias independentes da coleta, nicho e variedade; as letras minúsculas comparam as médias dentro dos nichos; e as médias seguidas por letras iguais não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.3.4. Bactérias produtoras de quorum sensing AHLs

Foram avaliadas 125 bactérias quanto a capacidade de produzir moléculas quorum sensing AHLs, por meio da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4), biossensor de AHLs, que apresenta coloração azulada na presença de AHLs (Figura 4.6).

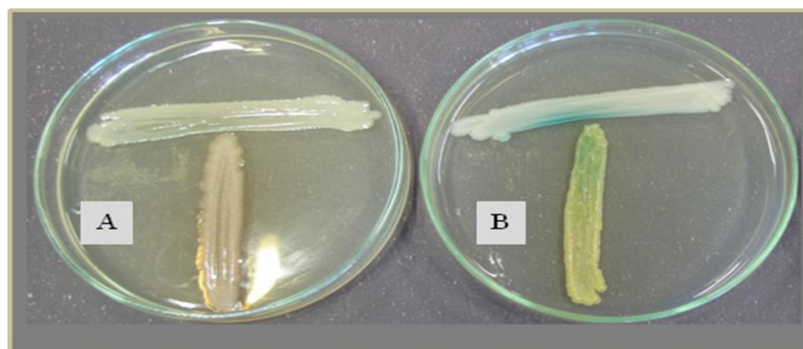


Figura 4.6. Detecção da produção de quorum sensing do tipo N-acil homoserinas lactonas (AHL) pro meio da produção de coloração azul da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4), inoculada horizontalmente. A – bactéria negativa (UAGC 940) e B – bactéria positiva (UAGC 858 denominada *Pantoea* sp.) para a produção de AHLs.

Foi observado que apenas 37,6% das bactérias avaliadas foram capazes de produzir AHLs, nas condições utilizadas. Quando considerado o tempo de cultivo das plantas hospedeiras, foi observado maior frequência de bactérias produtoras de AHLs entre os isolados de cana com 10 meses (48,9%) do que com 4 meses (30,7%). Além disso, foi observado que a maior (56,2%) e menor (17,6%) frequência de bactérias positivas estavam entre os isolados endofíticos de raiz de plantas da variedade RB867515, com 10 e 4 meses de cultivo, respectivamente.

4.3.5. Promoção de crescimento vegetal por bactérias associadas a plantas de cana soca

Dez bactérias (Tabela 4.2) foram selecionadas para o teste promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar, todas expressando a capacidade de crescer em meio livre de fonte nitrogenada, de produzir ácido indol acético e quorum sensing, e de solubilizar fosfato inorgânico, além de terem sido analisadas pela técnica de BOX-PCR (ver capítulo 1).

Tabela 4.2. Origem e identificação de bactérias associadas a plantas de cana soca com capacidade de crescer em meio livre de fonte nitrogenada, de produzir ácido indol acético e quorum sensing e de solubilizar fosfato inorgânico.

Linhagem	Identificação	Origem		
		Nicho	Variedade	Tempo de cultivo
UAGC 857	<i>Burkholderia</i> sp.	endofítico de raiz	RB92579	4 meses
UAGC 858	<i>Pantoea</i> sp.	endofítico de raiz	RB92579	4 meses
UAGC 865	<i>Erwinia</i> sp.	endofítico de raiz	RB92579	4 meses
UAGC 867	<i>Burkholderia</i> sp.	endofítico de raiz	RB867515	4 meses
UAGC 869	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	endofítico de raiz	RB867515	4 meses
UAGC 890	—	rizosfera	RB92579	4 meses
UAGC 895	<i>Burkholderia</i> sp.	endofítico de raiz	RB867515	4 meses
UAGC 903	<i>Enterobacter</i> sp.	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 904	<i>Burkholderia</i> sp.	rizosfera	RB867515	4 meses
UAGC 913	<i>Burkholderia</i> sp.	rizosfera	RB867515	4 meses

Essas 10 bactérias foram avaliadas quanto a influência da fonte de carbono, da salinidade e do pesticida fipronil sobre a capacidade de crescimento em meio semi-sólido NFb, quanto a influência de diferentes fontes de carbono sobre a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico e a capacidade de produzir AIA via dependente e independente de triptofano (Tabela 4.3).

Foi observado que nenhuma das dez bactérias avaliadas foram capazes de crescer em meio NFb com 7,5% e 10% de NaCl, indicando influência negativa sobre o caráter diazotrófico dos isolados. Contudo, quatro isolados (UAGC 858, UAGC 869, UAGC 890 e UAGC 903) toleraram até 2,5 de NaCl no meio NFb e outros quatro isolados toleraram até 5 de NaCl (UAGC 858, UAGC 865, UAGC 869 e UAGC 903) (Tabela 4.3). Com relação a influência da fonte de carbono sobre o crescimento em meio NFb, foi verificado que todas as 10 bactérias foram capazes de crescer em meio NFb com diferentes fontes de carbono (sacarose e ácido málico) em pHs 5,5 e 6,8. Contudo, quando avaliado o efeito de diferentes concentrações do pesticida fipronil, apenas a bactéria UAGC 903 demonstrou sensibilidade a todas as concentrações do cupinicida, sendo inibido totalmente seu crescimento no meio NFb. O isolado UAGC 867 foi capaz de crescer em meio sem fonte nitrogenada na presença de 100g/ha do fipronil, sendo inibido nas concentrações 200 e 400 g/ha. As outras 8 bactérias expressaram a funcionalidade para a FBN na presença de diferentes concentrações do pesticida fipronil (Tabela 4.3).

A fonte de carbono influenciou a solubilização de fosfato inorgânico das 10 bactérias avaliadas, sendo observado que na presença da glicose, sacarose e manitol, como substrato no meio de cultura, obteve-se 100%, 80% e 10% de funcionalidade para a característica avaliada, respectivamente. O maior índice de solubilização foi observado na UAGC 890, que diferiu estatisticamente das demais bactérias, em meio com glicose como fonte de carbono, para o meio com fonte de sacarose as médias do IS das bactérias solubilizadoras não apresentaram diferença significativa (Tabela 4.3).

A produção do AIA com e sem a presença do L-triptofano foi observado em 100% das linhagens avaliadas, observando valores médios que variaram de 2,87 - 64,94 e 0,09 - 1,50 µg/mL, respectivamente, sendo notório que a maiores médias para a produção de AIA foram obtidos na presença de L-triptofano. (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Caracterização funcional de 10 bactérias, associadas a plantas de cana soca, em meio NFB com diferentes concentrações de NaCl (0%; 2,5%; 5%; 7,5% e 10%) e do pesticida fipronil (100 g/ha, 200 g/ha, 400g/ha), e com duas fontes de carbono (sacarose e ácido málico) em pH 6,8 e pH5,5, índice de solubilização de fosfato de cálcio com três fontes de carbono (glicose, sacarose e manitol), e produção do ácido indol acético (AIA) na ausência do L-triptofano (trip).

Linhagens	Identificação	Potencial fixação biológica de nitrogênio – meio NFB											IS de fosfato de cálcio			AIA com trip µg/mL	AIA Sem trip	
		NaCl (%)					Sacarose		Ácido málico		Fipronil (g/ha)			Fonte de carbono				
		0	2,5	5	7,5	10	pH 6,8	pH 5,5	pH 6,8	pH 5,5	100	200	400	Glicose	Sacarose			Manitol
UAGC 857	<i>Burkholderia</i> sp.	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	2,27c	1,48a	-	5,12c	0,13f
UAGC 858	<i>Pantoea</i> sp.	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	2,72b	1,44a	-	64,94a	0,83b
UAGC 865	<i>Erwinia</i> sp.	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	2,82b	1,13a	-	2,87c	0,46d
UAGC 867	<i>Burkholderia</i> sp.	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	1,98d	1,22a	-	51,39a	0,30e	
UAGC 869	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	1,24d	-	-	43,24b	0,49d	
UAGC 890	Não identificada	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	3,80a	-	-	33,11b	0,58c	
UAGC 895	<i>Burkholderia</i> sp.	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	2,38b	1,75a	1,23	9,21c	0,11f	
UAGC 903	<i>Enterobacter</i> sp.	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	1,20d	1,17a	-	63,00a	1,50a	
UAGC 904	<i>Burkholderia</i> sp.	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	2,21c	1,47a	-	10,85c	0,09f	
UAGC 913	<i>Burkholderia</i> sp.	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	2,54b	1,57a	-	4,47c	0,17e	

Positiva (+) e Negativa (-).

As dez bactérias foram reinoculadas em rebolos de cana-de-açúcar, da variedade RB92579 e RB867515, sob 12 tratamentos: controle (sem inoculo bacteriano), mistura (UAGC 857, UAGC 867, UAGC 903 e UAGC 913) e cada um dos 10 isolados separadamente. Os valores médios observados na tabela 4, para as diferentes variáveis analisadas no experimento de reinoculação em cana-de-açúcar, apresentaram elevada variação, com exceção da variável diâmetro do colmo, que apresentou valores próximos, não diferindo estatisticamente (Tabela 4.4).

Na variedade RB92579, foram observadas as maiores médias para o tratamento que utilizou a bactéria UAGC 865 para a germinação; UAGC 857, UAGC890, UAGC895 e UAGC903 para o número de perfilhos; UAGC 857, UAGC867, UAGC 903 e UAGC904 para massa fresca da parte aérea e UAGC 857, UAGC858, UAGC865, UAGC869, UAGC890, UAGC903 e UAGC904 para massa fresca e seca da raiz, quando comparadas com as plantas do tratamento controle (Tabela 4.4).

Para a variedade RB867515, na maioria das variáveis analisadas, foi observado que os diferentes tratamentos apresentaram valores maiores em relação às médias do tratamento controle, tais como: no tratamento mistura e UAGC 890 para a germinação; mistura, UAGC 858, UAGC 865, UAGC 869, UAGC 890 e UAGC 913 para o N° de folhas; UAGC 904, seguida do tratamento mistura, UAGC 865, UAGC 895, UAGC913 para o nº de perfilhos; UAGC 857, UAGC 865, UAGC 890, UAGC 895 e UAGC 904 para a altura da planta; UAGC 865, UAGC 890, UAGC 895 e UAGC 904 para a massa fresca e seca da parte aérea e a UAGC 857 e mistura apenas para a massa seca; UAGC 904, mistura, UAGC 865 e UAGC 890 para a massa fresca e seca da raiz (Tabela 4.4).

A variedade RB867515 submetidas aos diferentes tratamentos de reinoculação bacteriana apresentaram um maior número de variáveis que diferiram estatisticamente do tratamento controle quando compara-se com os valores da variedade RB92579, isto porque os tratamentos aos quais a variedade RB867515 foram submetidas continham linhagens (UAGC 895, UAGC 904, UAGC 913) que foram isoladas da mesma variedade que fora reinoculadas, evidenciando a especificidade das bactérias a planta hospedeira (Tabela 4.4). Diferentemente dos demais tratamentos que apresentaram

número elevado de variáveis com significância em relação ao tratamento controle, os tratamentos UAGC 865 e UAGC 890 foram os quais houve adaptabilidade da bactéria a planta hospedeira, pois foi observado que esta interação favoreceu o desenvolvimento das plantas, sendo detectado pelas variáveis fisiológicas analisadas (Tabela 4.4).

Com relação ao tratamento mistura, composto pela UAGC 857 isolada da RB92579 e as UAGC 867, UAGC 913 e a UAGC 903 isoladas da RB867515, foi observado que este tratamento por conter um maior número de linhagens oriundas da variedade RB867515 apresentou melhor atuação quando reinoculados na variedade RB867515 devido a especificidade dos isolados bacterianos as plantas hospedeiras (Tabela 4.4).

É importante ressaltar que os valores médios dos tratamentos que evidenciaram diferença estatística, em relação às plantas do tratamento controle, na maioria das vezes quando não em todas as observações, apresentaram médias superiores a aproximadamente 50% e 100% de diferença para a massa fresca e seca da parte aérea e da raiz, respectivamente; e o número de perfilhos, em alguns tratamentos, chegaram a duplicar e triplicar os valores, para as variedades RB92579 e RB867515, respectivamente (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Avaliação do potencial de crescimento da associação de bactérias inoculadas em duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579 e RB867515).

Variedade	Tratamento	Identificação do Inoculo	Germinação	NF	NP	Altura da planta	Diâmetro do colmo	Parte aérea		Raiz	
								Matéria fresca	Matéria seca	Matéria fresca	Matéria seca
RB92579	Controle	Sem inoculo	5e	7a	3c	23,25 a	1,36 a	29,55 b	10,37 a	1,57 c	0,88 c
	Mistura	*	2h	7a	4b	22,25 a	1,27 a	28,87 b	12,17 a	2,07 c	1,31 c
	UAGC 857	<i>Burkholderia</i> sp.	7c	7a	6a	22,00 a	1,28 a	39,56 a	13,53 a	4,48 b	2, 71 b
	UAGC 858	<i>Pantoea</i> sp.	5e	7a	5b	16,00 b	1,17 a	21,13 c	8,17 b	3,30 b	1,84 b
	UAGC 865	<i>Erwinia</i> sp.	9a	7a	4b	19,50 b	1,36 a	26,86 b	10,31 b	4,43 b	2,69 b
	UAGC 867	<i>Burkholderia</i> sp.	8b	7a	4c	19,00 b	1,31 a	34,54 a	12,58 a	2,65 c	1,47 d
	UAGC 869	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	7c	7a	4b	21,00 a	1,03 a	15,51 c	5,84 b	4,3 b	2,13 b
	UAGC 890	Não identificado	3g	7a	6a	19,75 b	1,04 a	22,93b	7,97 b	3,43 b	1,72 c
	UAGC 895	<i>Burkholderia</i> sp.	4f	6a	5a	18,00 b	0,33 a	15,27 c	5,38 b	0,94 c	0,44 d
	UAGC 903	<i>Enterobacter</i> sp.	3g	8a	6a	21,00 a	1,68 a	35,99 a	14,49 a	4,23 b	2,53 b
	UAGC 904	<i>Burkholderia</i> sp.	3g	7a	5a	21,00 b	1,48 a	42,03 a	15,05 a	3,82 b	2,17 b
	UAGC 913	<i>Burkholderia</i> sp.	2h	4c	1d	14,00 b	1,51 a	9,14 c	1,75 b	0,78 c	0,27 d
RB867515	Controle	Sem inoculo	6d	5b	1d	18,00 b	1,05 a	11,98 c	4,44 b	0,81 c	0,74 d
	Mistura	*	7c	7a	3c	17,50 b	1,22 a	24,87 b	8,55 b	3,07 b	1,67 b
	UAGC 857	<i>Burkholderia</i> sp.	4f	6b	2d	22,25 a	1,36 a	28,26 b	8,47 b	2,49 c	1,47 d
	UAGC 858	<i>Pantoea</i> sp.	6d	7a	4b	18,00 b	0,83 a	10,15 c	3,90 b	2,26 c	1,46 c
	UAGC 865	<i>Erwinia</i> sp.	3g	7a	3c	23,00 a	1,42 a	45,78 a	9,92 a	4,98 b	2,47 b
	UAGC 869	<i>Burkholderia</i> sp.	2h	6a	4c	17,25 b	1,16 a	28,62 b	9,29 b	0,27 c	0,13 d
	UAGC 890	Não identificado	7c	7a	3c	23,00 a	1,56 a	43,48 a	16,48 a	4,88 b	2,91 b
	UAGC 895	<i>Burkholderia</i> sp.	3g	6b	2d	27,00 a	1,02 a	41,13 a	12,26 a	0,37 c	0,27 d
	UAGC 903	<i>Enterobacter</i> sp.	3g	5b	2d	19,00 b	1,18 a	15,51 c	4,59 b	0,69 c	0,43 d
	UAGC 904	<i>Burkholderia</i> sp.	4f	5b	5a	24,00 a	1,53 a	49,72 a	16,21 a	14,23 a	6,98 a
	UAGC 913	<i>Burkholderia</i> sp.	2h	7a	3c	18,50 b	1,18 a	16,87 c	6,08 b	2,31 c	1,50 c

NF: Nº de folhas; NP: Nº de perfilhos; “*” designa o tratamento mistura composto por três *Burkholderia* sp. (UAGC 857, 867e 913) e uma *Enterobacter* sp. (UAGC 903). Médias seguidas por mesma letra, dentro de cada coluna, não diferem pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.4. DISCUSSÃO

As bactérias associadas ao sistema solo/planta podem contribuir para o desenvolvimento vegetal por diferentes mecanismos, tais como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), biocontrole de doenças, competição por nutrientes no solo, produção de fitohormônios, como o ácido indol acético (AIA) e solubilização de nutrientes, como o fosfato inorgânico, entre outras (KINKEL et al., 2000; STURZ et al., 2000; PEDRAZA, 2008; TAULÉ et al., 2011; FERRARA et al., 2011). As linhagens bacterianas avaliadas na presente pesquisa foram isoladas da rizosfera e raízes de plantas de cana soca em meio seletivo semi-sólido Nfb obtendo-se 100% e 94% isolados potencialmente diazotróficas, aos 4 e 10 meses, respectivamente, corroborando com os trabalhos existentes, que relatam a existência de uma elevada frequência de espécies diazotróficas capazes de interagir com as plantas, colonizando diversos nichos como a rizosfera (FRANCHE, 2009), epifíticas (ELMERIC AND NEWTON, 2007) e endofíticas de raízes (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; BALDANI AND BALDANI, 2005). Recentemente, a FBN, tem sido estudada em diferentes espécies de gramíneas, tais como plantas de arroz, cana-de-açúcar e milho, encontrando nos nichos avaliados ampla diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio (BHATTACHARJEE et al., 2008).

Diversos gêneros bacterianos, como por exemplo, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Enterobacter*, *Pantoea* e *Acinetobacter*, que vivem associadas às plantas, estão relacionadas à promoção do crescimento vegetal, como detectado por Kuklinsky-Sobral et al. (2004), avaliando isolados bacterianos de soja, que observaram a solubilização de fosfato e a produção de AIA com elevada frequência na fase inicial de desenvolvimento das plantas, 49%, 52%; e 34%, 21% para bactérias endofíticas e epifíticas, respectivamente. Taulé et al. (2011) caracterizando isolados de cana-de-açúcar observou a presença de bactérias fixadoras de N₂ positivas para a solubilização de fosfato e produção de AIA, com aproximadamente, 21 e 65 linhagens funcionas, respectivamente. Taurian et al. (2010) avaliando o IS em plantas de amendoim obteve 110 linhagens bacterianas positivas. Resultados semelhantes, aos descritos acima,

foram observados no presente trabalho, pois também apresentou elevada frequência de bactérias positivas para a solubilização de fosfato inorgânico e produção de ácido indol acético.

Ferrara et al. (2011) relata que o fator localização, ou seja, nicho da bactéria associada a plantas de cana-de-açúcar, não influencia nos níveis de AIA produzido, pois foi observado níveis semelhantes da produção do AIA realizado por bactérias endofíticas e rizosféricas, corroborando com o presente estudo que também obteve resultados semelhantes.

Pinton et al. (2010) avaliando a produção de quorum sensing do tipo N-acil homoserinas lactonas (AHL), envolvidas com a formação de biofilmes microbianos, por 112 rizobactérias de hortaliças, observaram que apenas 14 foram consideradas positivas, e destas, duas foram obtidas da rizosfera do couve, três de salsa, quatro de rúcula e cinco da rizosfera de alface. O presente trabalho, assim como Pinton et al. (2010), também obteve um reduzido número de linhagens positivas para a produção de quorum sensing, cujo uma das funções é a produção do biofilme no interior da planta, que ocorre pela colonização vertical através do aumento progressivo de bactérias, por meio do crescimento e dispersão das células microbianas com subsequente aumento na produção do biofilme pelas inúmeras espécies bacterianas (XAVIER & FOSTEN, 2007). Nadell et al. (2008) observaram que bactérias utilizam o QS no controle de secreção de polímeros para atrair outras bactérias, formação de biofilme e consequente aumento da densidade populacional. Yaryura et al. (2008) relatam que houve formação de biofilme requerido para a colonização de raízes e sementes de plantas de soja por *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. Boyer et al. (2008) analisando o efeito do QS na promoção do crescimento relatou que os endófitos de plantas de arroz observaram que o QS inativou a atividade da pectinase, aumentou a síntese de sideróforos, reduziu a produção do ácido indol acético e não afetou a atividade da celulase e motilidade da comunidade bacteriana.

Diversos fatores, bióticos e abióticos, podem influenciar a interação entre bactérias e plantas (RANGARAJAN et al., 2003; BUÉE et al., 2009; PARIONA-LLANOS et al., 2010), como o presente trabalho que observou a influência da salinidade e da aplicação de pesticidas sobre o crescimento bacteriano em

meio livre de nitrogênio, ou seja, a possível influência sobre a capacidade de FBN, como também da fonte de carbono sobre a solubilização de fosfato inorgânico. Semelhantemente, Jha et al. (2011) estudaram isolados bacterianos, oriundos da halófito *Salicornia brachiata*, capazes de crescer em condições adversas de salinidade e obtiveram isolados bacterianos que cresceram em meio NFb com sais, produziram AIA, solubilizaram fosfato e tinham capacidade de promoção do crescimento vegetal.

A capacidade potencial de promover o crescimento vegetal por bactérias, associadas a plantas de cana soca, selecionadas in vitro, que expressam características envolvidas com a promoção de crescimento vegetal, foi efetivada pela reinoculação em toletes de cana e a observação do impulsionamento no crescimento vegetativo da cana-de-açúcar. Resultado similar foi encontrado por Hungria et al. (2010), que avaliaram a promoção do crescimento de plantas de trigo e milho quando inoculadas por *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense*, que observaram um incremento na produção de 662–823 kg ha⁻¹ em relação as não inoculadas, respectivamente. Urquiaga et al. (2011), em ensaio experimental, observaram um incremento de 40 Kg N ha⁻¹ na produtividade da cana-de-açúcar advindo da associação biológica de bactéria-planta na fixação do nitrogênio; e também descreveu que variedades de cana-de-açúcar brasileiras tem obtido contribuições agronômicas significativas de N₂ oriundo da FBN, realizadas no habitat endofítico, bem como Taulé et al. (2011) que avaliaram a contribuição da fixação do N₂ da comunidade bacteriana diazotrófica em cana-de-açúcar obtendo um incremento significativo de 34,8 - 58,8%.

Portanto, este trabalho realizado com plantas de cana soca, o qual avaliou característica fisiológica bacteriana para caracteres relacionados com a promoção do crescimento vegetal, evidenciou a multifuncionalidade, a resiliência de suportar condições adversas e analisar a capacidade potencial de bactérias que realizaram a promoção do crescimento em diferentes variedades de cana-de-açúcar, tornando-se assim, promissoras para a aplicação biotecnológica agrícola, visando aumento da produtividade de forma sustentável ambientalmente e viável economicamente para o meio ambiente e para a agricultura.

4.5. CONCLUSÕES

As 125 linhagens bacterianas isoladas de plantas soca de cana-de-açúcar possuem alta variabilidade funcional e representatividade populacional para realizar a FBN, produção do AIA, solubilização de fosfato nas variedades RB92579 e RB867515 no nicho rizosférico e endofítico de raiz. Contudo apresentaram pequena representatividade funcional positiva de bactérias capazes de realizar a produção do *quorum sensing*.

O tempo de cultivo, 4 e 10 meses, da cana soca não influenciaram nas análises quantitativas da produção do AIA e na solubilização de fosfato. Diferentemente foi observado para as análises qualitativas correlatas aos 4 meses de cultivo de cana soca houve uma maior freqüência de linhagens bacterianas funcionais para a FBN e solubilização de fosfato.

A capacidade de resiliência das bactérias nas diferentes condições *in vitro* é variável com concentração aplicada e bactéria analisada, pois as linhagens bacterianas avaliadas variaram a atividade funcional, a maioria das bactérias deixaram de realizar a FBN com o aumento crescente da concentração de NaCl; já com o acréscimo do fipronil a elas continuaram exercendo a função de fixação de N₂ *in vitro*; para a fonte carbono e pH em meio NFB a funcionalidade de caráter positivo não foi alterada; A solubilização de fosfato de acordo com a fonte de carbono não foi observada; a produção do AIA ocorreu independente da presença ou ausência de L-triptofano.

A caracterização funcional e inoculação de isolados bacterianos proporcionaram a seleção de linhagens, pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Pantoea*, *Erwinia*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* e o não identificado da linhagem UAGC 890 que promoveram o crescimento de plantas de cana-de-açúcar, em casa de vegetação, tornando-se potenciais candidatas para experimentos de campo.

As linhagens bacterianas (UAGC 895, UAGC 904, UAGC 913, UAGC 867 e a UAGC 903) presentes nos diferentes tratamentos, inclusive no tratamento mistura, foram eficientes em promover a promoção do crescimento vegetal quando reinoculadas em plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515, pois estas linhagens foram oriundas de plantas da mesma

variedade, fato este que ocasionou a especificidade dos isolados bacterianos a planta hospedeira.

4.6. REFERÊNCIAS

ANDREOTE, F. DI.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**. 40:417-432, 2009.

ARENCIBIA, A. D.; ESTEVEZ, Y.; VINAGRE, E.; BERNAL, A.; PEREZ, J.; CARMONA, E.; HEMERLY, A. S.; SANTANA, I. Induced-resistance in sugarcane against pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans* mediated by an endophytic interaction. **Jornal Sugar Tech**. 8:272-280, 2006.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 77:549-579, 2005.

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**. 80:199-209, 2008.

BAYER, W. D.; MATHESIUS, U. Plant responses to bacterial quorum sensing signals. **Plant Biology**. 7:429-433, 2004.

BUÉE, M.; BOER, W.; MARTIN, F.; VAN OVERBEEK, L.; JURKEVITCH, E. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. **Plant Soil**. 321:189-212, 2009.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; 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**. 42:1-10, 2009.

DIAS, A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPÇÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 25:189-195, 2009.

ELMERICH, C.; NEWTON, W. E. Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. **Springer**, 2007. 205 p.

FERRARA, F. I. S.; OLIVEIRA, Z. M.; GONZALES, H. H. S.; FLOH, E. I. S.; BARBOSA, H. R. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant Soil**. 2011. 347:1-400, 2011.

FORCHETTI, G.; MASCIARELLI, O.; IZAGUIRRE, M. J.; ALEMANO, S.; ALVAREZ, D.; ABDALA, G. Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi. **Current Microbiology**. 61:485-493, 2010.

FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant Soil**. 321:35-59, 2009.

HARTMANN, A.; LEMANCEAU, P.; PROSSER, J. I. Multitrophic interactions in the rhizosphere. Rhizosphere microbiology: at the interface of many disciplines and expertises. **FEMS Microbiology Ecology**. 65:179, 2008.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. L. M.; PEDROSA, F. O.; Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**. 331:413-425, 2010.

JHA, B.; GONTIA, I.; HARTMANN, A. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. **Plant Soil**. 346:1-400, 2011.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKES, M.L. Non- symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**. 36:1229-1244, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**. 6:1244-1251, 2004.

KINKEL, L.L., WILSON, M., AND LINDOW, S.E. Plant species and plant incubation conditions influence variability in epiphytic bacterial population size. **Microbiology Ecology**. 39:1-11, 2000.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAUJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. 73:7259-7267, 2007.

NADELL, C. D; XAVIER, J. B; LEVIN, S. A; FOSTER, K. R. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. **PLoS Biology**. 6:1-14, 2008.

PARIONA-LLANOS, R.; FERRARA, F. I. S.; GONZALES, H. H. S.; BARBOSA, H. R. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. **European Journal of Soil Biology**. 46:387-393, 2010.

PEDRAZA, R.O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. 125:25-35, 2008.

PINTON, R.; DIAS, A.; XAVIER, T. F.; ROUWS, L. F. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; RIBEIRO, R. L. D. Caracterização morfo-cultural, biossíntese de autoindutor e formação de biofilme por rizobactérias de hortaliças. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 45:284-293, 2010.

RANGARAJAN, S.; SALEENA, L. M.; VASUDEVAN, P.; NAIR, S. Biological suppression of rice diseases by *Pseudomonas* spp. under saline soil conditions. **Plant and Soil**. 251:73-82, 2003.

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

SCHMIDT, M. A.; SOUZA, E. M.; BAURA, V.; WASSEM, R.; YATES, M. G. PEDROSA, F.O.; MONTEIRO, R. A. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 44:182-185, 2011.

STURZ, A.V., CHRISTIE, B.R., AND NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 19:1-30, 2000.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F.; The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant Soil**. 347:1-400, 2011.

TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant Soil**. 329:421-431, 2010.

URQUIAGA, R. P. X.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant Soil**. 346:-400, 2011.

WOESE, C.R. There must be a prokaryote somewhere - microbiologists search for itself. **Microbiological Reviews**. 58:1-9, 1994.

XAVIER, J. B.; FOSTER, K. R. Cooperation and conflict in microbial biofilms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**.104:76-881, 2007.

YARYURA, P. M.; LEÓN, M.; CORREA, O. S.; KERBER, N. L.; PUCHEU, N. L.; GARCÍA, A. F. Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for Colonization of Roots and Seeds of Soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. **Current Microbiology**. 56:625-632, 2008.

ZHANG, Y. Z.; WANG, E. T.; LI, M.; LI, Q. Q.; ZHANG, Y. M.; ZHAO, S. J.; JIA, X. L.; ZHANG, L. H.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X.; Effects of rhizobial inoculation, cropping systems and growth stages on endophytic bacterial community of soybean roots. **Plant Soil**. 347:147-161, 2011.