

**MICHELANGELO DE OLIVEIRA SILVA**

**BACTÉRIAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR:  
ISOLAMENTO E POTENCIAL PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO VEGETAL**

**RECIFE - PE  
Fevereiro - 2011**

**MICHELANGELO DE OLIVEIRA SILVA**

**BACTÉRIAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR:  
ISOLAMENTO E POTENCIAL PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO VEGETAL**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciência do Solo.**

**RECIFE - PE  
Fevereiro - 2011**

Ficha Catalográfica

S586b Silva, Michelangelo de Oliveira  
Bactérias associadas à cana-de-açúcar: isolamento e potencial promoção de crescimento vegetal / Michelangelo de Oliveira Silva. -- 2011.  
69 f. : il.

Orientador: Fernando José Freire.  
Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2011.

Referências.

1. Ecologia microbiana 2. Diazotróficas 3. Fixação de nitrogênio 4. Solubilização de fosfato 5. Tecnologia agrícola  
I. Freira, Fernando José, orientador II. Título

CDD 631.46

## **DADOS BIOGRÁFICOS**

**MICHELANGELO DE OLIVEIRA SILVA** – Nascido em Umarizal, RN, em 29 de Setembro de 1980, filho de José Raimundo da Silva Júnior e Terezinha de Oliveira Silva. Em agosto de 1998, ingressou na Escola Superior de Agricultura de Mossoró e concluiu em dezembro de 2003 o curso de Engenharia Agrônômica. Em março de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia (Ciência do Solo) na Universidade Federal Rural de Pernambuco – PE, como bolsista da CAPES, com conclusão em Março de 2006. Em março de 2007, iniciou o curso de doutorado em Ciência do Solo na Universidade Federal Rural de Pernambuco – PE, como bolsista da CAPES e CNPq, com conclusão em março de 2011.

Aos meus pais, José Raimundo da Silva Júnior e Terezinha de Oliveira Silva pelo esforço, carinho, amor exemplo de luta e dignidade, e aprendizado no convívio diário para que esse dia tão importante em minha vida fosse alcançado.

À minha irmã, Monikely de Oliveira Silva, amigos e familiares pelo carinho e apoio partilhados nos momentos difíceis.

**DEDICO E OFEREÇO**

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao amigo e orientador, Prof. Dr. Fernando José Freire, pelo exemplo de profissionalismo, orientação, dedicação, paciência, amizade e principalmente por sua atenção e compreensão em momentos de dificuldades.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo pela oportunidade de realização do curso de Doutorado e ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro. À Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE pela parceria na realização desse trabalho

Ao Professor Fernando José Freire, pela orientação, amizade e paciência na realização deste trabalho.

Aos Professores Júlia Kuklinsky Sobral e Mario de Andrade Lira Júnior também pela orientação na realização deste trabalho.

Aos Professores: Maria Betânia Galvão dos Santos Freire, Fernando José Freire, Júlio Rodrigues Vilar, Clístenes Williams Araujo do Nascimento, Mateus Rosas Ribeiro, Adriana Maria de Aguiar Accioly, Newton Pereira Stanford, Carolina Etienne do Rosário e Silva Santos, Mateus Rosas Ribeiro Filho, Izabel Cristina de Luna Galindo, José Ramon Barros Cantalice, Ângelo Giuseppe Chaves Alves, Gustavo Pereira Duda, Júlia Kuklinsky Sobral, Maria de Fátima Cavalcanti Barros, Mario de Andrade Lira Júnior, Sheila Maria Bretas Bittar Schulze, Valdomiro Severino de Souza Júnior, Brivaldo Gomes de Almeida, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários da UFRPE Maria do Socorro, Noca, Anacleto, Josué, Camilo; e aos funcionários da UAG pelo carinho, respeito e a forma como me trataram.

Aos amigos Patrícia Maia, Arruda Jr., Évio Eduardo, Michelangelo Bezerra, Priscila Alves, Marcela Campanharo, Sandro Barbosa, Cristiane, Dagmar Alves, Euzelina, Arlete, Hugo, Rômulo, Maria, Marise, Welka, Ailson, João Paulo, Francisco, Alexandre, Guilherme, Marilucia, Marcio, Adelazil, e todos aqueles que fizeram ou fazem desse programa de pós-graduação maravilhoso.

Aos, meus irmãos de coração Agenor, Edivan e Laerte, pela convivência sadia, as horas de alegria, e a força nos momentos tristes, pelos momentos de resenha e de como foi seu dia nas reuniões noturnas no quarto de Laerte e Agenor, e são esses momentos que guardamos e consolidar essa amizade de irmãos de sangue pelo resto de nossas vidas. Obrigado amigos, irmãos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

*"Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo. Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas, porque somos curiosos... e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos. Siga em frente."*

*Walt Disney*



SILVA, MICHELANGELO DE OLIVEIRA, Dr. Pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Fevereiro de 2011. Bactérias associadas à cana-de-açúcar: isolamento e potencial promoção de crescimento vegetal. Orientador: Dr. Fernando José Freire. Conselheiros: Dra. Júlia Kuklinsky Sobral e Dr. Mario de Andrade Lira Júnior.

## RESUMO

A exploração e o conhecimento dos mecanismos de interação bactéria-planta poderão ser utilizados em sistemas de manejo que busquem uma produção sustentável de diversas culturas de interesse agrícola, principalmente a cana-de-açúcar, que exerce grande importância na economia atual. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade de bactérias (endofíticas e do rizoplane) associadas a diferentes variedades de cana-de-açúcar, cultivadas no Nordeste e selecionar bactérias com potencial em promover o crescimento vegetal (fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de fosfato), para uma possível redução de fertilizantes. Bactérias endofíticas, de folha e raiz, e do rizoplane foram isoladas de três variedades comerciais (RB 92579, RB 867515 e RB 863129) de cana-de-açúcar, cultivadas no Nordeste, em áreas com e sem aplicação de cupinicida e em duas épocas (4 e 10 meses) de desenvolvimento da planta. As bactérias foram isoladas em meio TSA 10% e no meio seletivo NFb e selecionadas quanto a sua capacidade de solubilizar fosfato inorgânico e fixar nitrogênio. No final do processo foram isoladas cerca de 410 isolados em meio rico (TSA) e cerca de 245 isolados em meio NFb (diazotróficas), isso para ambas épocas de coleta. Na interação bactéria-cana-de-açúcar, a densidade populacional total, de bactérias amarelas e brancas foi influenciada pelas variedades de cana avaliadas e pelos tecidos vegetais, e pelo manejo e, além disso, foi possível concluir que as variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Nordeste apresentam uma comunidade bacteriana associada com potencial aplicação para a promoção de crescimento vegetal, pois possuem a capacidade de fixar nitrogênio, solubilizar fosfato inorgânico e produzir AIA. Planta de cana-de-açúcar cultivada em Pernambuco possui uma comunidade de bactérias endofíticas distinta em relação aos outros estados produtores, sendo algumas identificadas como dos gêneros: *Burkholderia*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*.

**Palavras chave:** Ecologia Microbiana, Fixação de Nitrogênio, Solubilização de Fosfato, Diazotróficas.

SILVA, MICHELANGELO DE OLIVEIRA, Dr. Universidade Federal Rural de Pernambuco, February 2011. Bacteria associated with sugar cane: isolation and potential plant growth promotion. Adviser: Dr. Fernando José Freire. Committee Members: Dra. Júlia Kuklinsky Sobral e Dr. Mario de Andrade Lira Júnior.

## ABSTRACT

The exploration and understanding of the mechanisms of bacteria-plant interaction may be used in management systems that seek a sustainable production of several crops in agriculture, mainly sugar cane, which has great importance in today's economy. Therefore, the objective was to evaluate the diversity of bacteria (endophytic and rhizoplane) associated with different varieties of cane sugar grown in the Northeast and select bacteria with potential to promote plant growth (nitrogen fixing and phosphate solubilizing) for a possible reduction of fertilizer. Endophytic bacteria, leaf and root, and rhizoplane were isolated from three commercial varieties (RB 92579, RB 867515 and RB 863129) of cane sugar grown in the Northeast, in areas with and without the application of Termiticide and in two seasons (4 and 10 months) of plant development. The bacteria were isolated in 10% TSA media and selective media NFB and selected based on their ability to solubilize inorganic phosphate and nitrogen fixation. At the end of the process were isolated about 410 strains in rich media (TSA) and about 245 isolated media NFB (diazotrophic), that for both harvests. In the interaction bacteria-cane sugar, the total population of yellow and white bacteria was influenced by the varieties of cane and evaluated by plant tissues, and its management, and, moreover, it was concluded that the varieties of sugarcane sugarcane grown in the Northeast have a bacterial community associated with potential application to plant growth promotion, since they have the ability to fix nitrogen, solubilize inorganic phosphate and produce AIA. Plant cane sugar grown in Pernambuco has a distinct community of endophytic bacteria in relation to other producing states, some being identified as the genus *Burkholderia*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* and *Enterobacter*.

Word keys: Microbial Ecology, Nitrogen Fixation, Phosphate Solubilization, Diazotrophic.

## SUMÁRIO

DADOS BIBLIOGRAFICOS.....	iii
DEDICO E OFEREÇO.....	iv
AGRADECIMENTO ESPECIAL.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 HIPOTESE .....	3
2.1 OBJETIVOS .....	3
2.1.1 Objetivo geral .....	3
2.1.2 Objetivos específicos .....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1 A Cana-de-açúcar: Importância e Pespectivas .....	4
3.2 Adubação nitrogenada em cana-de-açúcar.....	6
3.3 Origem da fixação biologica de nitrogênio e bactérias.....	7
3.4 Os microorganismos endofíticos.....	9
3.5 Potencialidade das bactérias endofíticas.....	11
4 MATERIAL E METODOS .....	13
4.1 Áreas de coleta e material vegetal.....	13
4.2 Processamento das amostras.....	13
4.3 Isolamento das bactérias associadas a cana-de-açúcar.....	15
4.4 Seleção de bactérias com capacidade de fixar N <sub>2</sub> .....	16
4.5 Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico .....	17
4.6 Seleção de bactérias com capacidade de produzir ácido idol acético (AIA).....	18
4.7 Identificação e analise das linhagens.....	19
4.8 Analise estatística .....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	20
5.1 Avaliação da comunidade bacteriana cultivável endofítica e epifítica da cana-de-açúcar .....	20
5.2 Seleção de bactérias com potencial para fixar N <sub>2</sub> .....	25
5.2.1 Amostragem de cana-de-açúcar aos 4 meses de idade.....	25

<b>5.2.2 Amostragem de cana-de-açúcar aos 10 meses de idade.....</b>	<b>29</b>
<b>5.3 Seleção de bactérias com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico .....</b>	<b>31</b>
<b>5.3.1 Amostragem de cana-de-açúcar aos 4 meses de idade.....</b>	<b>31</b>
<b>5.3.2 Amostragem de cana-de-açúcar aos 10 meses de idade.....</b>	<b>36</b>
<b>5.4 Seleção de bactérias produtoras de ácido idol acético (AIA).....</b>	<b>41</b>
<b>5.5 Identificação das linhagens por sequenciamento do gene 16S rRNA.....</b>	<b>45</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma planta que ocupa posição de destaque entre as culturas de importância econômica no cenário nacional e internacional. O Brasil é o maior produtor mundial, com uma safra estimada para 2010/11 de 664.333,4 milhões de toneladas, sendo esta produção destinada, principalmente, à fabricação de açúcar e álcool. Esta produção é resultado de um aumento de 9,9% (59,82 milhões de toneladas) em relação à safra de 2009/10 (CONAB, 2011).

Devido à importância desta cultura, o Brasil tem investido cada vez mais na manipulação genética destas plantas, e o estudo da diversidade microbiana associada apresenta-se como importante alternativa para melhorar as características da planta e a sustentabilidade desta cultura. Estudos sobre a comunidade endofítica de cana-de-açúcar demonstram que os gêneros *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconoacetobacter* e *Herbaspirillum* podem participar da fixação biológica de nitrogênio atmosférico, o que pode gerar um aumento de produção sem elevar custos e redução da aplicação de insumos como adubos nitrogenados.

Além dos elementos carbono, hidrogênio e oxigênio, que são obtidos pelas plantas do ar e da água, o nitrogênio é quantitativamente o mais importante, sendo o que mais frequentemente limita o crescimento vegetal. O ar contém aproximadamente 80% de gás N<sub>2</sub> (nitrogênio) por volume, mas as plantas não são capazes de utilizar este elemento em forma gasosa, podendo apenas absorvê-lo do solo na forma de compostos solúveis: nitrato e amônio. Na agricultura, grandes quantidades de adubos nitrogenados estão sendo utilizados para fornecer nitrogênio para as culturas, mas frequentemente os produtores não têm os recursos para comprar adubos suficientes para obter altos rendimentos.

A pesquisa sobre a fixação biológica de nitrogênio para a nutrição nitrogenada das plantas cultivadas na agricultura brasileira tem obtido avanços importantes nas últimas duas

décadas. Exemplos destes avanços podem ser observados nas culturas da soja e da cana-de-açúcar, nas quais o conteúdo de N proveniente da FBN permite que se cultive soja sem aplicação de N-fertilizante e se reduza significativamente a adubação nitrogenada em cana-de-açúcar, ou quando necessárias quantidades bem menores que a extraída pela cultura, sem empobrecimento do solo deste nutriente.

Em relação a família das gramíneas, que engloba os grãos mais importantes na alimentação humana e nas rações para animais, como milho, trigo, arroz e sorgo, as gramíneas forrageiras (colonião, braquiária, etc.), e a cana-de-açúcar, observa-se que são incapazes de formar nódulos nas raízes. Entretanto, desde 1956 no Brasil iniciaram-se estudos sobre outras bactérias fixadoras de  $N_2$  que se associam com estas culturas, tendo sido descobertas desde então 7 novas espécies de bactérias fixadoras de  $N_2$ , tendo sido a partir de 1983 comprovado através de novas técnicas de quantificação, que algumas destas gramíneas podem promover contribuições significativas de nitrogênio através da atividade destes microorganismos (BODDEY & DÖBEREINER 1988).

A fixação biológica do  $N_2$  em plantas da família *Poaceae* (antiga *Gramineae*) apresentou avanço intenso nas duas últimas décadas, fruto da disponibilidade de ferramentas moleculares que permitiram uma exploração mais detalhada da interação planta/bactéria. É interessante notar o aumento da pesquisa na área, em diferentes países, com a descrição de novas espécies fixadoras de  $N_2$ , embora grande parte dos estudos ainda esteja concentrada nas espécies que acumularam maior conhecimento, tais como *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* e, mais recentemente, com espécies diazotróficas de *Burkholderia*.

Mas mesmo assim, ainda há muito a ser feito para chegar a um produto final de qualidade. A utilização de um produto para cereais e cana-de-açúcar deverá movimentar o setor que hoje, praticamente, só produz inoculante para a soja. Maiores investimentos em pesquisa deverão ser realizados, visando ao desenvolvimento de melhores meios de cultivo,

sobrevivência das células, estabilidade e modo de aplicação. Investimentos em pessoal qualificado e parceria com a pesquisa também serão importantes para atender ao mercado. Uma nova cadeia de venda e certificação deverá ser gerada e o agricultor poderá fazer uso de um produto que permitirá a redução de custo de produção com a conservação do meio ambiente.

## **2. HIPOTESE**

A diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar, nos canaviais do Nordeste, é influenciada pelo genótipo ou fase de desenvolvimento da planta hospedeira ou pelas características do solo ou manejo.

### **2.1. OBJETIVOS**

#### **2.1.1. Objetivo Geral:**

Avaliar a diversidade de bactérias (endofíticas e do rizoplane) associadas a diferentes variedades de cana-de-açúcar, cultivadas no Nordeste e selecionar bactérias com potencial em promover o crescimento vegetal (fixadoras de nitrogênio, solubilizadoras de fosfato e produtoras de ácido indol acético), para uma possível redução de fertilizantes.

### **2.1.2. Objetivos Específicos:**

- i) Avaliar a diversidade da comunidade diazotrófica cultivável associada à cana-de-açúcar (bactérias endofíticas de folha e raiz, e do rizoplano) por meio de isolamento total e isolamento seletivo;
- ii) Isolar, identificar e selecionar bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> (endofíticas e do rizoplano), solubilizadoras de fosfato inorgânico e produtoras de ácido indol acético em diferentes variedades de cana-de-açúcar, visando promover crescimento vegetal;

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1. A CANA-DE-AÇÚCAR: IMPORTÂNCIA E PESPCTIVAS**

A cana-de-açúcar é classificada taxonomicamente como pertencente à classe *Liliopsida*; família *Poaceae*; tribo *Andropogoneae*; e gênero *Saccharum* de acordo com o NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION). O cenário da evolução e domesticação da cana-de-açúcar descrito por Brandes em 1958 é muito semelhante ao correto, o qual foi estabelecido com evidências genéticas moleculares por (GRIVET et al., 2004).

Os primeiros relatos de cana-de-açúcar no Brasil datam de 1522 na cidade de São Vicente quando a cultura foi trazida da Ilha da Madeira por Martin Afonso de Souza e, posteriormente, introduzida no Pernambuco por Duarte Coelho Pereira em 1533 (BASTOS, 1987). No período colonial a cultura era destinada exclusivamente à produção de açúcar e a partir de 1970, com o incentivo do governo brasileiro, a agroindústria canavieira explorou a



potencialidade e uso da cana-de-açúcar como fonte de energia renovável (SZMRECSÁNUI, MOREIRA, 1991) e atualmente o Brasil é modelo no uso do etanol como bicomcombustível atraindo o interesse internacional (CARVALHO, 2002).

A lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil. Os maiores índices de aumento de área são encontrados em São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais. Quanto ao aspecto agrônômico, a cultura da cana-de-açúcar apresenta um desenvolvimento excelente, resultante do sincronismo entre a tecnologia aplicada no cultivo e as condições climáticas favoráveis. A ocorrência de chuvas frequentes favoreceu o desenvolvimento da cana-de-açúcar, mas, no primeiro momento, causou a diminuição do teor de sacarose que é medida através do ATR (açúcar total recuperável), que ainda pode ser recuperado com a maturação completa da cana (CONAB, 2011).

A área de cana colhida destinada à atividade sucroalcooleira, na presente safra, está estimada em 8.091,5 mil hectares, distribuída em todos estados produtores. O Estado de São Paulo continua sendo o maior produtor com 54,35% (4.397,5 mil hectares) seguido por Minas Gerais com 8% (647,7 mil hectares), Paraná com 7,5% (607,9 mil hectares), Goiás com 7,4% (601,2 mil hectares), Alagoas com 5,74% (464,6 mil hectare), Mato Grosso do Sul com 4,2% (339,7 mil hectares) e Pernambuco com 4,1% (334,2 mil hectares). Nos demais Estados Produtores as áreas são menores, mas, com bons índices de produtividade. A produtividade média brasileira está estimada em 82.103 kg/hectare, 0,6% maior que a da safra 2010/11, mostrando um certo equilíbrio nas duas safras. O Centro-Sul puxa as médias para cima devido às condições de produção, tamanho de lavoura, tipo de solo, topografia, clima e tecnologia aplicada. A previsão do total de cana moída é de 664.333,4 mil toneladas com incremento de 9,9% em relação a safra 2010/11, o que significa terá 59.820 mil toneladas a mais para moagem nesta safra (CONAB, 2011).

Segundo o primeiro levantamento da CONAB, (2011), do total da cana esmagada, 301.517,2 mil toneladas (45,4%) foram destinadas à produção de açúcar, as quais devem

produzir 38.667 mil toneladas do produto. O restante, 36.2816,2 mil toneladas (54,6%) destinadas à produção de álcool, devem gerar um volume total de 28.500 milhões de litros de álcool, deste total, 8.359,9 milhões de litros são de álcool anidro e 20.140,1 milhões de litros serão de álcool hidratado.

A safra que se iniciou traz perspectivas otimistas para o setor sucroalcooleiro no que diz respeito à comercialização dos seus produtos. O mercado para o açúcar continua assegurado já que um dos principais exportadores, a Índia, ainda não recuperou a sua produção. Deste modo, com as exportações aquecidas, os preços do produto encontram sustentação em uma demanda mundial latente e um mercado ofertado, principalmente, pelo produto brasileiro que exporta cerca de 40% da sua produção (CONAB, 2011).

A importância da cana-de-açúcar pode ser atribuída a sua múltipla utilização, sendo empregada in natura sob a forma de forragens, para a alimentação animal, ou como matéria prima para a fabricação de rapadura, melado, água ardente, açúcar e álcool. A grande importância da cultura não deriva somente do seu significado como volume de produção ou emprego de mão-de-obra, mas também porque constitui componente relevante na dieta da população brasileira.

### **3.2. ADUBAÇÃO NITROGENADA NA CANA-DE-AÇÚCAR**

A cana-de-açúcar é uma cultura altamente extrativa em nitrogênio, sendo que, para alcançar uma produtividade média de 100 Mg ha<sup>-1</sup> de colmos, acumula em sua parte aérea 180-250 e 120-180 kg ha<sup>-1</sup> de N, nos ciclos culturais de cana-planta (Primeiro ciclo) e socarias (ciclos seguintes), respectivamente (OTTO, 2007).

Apesar de todo o conhecimento existente em relação ao manejo do nitrogênio no sistema solo-cana-de-açúcar, uma questão ainda não está devidamente esclarecida, ou seja, o

conceito que se tem da baixa resposta do ciclo agrícola de cana-planta à adubação nitrogenada. Verifica-se, na literatura, que grande número de experimentos com cana-planta não apresentam resposta em produtividade ao nitrogênio, o que se têm atribuído à fixação biológica do N atmosférico; às perdas por lixiviação do N-fertilizante; ao vigor do sistema radicular da cana-planta comparada ao de soqueiras; às condições climáticas, associada à calagem, ao preparo mecânico e à incorporação de restos da cultura anterior (OTTO, 2007; BOLOGNA-CAMPBELL, 2007).

Considerando-se que as quantidades de N-fertilizante aplicadas não ultrapassam a dose de 80 kg ha<sup>-1</sup> de N em média, o restante deste N pode ser proveniente de outras duas fontes principais: o N do solo, o qual é naturalmente pouco disponível para as plantas nos solos brasileiros, e do processo de FBN realizado por bactérias diazotróficas endofíticas ou presentes na rizosfera (URQUIAGA *et al.* 1992). As evidências atuais, indicam que esta última fonte de N pode contribuir em até 60% de todo N acumulado pelas plantas de cana-de-açúcar (BODDEY *et al.*, 2001, POLIDORO *et al.*, 2001, COELHO *et al.*, 2003), e depende do genótipo da planta e sua interação com os diversos gêneros de bactérias associativas (SALA *et al.*, 2005, 2007).

### **3.3. ORIGEM DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E BACTÉRIAS**

O problema do N do solo e das plantas permanecia sem uma solução e com vários questionamentos principalmente quando diversos estudiosos observaram o comportamento nada convencional das leguminosas e porque não de algumas não leguminosas. Já que em alguns casos elas cresciam bem sem a aplicação de N, ou com quantias mínimas desse nutriente, enquanto em outras situações não havia crescimento das plantas.

Tais questionamentos não são datados só de hoje, e sim, vem ocorrendo e perdurando desde o século XIX, quando dois bacteriologistas franceses, Theodore Schloesing e Alfred Muntz, em experimentos com purificação de água de esgoto detectaram a presença de amônia e que no fim de um certo período começava aparecer nitrato. Os dois observaram que a produção de nitrato parava quando era adicionado clorofórmio, e que poderia ser reiniciada pela adição de um pouco de água de esgoto, com isso, concluíram que a nitrificação era realizada pela ação bacteriana.

Esses resultados foram aplicados a solos por um cientista inglês chamado Robert Warrington, que conseguiu mostrar que também a nitrificação poderia ser paralisada pelo bisulfeto de C e clorofórmio e que o processo poderia ser reiniciado pela adição de solo não esterilizado.

Com o passar de alguns anos dois alemães, Hellriegel e Wirlfarth, concluíram que uma bactéria dentro de nódulos em leguminosas tinha a capacidade de assimilar N<sub>2</sub> gasoso da atmosfera para convertê-lo em uma forma que poderia ser utilizada por plantas superiores, essa foi o primeiro relato da FBN. Eles, entretanto, não isolaram os organismos responsáveis por esse processo. Isto foi feito mais tarde por M. W. Beijerinck, que chamou o organismo de *Bacillus radicicola*.

Com o passar de séculos grandes avanços nessa área ocorreu, com varias descobertas científicas, publicações, bancos de dados e de genes formados e produção de inoculantes. Grandes culturas como, por exemplo, a soja sabe-se que mais de 70% de seu N é oriundo da FBN.

No Brasil, os primeiros relatos de fixação biológica de nitrogênio em gramíneas, são das pesquisas Dra. Johanna Dobreiner, com a sua importante contribuição para o conhecimento de interação de microrganismos diazotróficos na rizosfera de gramíneas, com estudos iniciados na década de 50, que tiveram repercussão internacional e consolidou sua liderança mundial nesse assunto, além de sua contribuição na formação de vários

pesquisadores no Brasil e na América Latina. Foi quem teve as primeiras associações identificadas de bactérias aeróbias do gênero *Beijerinckia* spp. com a cana-de-açúcar e *Azotobacter paspali* com a grama batatais (*Paspalum notatum*) (DÖBEREINER, 1966 e 1992). Até então, várias destas associações já foram identificadas, sendo a maioria, em regiões de clima tropical e subtropical onde as temperaturas do solo são mais favoráveis aos processos microbiológicos durante todo o ano, sendo várias as culturas envolvidas.

### **3.4. OS MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS**

Os microorganismos endofíticos podem ser classificados como todos aqueles que habitam, pelo menos durante um período de seu ciclo vital, o interior de um vegetal, sem causar aparentemente nenhum dano ao hospedeiro. Numa definição mais ampla, endófitos podem ser considerados microorganismos isolados do interior de tecidos vegetais desinfetados superficialmente, e que não causam, aparentemente, danos às plantas. Portanto, eles diferenciam-se dos microorganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças. São distintos dos microorganismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Até agora, nenhuma das numerosas interações planta-microorganismo está completamente compreendida. Sabe-se que para interagirem com as plantas, diferentes microorganismos, com propósitos distintos, muitas vezes utilizam os mesmos mecanismos (HARTMANN et al., 2009).

Interações entre plantas e microorganismos têm causado grande efeito no desenvolvimento das civilizações desde que a humanidade começou a depender extensivamente de culturas para alimentação e subsistência. Diversos microorganismos interagem com os tecidos e células das plantas com diferentes graus de dependência, podendo desenvolver interações benéficas (simbióticas ou não) ou patogênicas. Entre as interações planta-microorganismo benéficas que têm sido estudadas em detalhes, estão aquelas onde as

bactérias dos gêneros *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* estabelecem simbiose com as plantas da família leguminosa formando nódulos exclusivamente nas raízes. Nessas relações sabe-se que os microrganismos fornecem nutrientes nitrogenados às plantas. A planta, por sua vez, contribui com nutrientes energéticos gerados pelo processo fotossintético. Outras espécies de bactérias diazotróficas têm sido encontradas dentro dos tecidos de gramíneas e algumas dessas plantas, como certas variedades de cana-de-açúcar, podem obter uma percentagem substancial dos seus requerimentos de nitrogênio (FRANCHE et al., 2009; HARTMANN et al., 2009).

A planta de cana-de-açúcar apresenta elevada eficiência fisiológica na utilização de nitrogênio, absorvendo prontamente o nitrato e convertendo-o, em contato com carboidratos, em amidas e aminoácidos.

A associação entre bactérias diazotróficas e cana-de-açúcar envolve mecanismos singulares, ainda pouco compreendidos (JAMES, 2000). Apenas alguns gêneros bacterianos endofíticos foram isolados e apenas alguns deles foram estudados: *Herbaspirillum* sp (OLIVEIRA et al., 2002), *Enterobacter* sp (RENNIE et al., 1982), *Erwinia* sp (RENNIE et al., 1982), *Burkholderia* sp (REIS et al., 2006), *Klebsiella* sp (RENNIE et al., 1982) e as espécies de *Pantoea agglomerans* (LOIRET et al., 2004), *Bacillus polymixa* (RENNIE et al., 1982) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PERIN et al., 2004).

Há diversos gêneros bacterianos associados às plantas com capacidade de fixar biologicamente o N<sub>2</sub>, entre os quais pode-se citar *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Herbaspirillum*, *Gluconoacetobacter*, *Pseudomonas* e *Pantoea* (BLANCO et al., 2005; SANTOS et al., 2010), sendo conhecidas como bactérias diazotróficas. Entre estas diazotróficas, a espécie *Gluconoacetobacter diazotrophicus* é uma das mais exploradas em relação à sua associação com a cana-de-açúcar, pois é endofítica obrigatória, ou seja, permanece viável por um curto período quando não está em associação com a planta hospedeira e, além disso, é capaz de produzir reguladores de crescimento vegetal

e de fixar N<sub>2</sub> (MUÑOZ-ROJAS et al., 2005; MEDEIROS et al., 2006). Contudo, a busca por outros gêneros que se associem a cana-de-açúcar é ressaltado por alguns pesquisadores (DOBEREINER, 1992; DOBEREINER et al., 1995; BODDEY et al., 2001; BLANCO et al., 2005; MEDEIROS et al., 2006).

### 3.5. POTENCIALIDADE DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

As bactérias associativas podem contribuir para o aumento do rendimento de diversas culturas. Kuklinsky-Sobral (2003) considerou que a promoção do crescimento vegetal por estas bactérias pode ser resultado tanto de ações indiretas quanto diretas. Em relação às ações indiretas, foi citado o controle biológico por competição por nutrientes, a produção de sideróforos, a antibiose e a indução de resistência sistêmica no hospedeiro. Como ações diretas estão a disponibilização de nutrientes às plantas, a FBN e a produção de promotores de crescimento das plantas (PCPs), (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; ANDREOTE, 2007).

A maioria das bactérias diazotróficas associadas a gramíneas pode produzir fitormônios, chamados comumente de promotores de crescimento das plantas (PCPs). Estes compostos orgânicos são responsáveis pelo aumento da área de absorção radicular e pelo desenvolvimento da planta. Entre as bactérias produtoras de PCPs destacam-se *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Xantomonas*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Serratia* (ASGHAR et al., 2002, KHALID et al., 2003; RICHARDSON et al., 2009).

A habilidade das bactérias diazotróficas em produzir PCPs é considerada como um fator de grande importância para a fertilidade do solo. A maioria dos diazotróficos associados a gramíneas pode sintetizar e excretar PCPs, que são compostos orgânicos que influenciam os processos fisiológicos das plantas em baixas concentrações. Entre os principais PCPs

sintetizados pelas bactérias diazotróficas destacam-se as auxinas, que são hormônios responsáveis pelo aumento da área de absorção radicular e pelo desenvolvimento da planta pelo alongamento e proliferação das raízes secundárias (SHI et al., 2009).

Essas bactérias diazotróficas encontram-se associadas com raízes de plantas ou em vida livre no solo. O vegetal pode se beneficiar indiretamente desta fonte de nitrogênio fixado por meio de relações simbióticas ou associativas com bactérias, incorporando esse nitrogênio ao seu metabolismo. Como parte da cadeia alimentar, as plantas disponibilizarão os compostos nitrogenados para outros microrganismos ou animais que dela se alimentarem. Assim, de uma maneira ou de outra, todos os seres vivos obtêm parte de seu nitrogênio a partir da redução deste composto efetivada por bactérias diazotróficas. O nitrogênio fixado biologicamente é menos suscetível à lixiviação e volatilização, já que é fixado *in situ*, sendo esse, portanto, um processo biológico que contribui para um desenvolvimento sustentável da agricultura. Além disso, estima-se que a produção industrial de fertilizantes nitrogenados consuma 1% da energia mundial total por ano, sendo, portanto, oneroso econômica e ambientalmente (RICHARDSON et al., 2009)

Tendo em vista estes fatores, o processo biológico de fixação do nitrogênio despertou interesse, sendo estudado em laboratórios de todo o mundo, visando, obviamente, reduzir a produção e o consumo de fertilizantes nitrogenados, utilizando as bactérias diazotróficas como uma forma alternativa de fornecimento de nitrogênio às plantas.

Além disso, os microrganismos apresentam a capacidade de solubilizar fontes de P inorgânico, ou seja, as bactérias solubilizadoras de fosfato dissolvem o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou pela diminuição do pH; conseqüentemente, ocorre a produção de fosfato disponível que pode ser capturado pelas plantas (VAZQUEZ et al., 2000; VASSILEV & VASSILEVA, 2003, BLANCO et al., 2005).

Neste contexto, vários estudos têm sido realizados com a finalidade de avaliar microrganismos com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico. Entre os gêneros



bacterianos conhecidos com capacidade estão *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azotobacter* e *Erwinia* (RODRIGUEZ et al., 2000; VERMA et al., 2001; GARG et al., 2001; BLANCO et al., 2005). Portanto, a habilidade de bactérias epifíticas e endofíticas em solubilizar fosfato inorgânico tem sido alvo de grande interesse por parte dos microbiologistas agrícolas, pois esta característica apresenta um grande potencial para a promoção de crescimento vegetal. É interessante salientar que as bactérias endofíticas com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico ganham importância durante o processo de colonização, pois podem inicialmente colonizar superficialmente o hospedeiro e, conseqüentemente, provê-lo deste mineral essencial para o desenvolvimento vegetal.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

##### **4.1. ÁREAS DE COLETA E MATERIAL VEGETAL**

Foram coletadas variedades comerciais (RB 867515, RB 92579 e RB 863129) de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), cedidas pela Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina/PE (EECAC) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, e em área experimental da usina Petribu no município de Lagoa de Itaenga/PE, como também amostras de solo da região do rizoplano destas variedades no ciclo de cana-planta. A coleta ocorreu nas variedades que estavam sendo cultivadas em campo, em solos com características e manejo diferenciados, em áreas onde se aplicava cupinizada (Usina Petribu) e em áreas em que não se aplicava cupinizada (EECAC) (Tabela 1).

As coletas para os isolamentos foram realizados na estação experimental de Carpina (sem o uso de cupinizada), e na usina Petribu (com o uso de cupinizada), em duas etapas: a primeira quando as plantas estavam com 4 meses e a segunda com 10 meses de cultivo. Foram amostradas cerca de 30 plantas, sendo 10 de cada variedade, com o objetivo de avaliar

as plantas hospedeiras de maior vigor fisiológico para uma melhor representação da variedade. A primeira e a segunda coleta foram realizadas nos mesmos talhões.

**Tabela 1** – Caracterização do manejo dos talhões da estação de Carpina e da usina Petribu.

Variedade	Data de Plantio	Nº do Talhão	Adubação	Calagem	Controle de erva daninha e, ou, pragas
<b>Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina</b>					
RB 92579	03/06/2008	18	12-24-18 (500 kg ha <sup>-1</sup> )	Não foi necessário	Herbicida de pré-emergência (2,5 L ha <sup>-1</sup> )
RB 867515	20/06/2008	31	12-24-18 (500 kg ha <sup>-1</sup> )	1,5 t ha <sup>-1</sup> (08/05/2008)	
RB 863129	10/06/2008	31	12-24-18 (500 kg ha <sup>-1</sup> )	1,5 t ha <sup>-1</sup> (08/05/2008)	
<b>Usina Petribu</b>					
RB 92579	28/06/2008	37-03	20 t ha <sup>-1</sup> de torta de filtro no fundo do sulco; 150 kg ha <sup>-1</sup> de KCl em	Não foi necessário	Herbicida de pré-emergência (1L ha <sup>-1</sup> e 2L ha <sup>-1</sup> )
RB 867515	21/06/2008	07-31 (Guará)	cobertura; e 500 kg ha <sup>-1</sup> (06-30-24)		Herbicida de pós-emergência (3L ha <sup>-1</sup> )
RB 863129	28/06/2008	136-35 (Fazenda Anta)			Cupinicida (200 g ha <sup>-1</sup> )

O procedimento de isolamento foi realizado no Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) na Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG). Para o isolamento foram utilizadas 12 plantas das três variedades de cana-de-açúcar amostradas, sendo quatro plantas para cada variedade. As 12 amostras foram utilizadas tanto para o isolamento de bactérias endofíticas, como também o solo da região do rizoplano para as epifíticas.

A comunidade bacteriana endofítica (folhas e raízes) e do rizoplano associadas a diferentes plantas de cana-de-açúcar foram isoladas em meios ricos TSA 10% (*Trip-case Soy Agar*), segundo DOBEREINER et al. (1995).

## 4.2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras ao chegarem ao Laboratório passaram por uma seleção quanto ao seu vigor fisiológico de acordo com as características de cada variedade, selecionando-se 4 plantas de cada variedade. Após esse procedimento as plantas foram lavadas em água corrente para tirar o excesso de impurezas, como também o excesso de solo agregado as raízes. Com isso as amostras foram cortadas e pesadas, para o início do procedimento do isolamento.

Para o isolamento de bactérias endofíticas de folha e raiz foram utilizadas as amostras de raízes utilizadas no preparo da solução de extração (PBS) das bactérias epifíticas e cerca de 1 a 3 g de tecido vegetal das folhas e raiz. Para tanto é necessário um processo de desinfecção superficial, eliminando os possíveis microrganismos que se encontrem nas camadas mais superficiais do tecido vegetal.

A técnica de desinfecção superficial deve ser feita dentro do “Fluxo Laminar” com materiais estéreis para evitar qualquer contaminação das amostras. Foi realizada da seguinte forma:

- a) Lavaram-se as amostras de folha e raiz (foi lavado antes de ser colocado no PBS) em água corrente para a retirada de resíduos de poeira e solo;
- b) Cortaram-se as amostras em fragmentos de 8 a 12 cm;
- c) Pesou-se as amostras;
- d) Incubou-se em álcool 70% por 1 min;
- e) Incubou-se em hipoclorito de sódio por 3 min;
- f) Incubou-se em álcool 70% por 30 seg;

- g) Enxaguou-se duas vezes em água destilada e esterilizada (sendo que a segunda água é reservada, e depois plaqueadas em meio TSA, com o objetivo de ter um controle da eficiência da desinfecção).

#### **4.3. ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS ASSOCIADAS A CANA-DE-AÇÚCAR**

Após a desinfecção, as amostras (folha e raiz) são maceradas com pistilo em almofariz com 10 mL de solução de PBS, em seguida a mistura é colocada em tubos falcon e levados para o agitador por 40 min à 120 rpm. A solução obtida é diluída em tampão PBS e distribuídas em placas de petri, no volume de 100 µL, em duplicatas sem diluição (sd) e em triplicata na diluição  $10^{-1}$  para cada amostra de folha. Para as amostras de raiz foram duplicatas na diluição  $10^{-3}$  e em triplicata na diluição  $10^{-4}$ , no meio TSA, suplementados com o fungicida Cercobin 700 (Tiofanato - Metílico) (50µg/mL), obtendo-se assim 5 placas de petri, por amostra de folha e raiz.

Para o isolamento das bactérias epifíticas foi utilizado o tampão de isolamento PBS em erlenmeyers de 500 mL para cada amostra de raiz (12 amostras). Em cada erlenmeyer foram adicionados 50 mL de solução tampão PBS, e adicionadas de perolas de vidros que por intermédio de atrito facilitará a retirada do solo do rizoplano. Logo após, foram pesadas aproximadamente 3 g das amostras de tecido fresco de raízes (lavadas) e adicionadas a solução de PBS nos erlenmeyers. As soluções de cada uma das doze amostras foram levadas para o agitador e permaneceram durante 60 min a uma rotação de 90 rpm. Os erlenmeyers foram levados para o “Fluxo Laminar” onde foram retirados 100 µL da solução de PBS de cada amostra. Foram feitas duplicatas na diluição  $10^{-4}$  e triplicatas na diluição  $10^{-5}$  em placas de petri contendo meio de cultura TSA (10%), resultando em cinco placas de petri por amostra. Esse procedimento foi realizado para as duas coletas e nas duas épocas (4 e 10 meses de cultivo)

Os isolados de cada tratamento que foram distribuídas em placas de Petri contendo o meio TSA foram incubados em BOD à 28 °C, e observados o crescimento com 2, 8 e 14 dias, onde naquelas que foram isoladas em placa foram realizadas contagens e recontagens.

Em seguida, foi feita uma seleção dos isolados, com base em aspectos morfológicos. Esses isolados foram estocados em tubos tipo penicilina com meio TSA para posteriormente passarem pelo processo de purificação.

Colônias bacterianas com características de cada grupo morfológico observado foram repicadas para placas de Petri com meio TSA 10%, purificadas pela técnica de esgotamento e estocadas a 4 °C, no mesmo meio de cultura. Além disso, as linhagens também foram estocadas em meio TSA 10% líquido, suplementado com 20% de glicerol, e mantidas a -20 °C.

#### **4.4. SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM CAPACIDADE DE FIXAR DE N<sub>2</sub>**

A seleção de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> foi realizada segundo Dobereiner et al. (1995). Para tanto, as bactérias foram inoculadas em meio semi-sólido NFb [5g/l de ácido málico; 0,5 g/l de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g/l de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 g/l de NaCl; 0,01 g/l de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 4 ml/l de Fe.EDTA (solução 1,64%); 2 ml/l de azul de bromotimol (0,5%); 2 ml/l de solução de micronutrientes (0,2 g/l de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,235 g/l de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,28 g/l de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,008 g/l de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O); 1,75 g/l de agar; pH 6,8], incubadas a 28 °C por 8 dias. Os experimentos foram realizados em triplicatas e o resultado positivo foi caracterizado pela presença de um halo de crescimento no interior do meio de cultura. O procedimento foi repetido novamente para verificação da real função de fixação.

#### **4.5. SELEÇÃO DE BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO INORGÂNICO**

A seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico foi realizada segundo (VERMA, et al. 2001; RODRIGUEZ, et al. 2000), com algumas modificações. As bactérias foram inoculadas em meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel (10 g/l de glicose; 5 g/l de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 1 g/l de  $\text{NaCl}$ ; 1 g/l de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 4 g/l de  $\text{CaHPO}_4$ ; 15 g/l de agar; pH 7,2). A concentração do fosfato cálcio foi aumentada em cinco vezes. As placas foram inoculadas a 28 °C por 72 h e, em seguida, realizadas as leituras. Os experimentos foram realizados em triplicatas e a presença de um halo claro em torno da colônia indicou a solubilização do fosfato.

#### **4.6. SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM CAPACIDADE DE PRODUZIR ÁCIDO IDOL ACÉTICO**

A avaliação qualitativa da produção de ácido indol acético (AIA) foi realizada pela metodologia colorimétrica e específica, que caracteriza a produção do fitormônio, por meio da utilização do reagente Salkowski. Para tanto, colônias isoladas foram inoculadas em meio líquido TSA 10%, suplementado e não suplementado com 5 mM de L-triptofano, incubados sob agitação (120 rpm) a 28 °C, na ausência de luz, por 24 h. Após esta etapa, a cultura bacteriana foi acrescida do reagente de Salkowski (2% de  $\text{FeCl}_3$  0,5 M em 35% de ácido perclórico), na proporção de 1:1, incubadas por 30 min a 28 °C, na ausência de luz. Após o período de incubação, as culturas foram avaliadas e classificadas de acordo com o desenvolvimento ou não de coloração rósea. Os experimentos foram realizados em triplicatas e foi utilizada como controle positivo a linhagem EN303 (*Pseudomonas oryzae*), bactéria endofítica de soja, produtora de auxina, solubilizadora de fosfato inorgânico e fixadora de  $\text{N}_2$  (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004).

#### **4.7. IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS LINHAGENS**

As identificações das linhagens foram realizadas por meio da análise do seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA, em laboratório especializado. As seqüências foram submetidas ao banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]) e analisadas pelo BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*), sendo alinhadas e comparadas com seqüências existentes e identificadas em nível de gênero e espécie.

#### **4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram submetidos à análise da variância e suas interações desdobradas e submetidas ao teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para comparação das médias entre os fatores de variedade, tecido vegetal, época e manejo. Para os fatores com dois graus de liberdade foi realizado o teste “t”. O teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizado para analisar os resultados qualitativos da fixação de N<sub>2</sub>, a produção de ácido indol acético (AIA) e de solubilização de fosfato, com probabilidade de 5%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Avaliação da comunidade bacteriana cultivável endofítica e epifítica da cana-de-açúcar.

A presença de bactérias endofíticas e epifíticas de folhas e raízes de três variedades de cana-de-açúcar foi determinada durante os 4 e 10 meses do desenvolvimento vegetal de cana-planta em solos manejados na presença e ausência de cupinicida, na safra de 2008/09. Durante as avaliações, não foi observada a presença de crescimento bacteriano nas placas do controle da desinfecção superficial, mostrando que a metodologia utilizada eliminou a comunidade epifítica cultivável dos tecidos vegetais.

A densidade populacional da comunidade de bactérias endofíticas de folha e raiz e epifíticas do rizoplano nas variedades de cana-de-açúcar (RB 92579, RB 867515 e RB 863129), aos 4 meses de desenvolvimento da planta e sem aplicação de cupinicida, variou de  $10^2$  a  $10^9$  UFC/g de TVF (Tabela 2). Todavia, a aplicação de cupinicida não influenciou a densidade populacional dessa comunidade de forma a promover alterações que chegasse a ser notada pela análise estatística. Uma possível resposta é que a dose sugerida aonde vem sendo aplicado na região de  $200 \text{ g ha}^{-1}$  não seja suficiente para promover alterações na comunidade bacteriana.

As diferentes partes vegetativas e o rizoplano das variedades avaliadas também influenciaram a densidade populacional de bactérias endofíticas e epifíticas, aos 4 meses de idade, cultivadas sem aplicação de cupinicida (Tabela 2). A densidade populacional de bactérias foi maior na seguinte ordem rizoplano > raiz > folha. Para todas as variedades, a região do rizoplano foi a que teve a maior concentração de bactérias com os maiores valores de densidade populacional.



**Tabela 2** - Densidade populacional total da comunidade bacteriana endofítica da folha e raiz, e epifíticas do rizoplano de diferentes variedades de cana-de-açúcar na presença e ausência de cupinicida, aos 4 e 10 meses de idade, média e F das variáveis.

Fator		Densidade Total	
		Sem Cupinicida	Com Cupinicida
Região	Variedade	----- LOG <sub>10</sub> UFC/g de Tecido Fresco -----	
Com 4 meses			
Folha	RB 92579	3,0225	3,8516
	RB 867515	3,9219	2,5653
	RB 863129	4,1757	4,0924
Raiz	RB 92579	6,0864	5,6374
	RB 867515	5,4346	5,6674
	RB 863129	6,8804	7,1597
Rizoplano	RB 92579	8,6464	8,3152
	RB 867515	8,3950	9,1976
	RB 863129	8,6570	9,5338
	Média	6,1355	6,2245
	F		- 0,366 <sup>n.s</sup>
Com 10 meses			
Folha	RB 92579	3,1590	4,5248
	RB 867515	3,2946	4,0769
Raiz	RB 92579	5,9222	6,0095
	RB 867515	6,9062	6,5392
Rizoplano	RB 92579	9,6867	8,4267
	RB 867515	10,1773	8,4713
	Média	6,5243	6,3414
	F		0,087 <sup>n.s</sup>

A colonização preferencial de bactérias endofíticas e epifíticas na região da raiz reflete a presença de altos níveis de nutrientes localizados na rizosfera e rizoplano, os quais podem ser utilizados para o crescimento e metabolismo bacterianos (COCKING, 2003; MEDEIROS, et al. 2006).

A densidade populacional da comunidade de bactérias endofíticas de folha e raiz e epifíticas do rizoplano nas variedades de cana-de-açúcar (RB 92579 e RB 867515), aos 10 meses de desenvolvimento da planta e sem aplicação de cupinicida, variou de 10<sup>3</sup> a 10<sup>10</sup>

UFC/g de TVF (Tabela 2). A densidade populacional de bactérias não foi influenciada pelo uso do cupinicida. Apenas as diferentes partes da planta e o rizoplano apresentaram diferentes populações de bactérias, tendo apresentado a seguinte ordem decrescente rizoplano > raiz > folha. Para todas as variedades a região do rizoplano foi a que apresentou a maior concentração de bactérias com os maiores valores de densidade total (Tabela 2). Com o uso de cupinicida a densidade populacional total variou de  $10^4$  a  $10^9$  UFC/g de TVF (Tabela 1) e o comportamento apresentado foi o mesmo observado na ausência dele, com as partes da planta e do rizoplano apresentando a seguinte ordem decrescente rizoplano > raiz > folha.

Durante o desenvolvimento da cultura, principalmente nos estágios iniciais, a densidade de bactérias na região da raiz foi maior que nas folhas (Tabela 2). Este padrão de distribuição da comunidade ao longo da planta, no qual as partes inferiores da planta hospedam maiores frequências de endófitos, seguem o mesmo padrão de colonização de bactérias endofíticas isoladas de cana-de-açúcar (MENDES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009) e em outras culturas como a soja (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004), e em arroz (JHA et al., 2009; PRAKAMHANG et al., 2009). Isso se deve ao fato de que é justamente nessa região onde ficam mais concentrado os exudados expelidos pelas raízes das plantas, carregados de fontes de energia e de nutrientes necessários para os ciclos das células bacterianas.

Os valores totais de ocorrência de bactérias endofíticas observados não são afetados significativamente com relação aos estágios de desenvolvimento da planta, em alguns genótipos podemos observar uma diminuição em sua densidade dos 4 meses para os 10 meses que o caso da RB 863129 (Tabela 2), principalmente na região do rizoplano. Isso pode ser atribuído as exigências nutricionais da planta que mudam em cada estagio de desenvolvimento, fazendo com que as bactérias se transloquem para acompanhar esse deslocamento de nutrientes. Esse fato sugere que as plantas possuem uma capacidade de suporte desses microrganismos, mesmo que os grupos microbianos sejam diferentes para as

diferentes regiões, como também para cada genótipo. Estes resultados mostram que, nas condições avaliadas, o tempo não afetou a comunidade bacteriana associada à cana-de-açúcar. Esse estudo suporta estudos anteriores realizados em tabaco, no qual a comunidade microbiana é afetada apenas nos estágios iniciais do desenvolvimento da planta, havendo um efeito transiente que é neutralizado em estágios posteriores (ANDREOTE et al., 2007).

Bactérias endofíticas e epifíticas foram localizadas principalmente nas raízes, apresentando um gradiente decrescente das raízes às folhas, sugerindo que os endófitos podem se locomover das raízes para regiões superiores do hospedeiro durante o desenvolvimento da planta. Além disso, pode-se sugerir que a principal região de entrada dos endófitos deva ser a raiz e regiões basais do hospedeiro e, que a partir daí, possam se disseminar no interior da planta. Resultados semelhantes foram encontrados na cultura da cana-de-açúcar, soja e arroz em outros trabalhos de pesquisa (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009; JHA et al., 2009). A colonização preferencial de bactérias endofíticas e epifíticas na região da raiz refletem a presença de altos níveis de nutrientes localizados na rizosfera e rizoplano, os quais podem ser utilizados para o crescimento e metabolismo bacterianos (GLICK, 1995; MELLONI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2009).

Em relação ao uso ou não do cupinicida nos estádios de desenvolvimento do hospedeiro, observou-se que ele não afetou e, em alguns casos, seu uso apresentou uma tendência de maior densidade populacional, tanto para a comunidade endofítica quanto para a epifítica (Tabela 2). Pode se argumentar que durante esta fase as populações bacterianas estão bem estabelecidas e, sob condições favoráveis, o seu nível populacional não pode ser afetado pelo cupinicida e em determinados casos houve um crescimento na população, apesar de que aos 10 meses houve uma queda na densidade (Tabela 2), mas acredita-se que por outros motivos de exigência nutricional, e de preferências dos grupos bacterianos por outras regiões da planta. Esses resultados divergem dos encontrados por PRIONA-LLANOS et al. (2009),

quando estudou a influência de fertilizantes orgânicos no isolamento de bactérias endofíticas diazotróficas em cana-de-açúcar.

De certa forma alguns dos fatores analisados no presente estudo, como variações nos estágios de desenvolvimento da planta, manejo de insumos agrícolas e cultivares do hospedeiro apresentaram pouca ou nenhuma influência sobre a densidade populacional das comunidades bacterianas endofíticas e epifíticas, mas foi observado que estes fatores apresentaram influência sobre a diversidade de grupos bacterianos. Nesse caso em particular, se um determinado grupo de bactérias de uma morfologia diferente como, por exemplo, a comunidade de bactérias brancas possuem espécies de elevada importância para promoção de crescimento vegetal, na sua densidade total talvez não tenha tido diferença quanto ao manejo, mas pode ser que a densidade desse grupo pode ter sido afetada, e desta forma e, por outros interesses essa informação é de elevada importância.

De encontro a isso, quando um determinado grupo bacteriano de coloração amarela está presente em maior quantidade em uma determinada região da planta, em um determinado tempo e manejo, e um genótipo, isto sugere que pode ter ocorrido mudanças nas densidades populacionais de diferentes grupos sem alteração da densidade total. Entretanto, os estádios de desenvolvimento do hospedeiro e as partes da planta influenciaram a densidade populacional das populações bacterianas analisadas, sugerindo que a parte da planta e a fase fisiológica do hospedeiro estejam relacionadas com a capacidade de colonização e estabelecimento de grupos bacterianos específicos.

O conhecimento da estrutura e composição de espécies que compõem comunidades bacterianas associadas às plantas é fundamental para o entendimento de como os processos biológicos associados às plantas pode ser influenciado por meio de fatores ambientais e, por consequência, terem aplicações biotecnológicas.

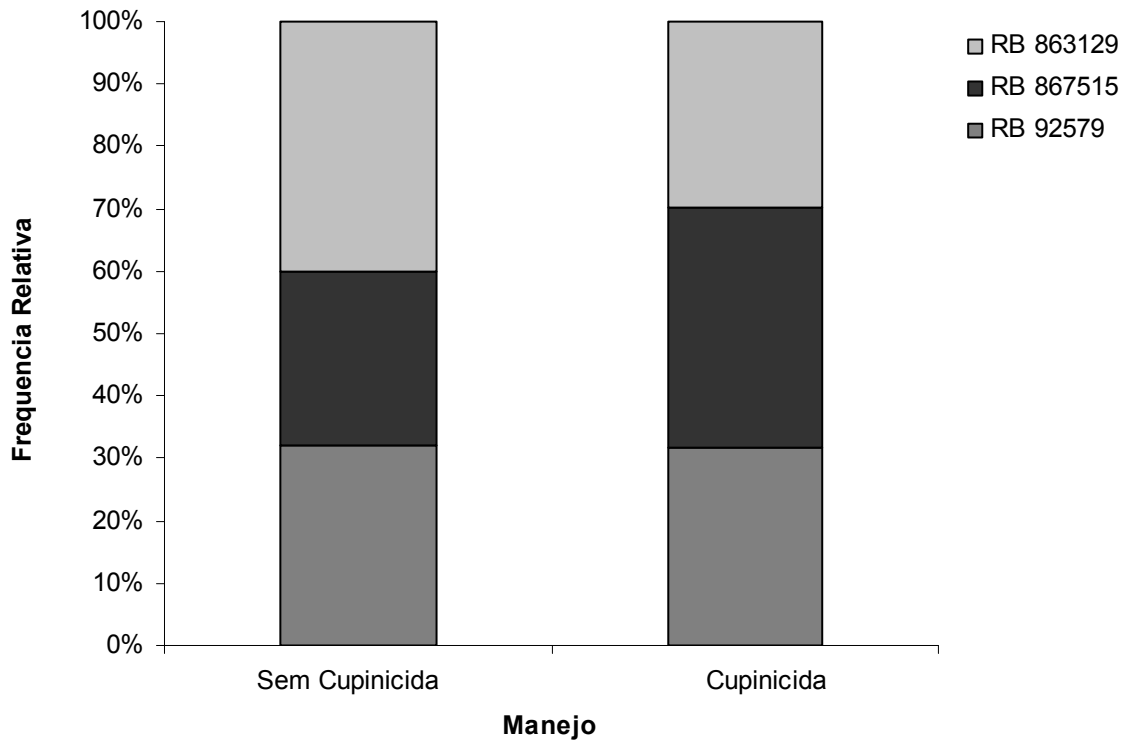
## 5.2. Seleção de bactérias com potencial para fixar N<sub>2</sub>

### 5.2.1. Amostragem de cana-de-açúcar aos 4 meses de idade

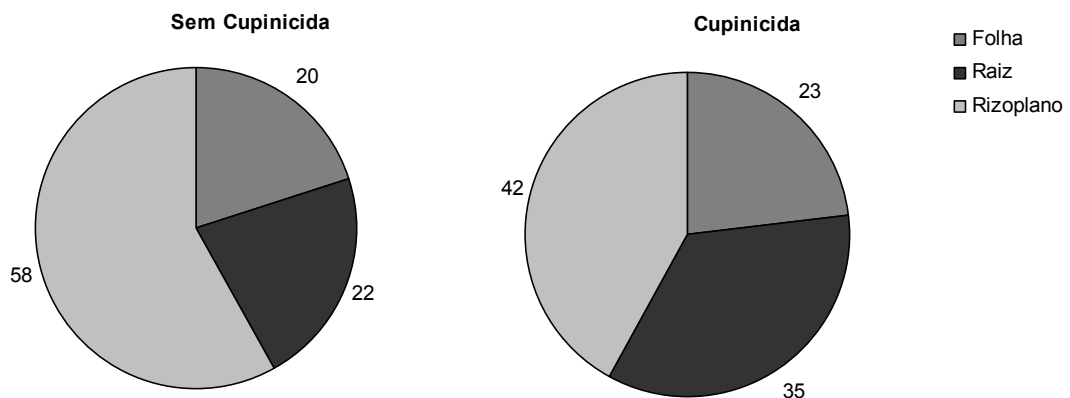
Foram avaliados 272 isolados bacterianos provenientes de amostragens em diferentes regiões da cana-de-açúcar e do rizoplano em relação ao potencial para fixar N<sub>2</sub>, por meio de cultivo em meio seletivo NFb. Destes isolados bacterianos 140 foram isolados em manejo de cultivo de cana-de-açúcar sem aplicação de cupinicida e 132 foram isolados em manejo com cupinicida, aos 4 meses de idade da cana-planta, constatando-se que 56% e 52% respectivamente, dos isolados foram capazes de crescer em meio NFb, apresentando portanto, potencial para fixar N<sub>2</sub>, independente da presença ou ausência de cupinicida no manejo da cultura. Isso indica que a presença de cupinicida não inibe a capacidade das bactérias fixarem N<sub>2</sub>.

Não se observou diferença nos isolados bacterianos capazes de fixar N<sub>2</sub> entre as variedades, independente da presença ou ausência de cupinicida, apesar da variedade RB 863129 na ausência de cupinicida e a variedade RB 867515 terem apresentado uma frequência relativa de cerca de 40% em relação as outras variedades (Figura 1).

Entretanto, foi observado que as bactérias capazes de fixar N<sub>2</sub> foram, na sua maioria, oriundas do rizoplano, que apresentou uma frequência relativa de 58% na ausência de cupinicida e 42% quando o cupinicida foi aplicado no manejo da cultura, aos 4 meses de idade da cana planta (Figura 2). O teste do  $\chi^2$  mostrou diferença na frequência relativa de isolados bacterianos entre as regiões dos tecidos vegetais amostrados, quanto a fixação de N<sub>2</sub> ( $p < 0,05$ ), com a região do rizoplano sem aplicação do cupinicida apresentando o maior número de isolados bacterianos com capacidade de fixar N<sub>2</sub> (Figura 2).



**Figura 1** - Frequência relativa (%) da fixação de N<sub>2</sub> dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos de três variedades de cana-de-açúcar, aos 4 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e na ausência de cupinizada. Teste do  $\chi^2$  revelou não haver diferença entre as variedades ( $p < 0,05$ ).

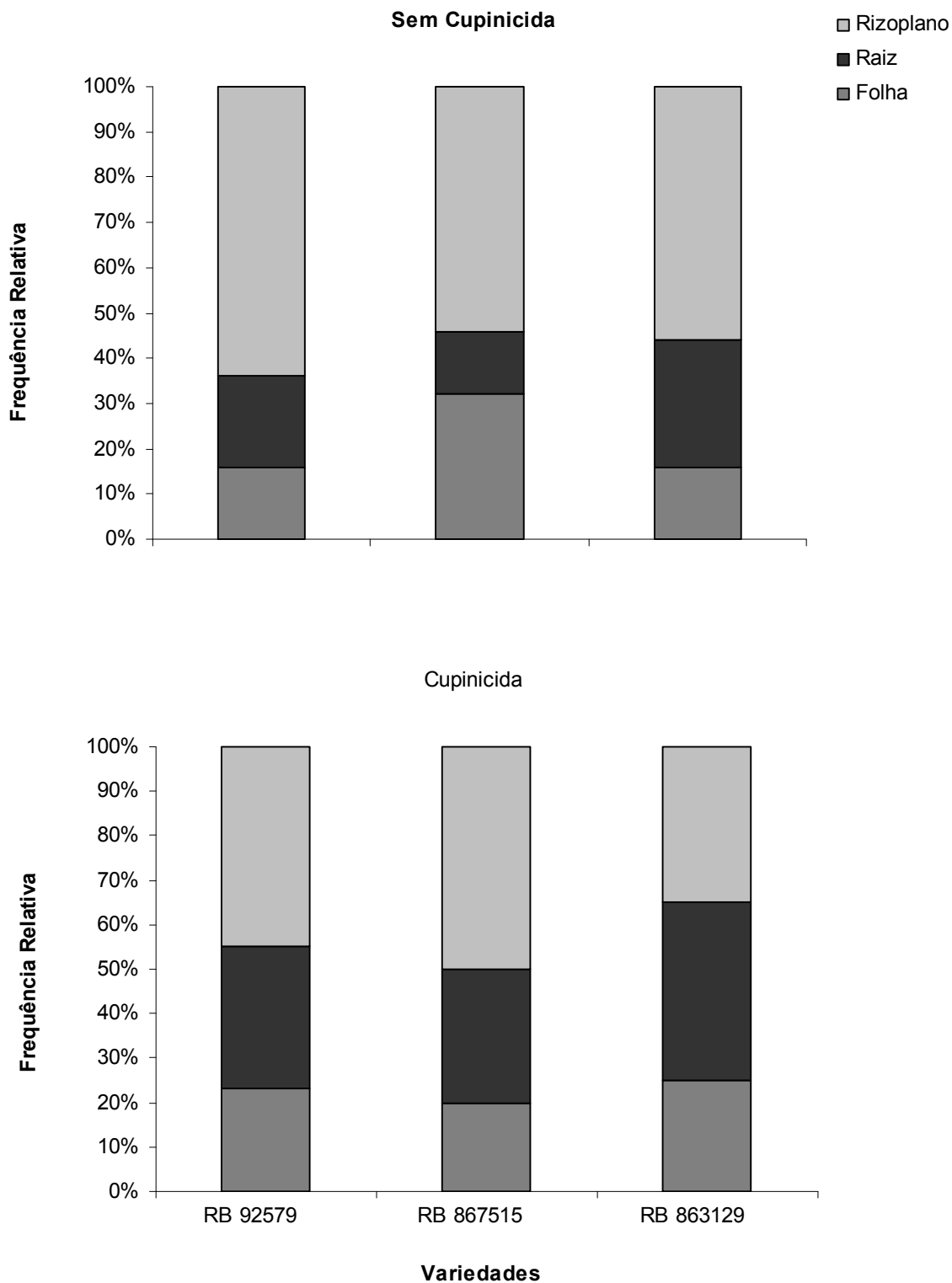


**Figura 2** - Frequência relativa (%) da fixação de N<sub>2</sub> dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos nas regiões da cana-de-açúcar e do rizoplano, aos 4 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e na ausência de cupinizada. Teste do  $\chi^2$  revelou diferença entre as regiões da planta e do rizoplano ( $p < 0,05$ ).

Outro aspecto que pode ser destacado é que, na ausência de cupinicida, a região do rizoplano foi a que teve o maior número de bactérias com capacidade de fixar N<sub>2</sub>, porém na presença de cupinicida há uma redução de isolados nessa região, com aumento considerável na raiz, comportamento que se evidenciou mais intensamente na variedade RB 863129 (Figura 3).

A fixação biológica de N<sub>2</sub> tem sido um dos mecanismos explorados na interação microrganismos-planta em diversos estudos (COCKING, 2003; KUKLINSKY-SOBRAL, et al. 2004; MEDEIROS, et al. 2006). Em cana-de-açúcar os estudos têm se concentrado em variedades de cana cultivados na região Sudeste do país e encontrado importantes grupos bacterianos que desempenham a Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) (POLIDORO et al., 2006). Portanto, os isolados encontrados neste trabalho, reforçam que bactérias associadas à cana-de-açúcar representam uma relação microrganismos-planta importante para o desenvolvimento da planta hospedeira.

O conhecimento da capacidade de um organismo em realizar a FBN é importante para a seleção de estirpes com potencial de exploração biotecnológica. A capacidade de bactérias realizarem este processo pode ser facilmente comprovada pela sua habilidade de crescer em meio de cultura livre de nitrogênio. A condição de meio semi-sólido cria um ambiente com baixo nível de oxigênio, semelhantemente ao que ocorre no solo ou na planta, onde estão localizadas bactérias diazotróficas microaerofílicas associadas às raízes de plantas. A formulação desse meio facilitou o isolamento de bactérias do gênero *Azospirillum* e, após essa descoberta, muitas outras espécies de bactérias diazotróficas, entre elas *Gluconacetobacter* sp., *Herbaspirillum* sp. e *Burkholderia* sp. foram isoladas no Brasil (OLIVEIRA et al., 2002; BALDANI; BALDANI, 2005).



**Figura 3** - Frequência relativa (%) da fixação de N<sub>2</sub> dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos nas regiões da planta e do rizoplano de três variedades de cana-de-açúcar, aos 4 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e na ausência de cupinicida. Teste do  $\chi^2$  revelou diferença entre as regiões da planta e do rizoplano ( $p < 0,05$ ).

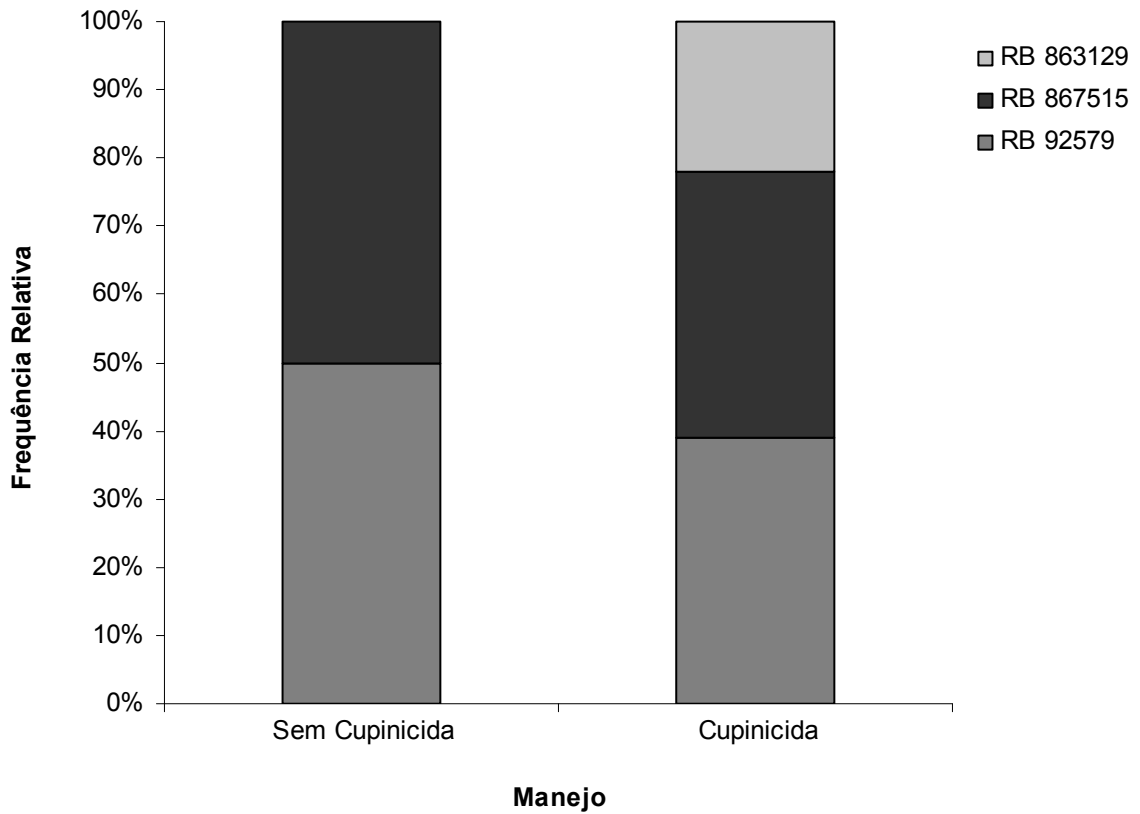


### *5.2.2. Amostragem de cana-de-açúcar aos 10 meses de idade*

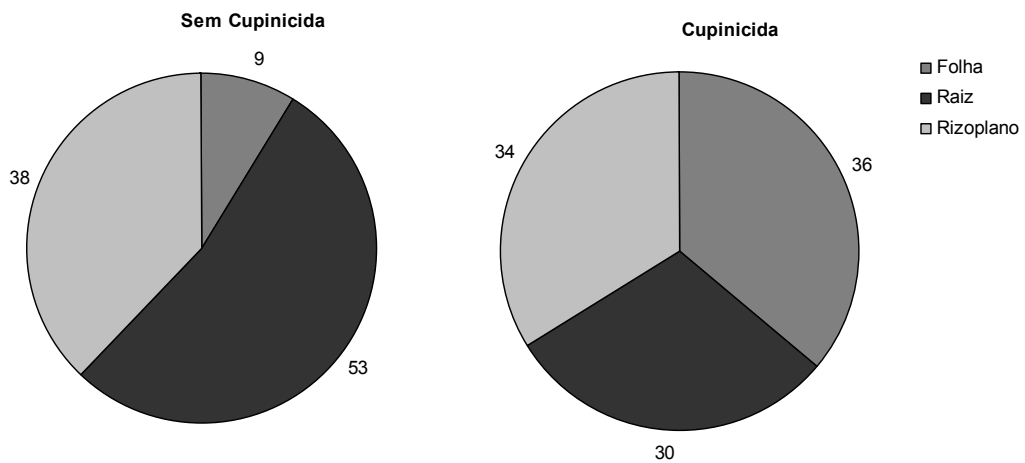
Aos 10 meses de idade foram obtidos 138 isolados bacterianos que foram avaliados em relação ao potencial para fixar  $N_2$ , por meio de cultivo em meio seletivo NFb. Destes isolados bacterianos 67 foram isolados em manejo de cultivo de cana-de-açúcar sem aplicação de cupinicida e 71 foram isolados em manejo com cupinicida, constatando-se que 48% e 93% respectivamente, dos isolados foram capazes de crescer em meio NFb, apresentando portanto, potencial para fixar  $N_2$ , independente da presença ou ausência de cupinicida no manejo da cultura. Isso indica que a presença de cupinicida não inibe a capacidade das bactérias fixarem  $N_2$ . É importante observar que aos 10 meses de idade há uma redução no número de isolados bacterianos em relação aos 4 meses de idade, no entanto há um crescimento na percentagem de isolados com capacidade de fixar  $N_2$ , principalmente na presença de cupinicida.

Não se observou diferença nos isolados bacterianos capazes de fixar  $N_2$  entre as variedades, independente da presença ou ausência de cupinicida, apesar da variedade RB 863129 na presença de cupinicida ter apresentado uma frequência relativa de cerca de 20%, bem inferior as variedades RB 92579 e RB 867515 (Figura 4).

Entretanto, foi observado que as bactérias capazes de fixar  $N_2$  foram, na sua maioria, oriundas da raiz, que apresentou uma frequência relativa de cerca de 53% na ausência de cupinicida. No entanto, quando se aplicou cupinicida, a maior frequência relativa de isolados bacterianos se concentrou nas folhas da cana-de-açúcar (Figura 5). O teste do  $\chi^2$  mostrou diferença na frequência relativa de isolados bacterianos entre as regiões dos tecidos vegetais amostrados, quanto a fixação de  $N_2$  ( $p < 0,05$ ), com a região da raiz sem aplicação do cupinicida apresentando o maior número de isolados bacterianos com capacidade de fixar  $N_2$  (Figura 5).



**Figura 4** - Frequência relativa (%) da fixação de N<sub>2</sub> dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos de três variedades de cana-de-açúcar, aos 10 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e na ausência de cupinícida. Teste do  $\chi^2$  revelou não haver diferença entre as variedades ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5** - Frequência relativa (%) da fixação de N<sub>2</sub> dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos nas regiões da cana-de-açúcar e do rizoplano, aos 10 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e na ausência de cupinícida. Teste do  $\chi^2$  revelou diferença entre as regiões da planta e do rizoplano ( $p < 0,05$ ).

Tanto aos 4 meses, quanto aos 10 meses de idade, há uma redução na frequência de isolados bacterianos capazes de fixar  $N_2$  nas regiões do rizoplano e raiz, respectivamente (Figura 4 e 5). Como essas regiões são as que sofrem uma maior influência da aplicação de cupinicida, é provável que a aplicação desse insumo minimize a capacidade das bactérias fixarem  $N_2$  nessas regiões. Essa poderá ser uma dificuldade futura na aplicação de inóculos contendo bactérias fixadoras de  $N_2$ , porque o manejo com cupinicida é imprescindível no estabelecimento do canavial. Por outro lado, principalmente aos 10 meses de idade, há uma indicação que consideráveis colônias bacterianas podem habitar as folhas da cana-de-açúcar, podendo ser uma alternativa viável para aplicação de inóculos bacterianos fixadores de  $N_2$ .

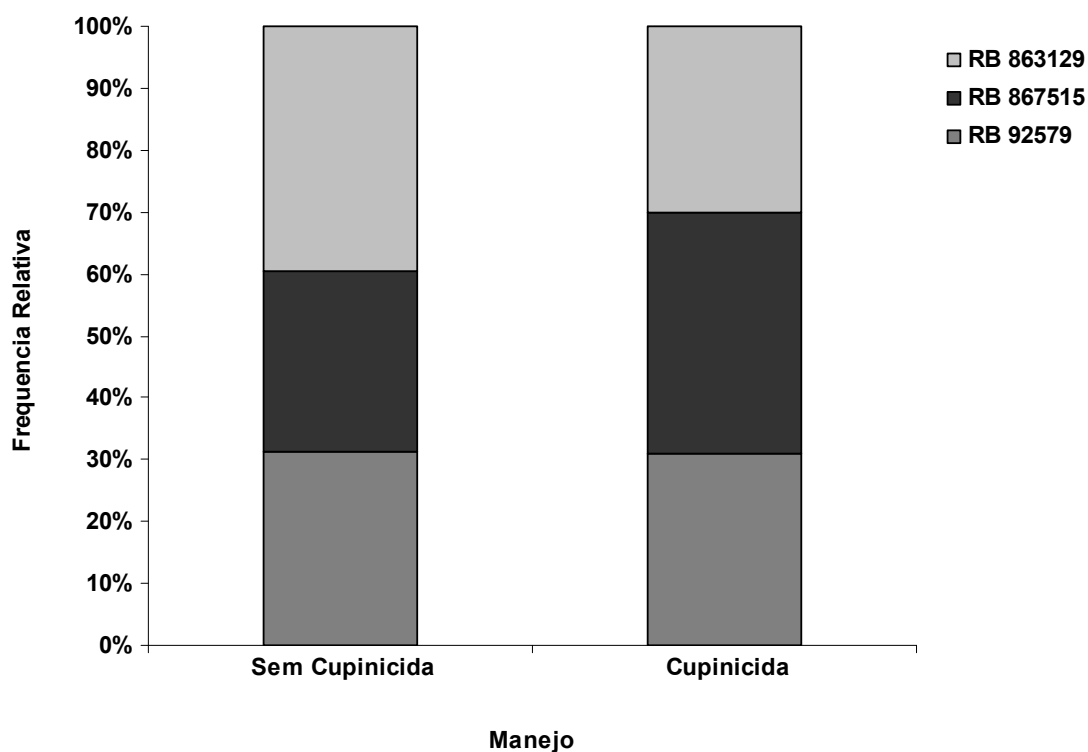
### **5.3. Seleção de bactérias com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico**

#### *5.3.1. Amostragem de cana-de-açúcar aos 4 meses de idade*

Foram avaliados 272 isolados bacterianos em relação à solubilização de fosfato inorgânico, constatando-se que 140 apresentaram resultados positivos quando as amostras de cana-de-açúcar eram provenientes de áreas em que não foi aplicado cupinicida e 132 de áreas que receberam aplicação do cupinicida. Nesses manejos constatou-se que 36% e 41%, respectivamente de isolados bacterianos eram capazes de solubilizar fosfato inorgânico. Assim, pode-se inferir que a solubilização de fosfato inorgânico pelas colônias de bactérias independeu da presença de cupinicida.

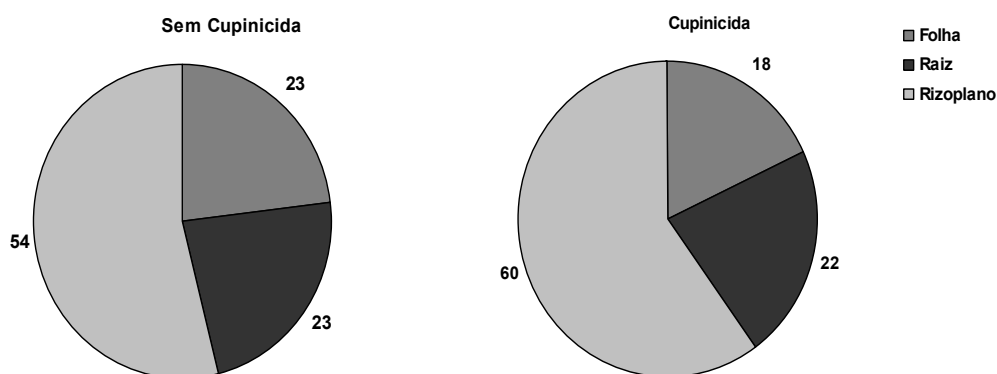
Foi possível observar que os isolados bacterianos provenientes das variedades apresentaram diferentes capacidades de solubilizar fosfato inorgânico, dependendo da variedade (Figura 6), destacando-se a variedade RB 863129 na ausência de cupinicida e a variedade RB 867515 na presença de cupinicida, com o teste do  $\chi^2$  apresentando diferença na frequência relativa de isolados bacterianos capazes de solubilizar fosfato inorgânico nas diferentes variedades.

Dos isolados com capacidade para solubilizar fosfato inorgânico na ausência de cupinicida cerca de 40% foram provenientes da variedade RB 863129, 32% da variedade RB 92579 e 28% da variedade 867515. Quando as amostras foram provenientes de áreas em que houve no manejo da cana-de-açúcar a aplicação de cupinicida, os isolados bacterianos com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico foram cerca de 39%, 31% e 30%, respectivamente oriundos das variedades RB 867515, RB 92579 e RB 863129 (Figura 6). O cupinicida reduziu significativamente a presença de isolados capazes de solubilizar fosfato inorgânico na variedade RB 863129 e elevou na variedade RB 867515.



**Figura 6** - Frequência relativa (%) da solubilização de fosfato inorgânico dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos de três variedades de cana-de-açúcar, aos 4 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e na ausência de cupinicida. Teste do  $\chi^2$  revelou diferença entre as variedades ( $p < 0,05$ ).

Quando se avaliou a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico de amostras de cana-de-açúcar provenientes de diferentes partes do tecido vegetal da cana-planta e do rizoplano, constatou-se que no rizoplano se encontra a maioria das colônias bacterianas solubilizadoras de fosfato inorgânico, independente do manejo adotado no canavial, ou seja, na presença ou ausência de cupinicida (Figura 7), com o teste do  $\chi^2$  apresentando diferença na frequência relativa de isolados bacterianos capazes de solubilizar fosfato inorgânico nas diferentes partes do tecido vegetal e do rizoplano.



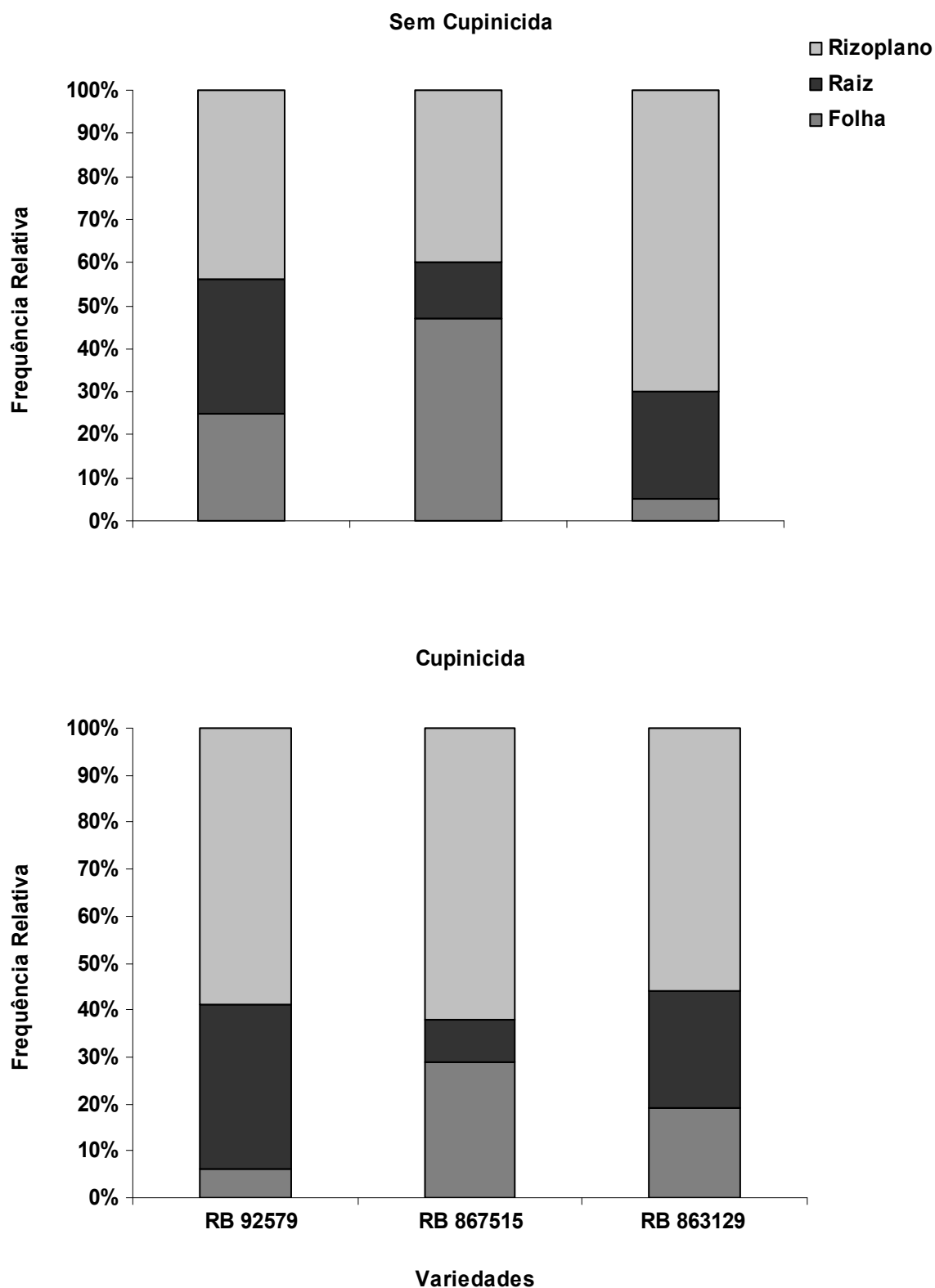
**Figura 7** - Frequência relativa (%) da solubilização de fosfato inorgânico dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos nas regiões da cana-de-açúcar e do rizoplano, aos 4 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e ausência de cupinicida. Teste do  $\chi^2$  revelou diferença entre as regiões da planta e do rizoplano ( $p < 0,05$ ).

Na presença ou ausência de cupinicida as variedades RB 863129 e RB 92579 apresentaram uma proporção crescente de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico isoladas das folhas, raiz e rizoplano. Sem a aplicação do cupinicida a variedade RB 867515 apresentou uma proporção maior de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico oriundas das folhas, seguida do rizoplano e raiz. Quando houve aplicação de cupinicida, os isolados se originam do rizoplano, seguido pelas folhas e raiz. Para a variedade RB 92579 essa proporção se deu de forma crescente folhas, raiz e rizoplano, com um maior número de isolados com

capacidade de solubilizar fosfato inorgânico na região do rizoplane nas duas formas de manejo. Comportamento semelhante a RB 92579, foi também observado na variedade RB 863129 (Figura 8).

Como se observou o uso do cupinicida não influenciou as bactérias com capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, porém mais estudos levando-se em consideração concentrações diferentes do produto devem ser realizados, contudo, para as nossas condições e de dose utilizada do cupinicida não foi possível observar um efeito significativo. Resultados semelhantes a esses foram encontrados por Reis et al. (2008), estudando a ação de herbicidas em microorganismo da rizosfera.

Por outro lado, tem-se buscado selecionar bactérias que apresentem mais de uma característica envolvida com a promoção de crescimento vegetal (VERMA et al., 2001; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). A capacidade de bactérias solubilizar fosfato inorgânico também é um fator envolvido na interação bactéria-planta, pois esta característica aumenta a disponibilidade de fósforo disponível para o vegetal, sendo este um possível mecanismo de promoção de crescimento vegetal em condições de campo.



**Figura 8** - Frequência relativa (%) da solubilização de fosfato inorgânico dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos nas regiões da planta e do rizoplano de três variedades de cana-de-açúcar, aos 4 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e na ausência de cupinicida. Teste do  $\chi^2$  revelou diferença entre as regiões da planta e do rizoplano e das variedades ( $p < 0,05$ ).

O fósforo, um dos principais nutrientes limitantes ao crescimento vegetal, é rapidamente imobilizado após a adição ao solo como adubo solúvel, tornando-se indisponível para a planta. Também, nesse aspecto, a atividade bacteriana é extremamente importante no que diz respeito ao fornecimento de fósforo às plantas. Endófitos são conhecidos por promover a planta crescimento através de solubilização de fosfato (VERMA et al., 2001; WAKELIN et al., 2004). Neste aspecto, a observação de maior frequência de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico na região da folha e rizoplano sugerem que este grupo de bactérias poderia ter um papel mais importante durante esta fase do desenvolvimento da planta hospedeira dependendo do genótipo da planta.

### *5.3.2. Amostragem de cana-de-açúcar aos 10 meses de idade*

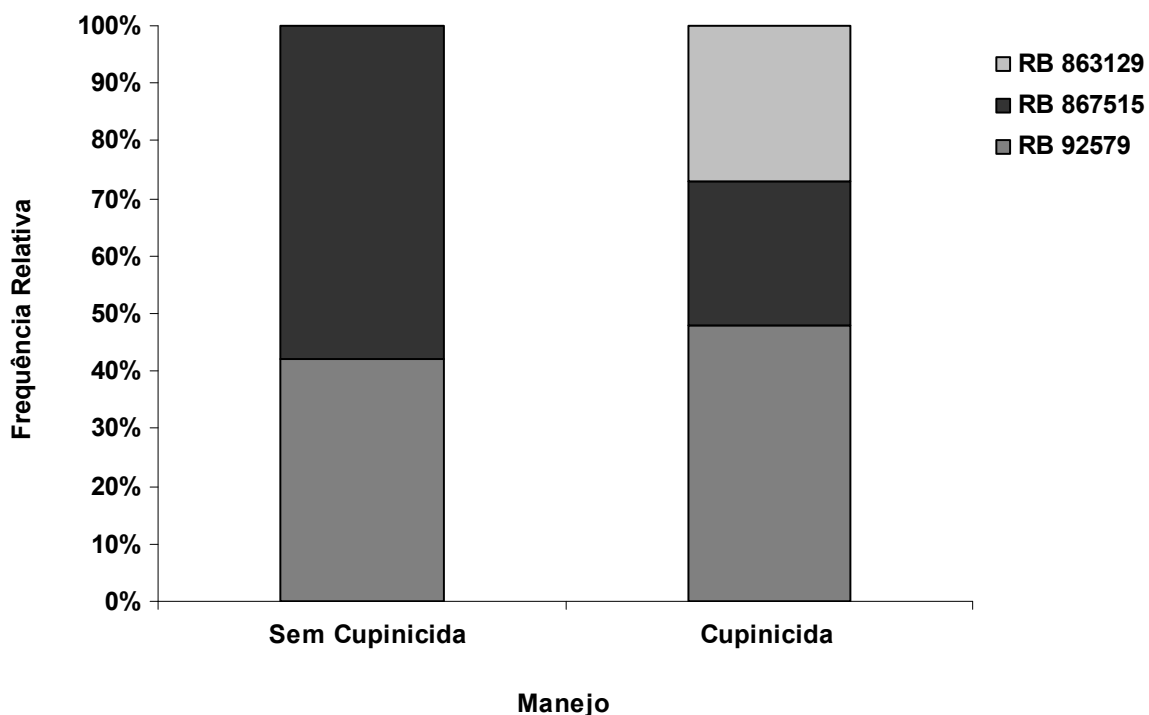
Aos 10 meses de idade foram obtidos 138 isolados bacterianos que foram avaliados em relação ao potencial para solubilizar fosfato inorgânico, por meio da formação do halo de solubilização. Destes isolados bacterianos 67 foram isolados em manejo de cultivo de cana-de-açúcar sem aplicação de cupinicida e 71 foram isolados em manejo com cupinicida, constatando-se que 40% e 62% respectivamente, dos isolados foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico, independente da presença ou ausência de cupinicida no manejo da cultura.

Foi possível observar que os isolados bacterianos provenientes das variedades apresentaram diferentes capacidades de solubilizar fosfato inorgânico, dependendo da variedade (Figura 9), destacando-se a variedade RB 867515 na ausência de cupinicida e a variedade RB 92579 na presença de cupinicida, com o teste do  $\chi^2$  apresentando diferença na frequência relativa de isolados bacterianos capazes de solubilizar fosfato inorgânico nas diferentes variedades.

Dos isolados bacterianos oriundos de áreas em que não foi utilizado no manejo da



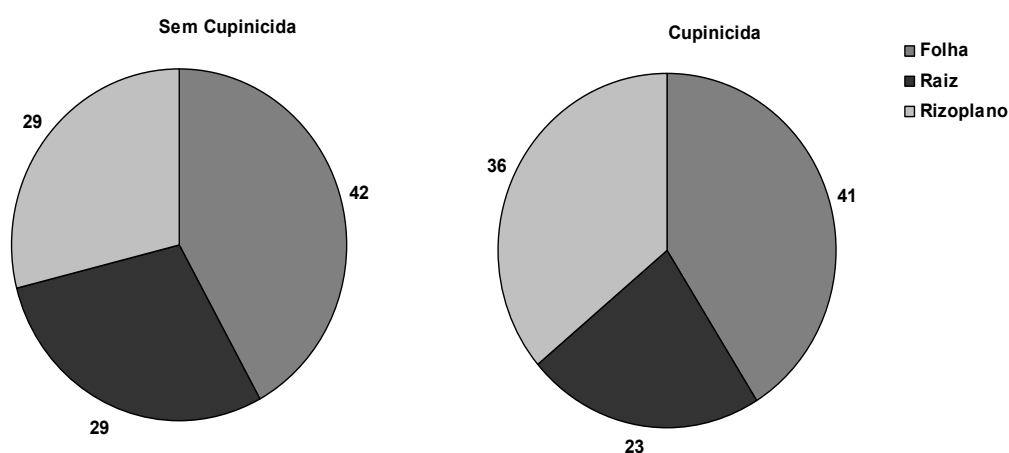
cana-de-açúcar cupinicida e com capacidade para solubilizar fosfato inorgânico cerca de 56% foram da variedade RB 867515 e 44% da variedade RB 92579. Quando se utilizou cupinicida cerca de 50, 24 e 26% dos isolados bacterianos foram provenientes das variedades RB 92579, RB 867515 e RB 863129, respectivamente (Figura 9).



**Figura 9** - Frequência relativa (%) da solubilização de fosfato inorgânico dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos de três variedades de cana-de-açúcar, aos 10 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e na ausência de cupinicida. Teste do  $\chi^2$  revelou diferença entre as variedades ( $p < 0,05$ ).

Quando se avaliou a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico de amostras de cana-de-açúcar provenientes de diferentes partes do tecido vegetal da cana-planta e do rizoplano aos 10 meses de idade, constatou-se que nas folhas se encontra a maioria das colônias bacterianas solubilizadoras de fosfato inorgânico, independente do manejo adotado no canavial, ou seja, na presença ou ausência de cupinicida (Figura 10), com o teste do  $\chi^2$  apresentando diferença na frequência relativa de isolados bacterianos capazes de solubilizar fosfato inorgânico nas diferentes partes do tecido vegetal e do rizoplano.

Diferentemente do comportamento apresentado aos 4 meses de idade, em que os isolados bacterianos capazes de solubilizar fosfato inorgânico se concentraram mais no rizoplano (Figura 10), aos 10 meses de idade essa concentração é maior nas folhas (Figura 10) e pouco variável com o manejo em que houve aplicação de cupinícida.



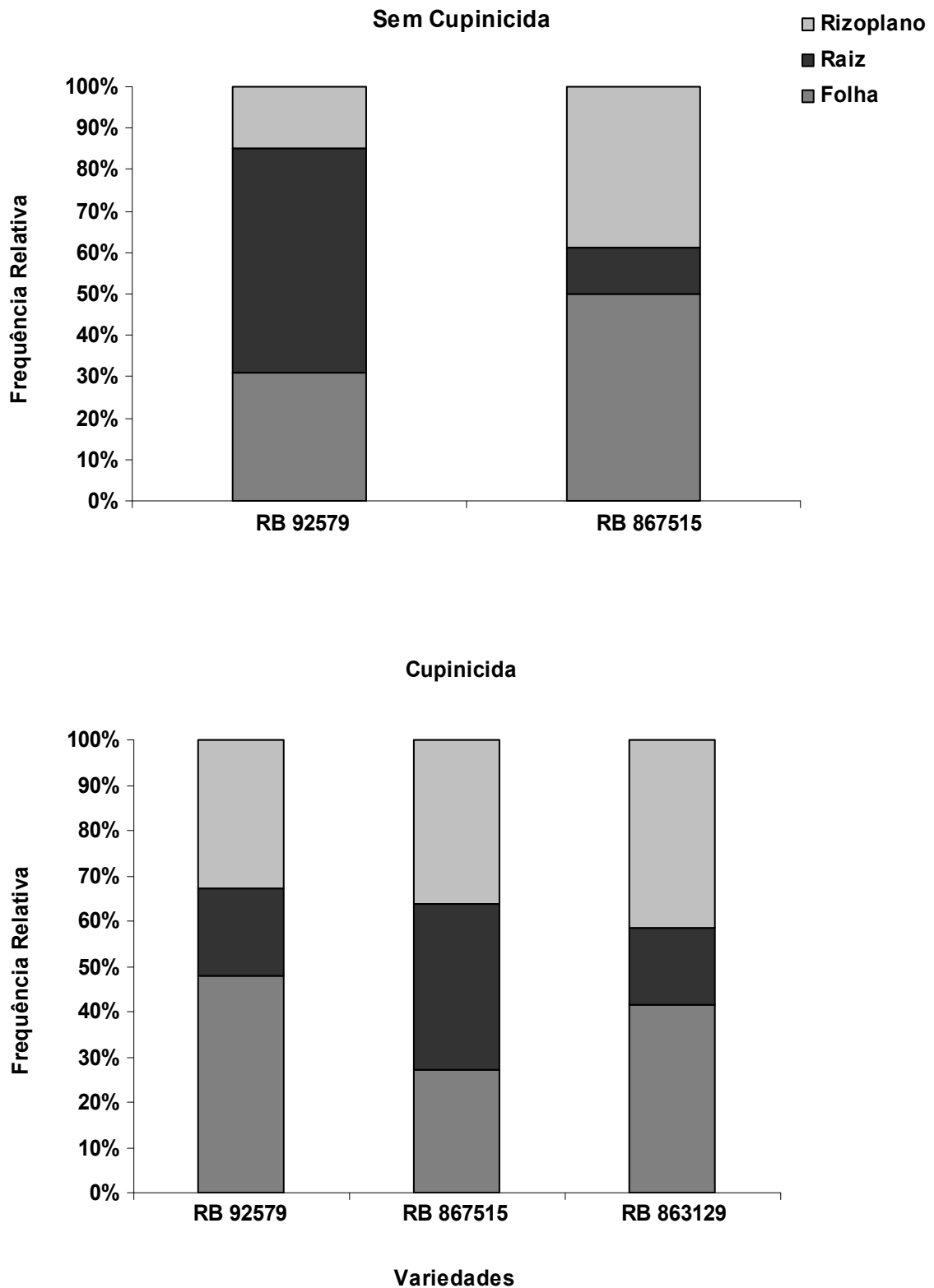
**Figura 10** - Frequência relativa (%) da solubilização de fosfato inorgânico dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos nas regiões da cana-de-açúcar e do rizoplano, aos 10 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e ausência de cupinícida. Teste do  $\chi^2$  revelou diferença entre as regiões da planta e do rizoplano ( $p < 0,05$ ).

Na presença ou ausência de Cupinícida variedades RB 867515 e RB 92579 apresentaram uma proporção decrescente de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico isoladas das folhas, raiz e rizoplano, e crescente na variedade RB 863129 e na presença do cupinícida (Figura 11). Sem aplicação de cupinícida a variedade RB 867515 apresentou uma proporção maior de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico oriundas do rizoplano, seguida da raiz e folhas. Quando se aplicou cupinícida, as bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico passam a ser oriundas das folhas, seguidas da raiz e do rizoplano. Na variedade RB 92579 essa proporção foi igual para folha e rizoplano e menor para raiz, sem aplicação do

cupinicida. Quando houve aplicação do cupinicida, a folha continua sendo responsável por uma maior frequência relativa de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico, seguida da raiz e do rizoplano. Para a variedade RB 863129 o maior número de isolados com a capacidade de solubilizar fosfato se deu no rizoplano, seguido da folha e raiz, quando se aplicou o cupinicida, pois na área em que houve aplicação de cupinicida, a variedade foi incendiada, não podendo ser avaliados os isolados bacterianos (Figura 11).

Quando comparamos os tempos de isolamento podemos observar que não há uma redução no número de bactérias com capacidade de solubilizar fosfato e sim uma diferenciação quanto a proporção das bactérias em uma determinada região com o tempo de desenvolvimento da planta, ou seja, nesse trabalho ficou evidente que aos 4 meses a maior proporção de bactérias é na região do rizoplano e posteriormente passa a ser na folha aos 10 meses, isso só evidencia a necessidade premente desse nutriente para o crescimento das raízes e seu estabelecimento.

Com a inoculação no solo dessas bactérias pode haver solubilização de fósforo adsorvido e, ou precipitado e isso pode resultar em um melhor desenvolvimento das plantas e sua capacidade produtiva (CANBOLAT et al., 2006 e DIAS et al., 2009). Tendo em vista que bactérias endofíticas colonizam o interior da planta hospedeira e o fosfato inorgânico está no solo, é viável especular que bactérias endofíticas, durante seu processo de colonização da planta, possam solubilizar e aumentar a disponibilidade de fosfato à planta hospedeira (RODRIGUEZ et al., 2000, MASSENSINI et al., 2008; REIS, et al., 2008).



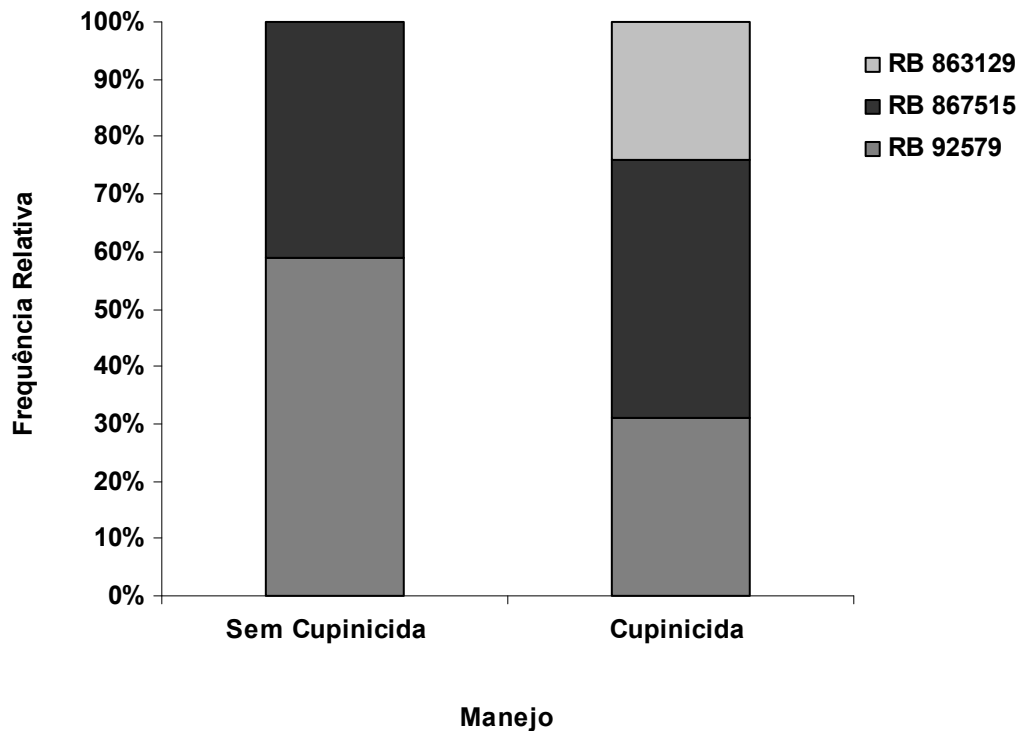
**Figura 11** - Frequência relativa (%) da solubilização de fosfato inorgânico dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos nas regiões da planta e do rizoplano de três variedades de cana-de-açúcar, aos 10 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e na ausência de cupinicida. Teste do  $\chi^2$  revelou diferença entre as regiões da planta e do rizoplano e das variedades ( $p < 0,05$ ).

#### **5.4. Seleção de bactérias produtoras de ácido idol acético (AIA)**

Aos 10 meses de idade foram obtidos 138 isolados bacterianos que foram avaliados em relação a capacidade de produzir ácido idol acético (AIA). Destes isolados bacterianos 67 foram isolados em manejo de cultivo de cana-de-açúcar sem aplicação de cupinicida e 71 foram isolados em manejo com cupinicida, constatando-se que 48% e 65% respectivamente, dos isolados foram capazes de produzir AIA, independente da presença ou ausência de cupinicida no manejo da cultura.

Foi possível observar que os isolados bacterianos provenientes das variedades apresentaram diferentes capacidades de produzir AIA, dependendo da variedade (Figura 12), destacando-se a variedade RB 92579 na ausência de cupinicida e a variedade RB 867515 na presença de cupinicida, com o teste do  $\chi^2$  apresentando diferença na frequência relativa de isolados bacterianos capazes de produzir AIA nas diferentes variedades.

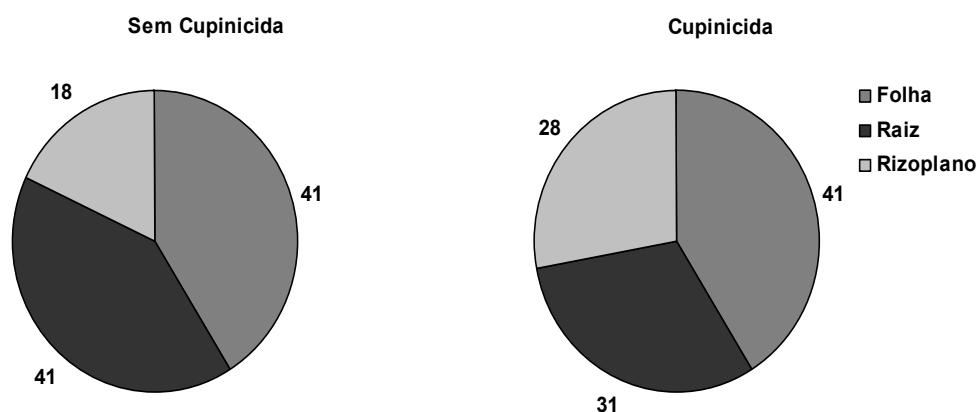
Dos isolados bacterianos oriundos de áreas em que não foi utilizado no manejo da cana-de-açúcar cupinicida e com capacidade para solubilizar fosfato inorgânico cerca de 59% foram da variedade RB 92579 e 41% da variedade RB 867515. Quando se utilizou cupinicida cerca de 45, 31 e 24% dos isolados bacterianos foram provenientes das variedades RB 867515, RB 92579 e RB 863129, respectivamente (Figura 12).



**Figura 12** - Frequência relativa (%) da produção de ácido indol acético (AIA) dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos de três variedades de cana-de-açúcar, aos 10 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e na ausência de cupinicida. Teste do  $\chi^2$  revelou diferença entre as variedades ( $p < 0,05$ )

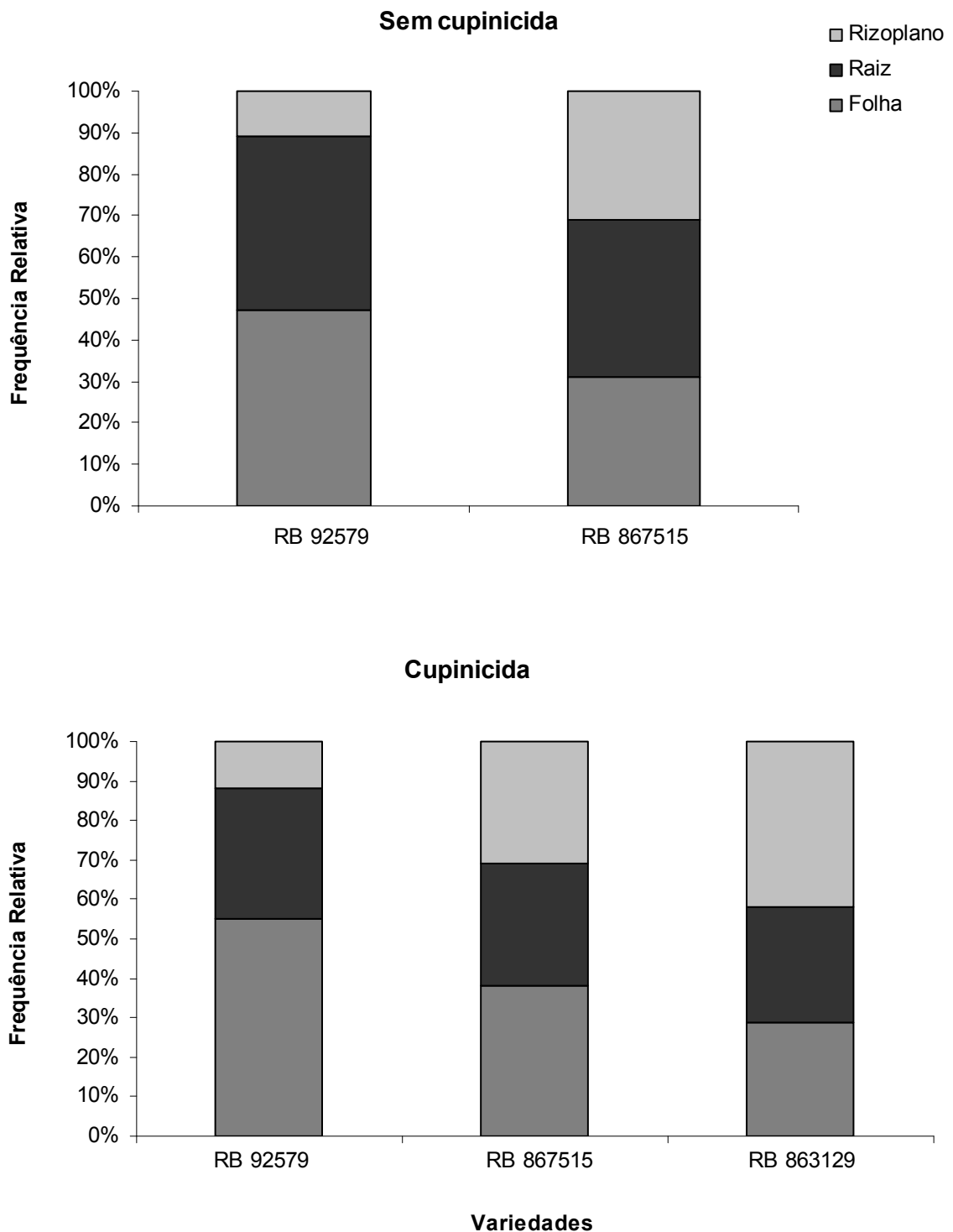
Quando se avaliou a capacidade de produzir AIA de amostras de cana-de-açúcar provenientes de diferentes partes do tecido vegetal da cana-planta e do rizoplano aos 10 meses de idade, constatou-se que nas folhas e nas raízes se encontra a maioria das colônias bacterianas produtoras de AIA, independente do manejo adotado no canavial, ou seja, na presença ou ausência de cupinicida (Figura 13), com o teste do  $\chi^2$  apresentando diferença na frequência relativa de isolados bacterianos capazes de produzir AIA nas diferentes partes do tecido vegetal e do rizoplano.

Como para essa característica de promoção do crescimento vegetal não foi possível avaliar a capacidade de produzir AIA de plantas de cana-de-açúcar aos 4 meses de idade, aos 10 meses, como ocorreu com a capacidade de fixar  $N_2$  e solubilizar fosfato inorgânico, as folhas é o tecido em que se originam as colônias de bactérias produtoras de AIA, independente da aplicação de cupinicida.



**Figura 13** - Frequência relativa (%) da produção de ácido indol acético (AIA) dos isolados bacterianos endofíticos e epifíticos nas regiões da cana-de-açúcar e do rizoplano, aos 10 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e ausência de cupinicida. Teste do  $\chi^2$  revelou diferença entre as regiões da planta e do rizoplano ( $p < 0,05$ ).

Na ausência de cupinicida a variedade RB 867515 apresentou uma proporção maior de bactérias produtoras de AIA oriundas do rizoplano, seguida da raiz e folha (Figura 14). No entanto, quando se avaliou amostras de cana-de-açúcar provenientes de áreas em que se aplicou cupinicida, os isolados bacterianos foram oriundos em maior proporção das folhas, seguidas da raiz e do rizoplano. Na variedade RB 92579 essa proporção foi maior na folha, seguida da raiz e rizoplano. Quando houve aplicação do cupinicida, os isolados bacterianos provenientes da continuaram predominando, seguindo-se os que foram provenientes da raiz e em seguida do rizoplano (Figura 14).



**Figura 14** - Frequência relativa (%) da produção de ácido indol acético de isolados bacterianos endofíticos e epifíticos nas regiões da planta e do rizoplano de três variedades de cana-de-açúcar, aos 10 meses de idade, no ciclo de cana-planta na presença e na ausência de cupinicida. Teste do  $\chi^2$  revelou diferença entre as regiões da planta e do rizoplano e das variedades ( $p < 0,05$ ).



A produção de fitohormônios por bactérias é um mecanismo de promoção de crescimento de plantas. Auxinas são hormônios capazes de exercer função na regulação do crescimento de plantas, aumentando o crescimento radicular e melhorando a absorção de nutrientes. São produzidas nas plantas, principalmente no meristema apical e transportadas por meio de células do parênquima até as raízes. O ácido indol acético (AIA) é a auxina mais abundante dentre os fitohormônios e também pode ser sintetizada por diversos microrganismos. Aparentemente sem função na célula microbiana, a produção de AIA pode ser resultado da evolução da interação de bactéria-plantas e pode ser influenciada por fatores como genótipo, tanto do hospedeiro quanto do microrganismo. A produção de AIA por bactérias pode ser estimulada pelo triptofano, um precursor da sua biossíntese, que aumenta o crescimento celular ou pode ser consumido como fonte de nitrogênio, estimulando a multiplicação celular.

Nesse trabalho a maior presença de isolados bacterianos produtores de AIA nas folhas caracteriza sua gênese, devido a maior proporcionalidade encontrada na região da folha e posteriormente na raiz, já que a produção de AIA começa nas folhas e seus produtos são transportados para as raízes para o desenvolvimento da planta. Por outro lado, quando essas bactérias se encontram nas raízes esse processo se dá de uma forma rápida e eficiente, como consta nos resultados desse trabalho.

## **5.5. IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS POR SEQÜENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA**

Uma amostra de 27 linhagens com capacidade de fixar N<sub>2</sub> e solubilizar fosfato inorgânico foi selecionada e submetida a identificação por meio da análise do seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA, em laboratório especializado. As seqüências foram submetidas ao banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*

[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]) e analisadas pelo BLASTn (*Basic Local Alignment SearchTool*), sendo alinhadas e comparadas com seqüências existentes e identificadas a nível de gênero e espécie quando apresentaram um índice de similaridade maior que 90% (Tabela 3).

**Tabela 3** - Identificação das linhagens endofíticas e epifíticas de cana-de-açúcar com as espécies bacterianas encontradas pelo BLAST na base de dados do NCBI e prospecção de crescimento vegetal, com identificação da variedade e parte da planta e do rizoplano.

Linhagem	Gênero	Variedade	Região	Promoção de Crescimento	
				N <sub>2</sub>	P
UAGC 5	<i>Pantoea stewartii</i>	RB 92579	Folha	+	+
UAGC 7	<i>Pantoea</i> sp.	RB 92579	Folha	+	+
UAGC 8	<i>Pantoea</i> sp.	RB 92579	Folha	+	+
UAGC 9	<i>Pantoea</i> sp.	RB 92579	Folha	+	+
UAGC 16	<i>Pantoea</i> sp.	RB 867515	Folha	+	+
UAGC 17	<i>Klebsiella / Enterobacter</i>	RB 867515	Folha	+	+
UAGC 18	<i>Pseudomonas</i> sp.	RB 867515	Folha	+	+
UAGC 19	<i>Klebsiella / Enterobacter</i>	RB 867515	Folha	+	+
UAGC 26	<i>Pantoea</i> sp.	RB 867515	Folha	+	+
UAGC 46	<i>Pantoea</i> sp.	RB 92579	Raiz	+	+
UAGC 62	<i>Pantoea</i> sp.	RB 867515	Raiz	+	-
UAGC 70	<i>Enterobacter</i> sp.	RB 863129	Raiz	+	-
UAGC 76	<i>Burkholderia</i> sp.	RB 863129	Raiz	+	-
UAGC 78	<i>Burkholderia</i> sp.	RB 863129	Raiz	+	-
UAGC 86	<i>Pseudomonas</i> sp	RB 92579	Rizoplano	+	+
UAGC 87	<i>Pseudomonas</i> sp	RB 92579	Rizoplano	+	-
UAGC 97	<i>Pseudomonas</i> sp	RB 92579	Rizoplano	+	-
UAGC 102	<i>Pantoea</i> sp.	RB 92579	Rizoplano	+	+
UAGC 103	<i>Enterobacter</i> sp.	RB 867515	Rizoplano	+	-
UAGC 105	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	RB 867515	Rizoplano	+	-
UAGC 114	<i>Burkholderia</i> sp.	RB 867515	Rizoplano	+	+
UAGC 122	<i>Enterobacter</i> sp.	RB 863129	Rizoplano	+	+
UAGC 125	<i>Burkholderia</i> sp.	RB 863129	Rizoplano	+	+
UAGC 127	<i>Burkholderia</i> sp.	RB 863129	Rizoplano	+	+
UAGC 130	<i>Burkholderia</i> sp.	RB 863129	Rizoplano	+	+
UAGC 131	<i>Burkholderia</i> sp.	RB 863129	Rizoplano	+	+
UAGC 140	<i>Burkholderia</i> sp.	RB 863129	Rizoplano	+	+

No decorrer de longas pesquisas sobre a comunidade endofítica de cana-de-açúcar ficou cada vez mais evidenciado que vários gêneros bacterianos estão relacionados com a promoção de desenvolvimento vegetal através da fixação biológica de N<sub>2</sub>, solubilização de fosfato inorgânico, antagonismo a fitopatógenos, produção de reguladores de crescimento

vegetal (PCPs), produção de sideróforos e de enzimas de interesse biotecnológico entre outros (GLICK, 1995; CHANWAY, 1998; MARIN et al., 1999; SHISHIDO et al., 1999; STURZ et al., 2000; BODDEY et al., 2003; ROSENBLUETH & MARTINEZ-ROMERO, 2006; MENDES et al., 2007).

Entre os gêneros bacterianos que são encontrados em associação com a cana-de-açúcar temos: *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconoacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (GOLDSTEIN et al., 1986; MARIN et al., 1999; RODRIGUEZ & FRAGA, 1999; BODDEY et al., 2003; BALDANI, 2005; LUVIZOTTO et al., 2008). Neste estudo podemos observar que das 27 linhagens identificadas por análise da seqüência parcial do 16S rDNA, 8 são do gênero *Pantoea sp.*, 8 *Burkholderia sp.*, 4 *Pseudomonas sp.*, 3 *Enterobacter sp.*, 2 *Klebsiella sp.*, e duas linhagens foram identificadas com similaridade ao nível de espécie que foram *Pantoea stewartii* e *Burkholderia cenocepacia*. Os nossos resultados só vem a solidificar algumas hipóteses de que os nichos são diferentes para cada região pelo simples fato de que nessa pequena amostra foram encontrados três gêneros que não são mencionados por esses autores, evidenciando que cada grupo muda sua presença no habitat de acordo com as exigências e ambiente onde estão inseridos, ou são mais importantes em determinadas condições para utilizarem de outros mecanismos para a promoção de crescimento vegetal, evidenciado ainda mais o estudo desse gêneros para saber justamente esses novos mecanismos para um melhor aproveitamento futuro em uma inoculação, como também o seu comportamento em campo.

Nessas 27 linhagens cerca de 30% foram do gênero *Burkholderia* gênero esse bastante encontrado e estudado devido a grande capacidade de suas espécies produzirem PCPs, fixar N<sub>2</sub>, solubilizar fosfato dentre outras características promotoras de crescimento vegetal de interesse, em diversas espécies de interesse econômico, e sobe varias condições ambientais, e

por apresentam uma considerável versatilidade fisiológica, e ocupar uma grande variedade de nichos ecológicos (BALDANI et al., 1997; PERIN et al., 2006).

Perin *et al.* (2006) em estudos com milho e cana-de-açúcar encontraram uma grande diversidade de espécies do gênero *Burkholderia*, dentre eles a espécie *Burkholderia gladioli*, porém não houve representante da espécie *Burkholderia heleaia* no nosso estudo. O mesmo ocorreu em trabalho realizado por Luvizotto *et al.* (2010), onde foram obtidos 39 isolados pertencentes ao gênero *Burkholderia*, no entanto, as espécies *B. gladioli* e *B. heleaia*, não foram encontradas. O que mostra que a cana-de-açúcar do Estado de Pernambuco possui uma diversidade de espécies do gênero *Burkholderia* diferente da cana cultivada em outros estados. De acordo com trabalho realizado por Jha *et al.* (2009) bactérias do gênero *Burkholderia* também foram encontradas em arroz.

Em outro trabalho de Perin *et al.* (2006b) há relatos que o gênero *Burkholderia* inclui mais de 30 espécies, porém nem todas são fixadoras de N<sub>2</sub>. Todavia, neste trabalho foi evidenciado que todas as linhagens pertencentes a esse gênero são fixadoras de N<sub>2</sub>, como também em sua maioria solubilizam fosfato.

Em trabalho realizado por Govindarajan *et al.* (2006), com *Burkholderia* sp. MG43 inoculada em cana foi observado uma taxa de fixação de N<sub>2</sub> que compensa a metade da maior taxa de adubação recomendada para a cultura, ou seja, uma economia de aproximadamente 140 kg ha<sup>-1</sup> de N, mostrando o potencial que as bactérias isoladas no presente trabalho podem ter em campo.

Para Hu *et al.* (2008), o complexo nitrogenase é responsável pela fixação biológica de N<sub>2</sub> por bactérias, sendo que este complexo é ativado por um conjunto de genes, mas algumas variedades de bactérias não possuem todos os genes ativos, determinando a não fixação de N<sub>2</sub>. Deste modo, como todas as bactérias foram positivas para fixação biológica de N<sub>2</sub>, neste trabalho, isso quer dizer que elas possuem o complexo nitrogenase ativo, uma vez que as

mesmas expressaram fenotipicamente essa característica em questão, porém ainda não foram realizadas as análises para saber quanto ao genótipo.

Dos nove isolados do gênero *Burkholderia* testados quanto a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, seis foram positivos, evidenciando o potencial desse gênero. Resultado esse semelhante ao encontrado por Postma *et al.* (2010), que de 10 isolados do gênero *Burkholderia* testados, nove solubilizaram fosfato, evidenciando o potencial deste gênero nesta característica de crescimento vegetal. Em trabalho realizado por Collavino *et al.* (2010), 33% das linhagens solubilizadoras de fosfato pertenciam à ordem *Burkholderiales*. E de acordo com Kuklinsky-Sobral *et al.* (2004), em trabalho realizado com soja, foram encontradas linhagens solubilizadoras de fosfato inorgânico pertencentes ao gênero *Burkholderia*. Outros trabalhos têm confirmado a eficiência de representantes desses gêneros em solubilizarem fontes de fosfato, sobretudo fosfato de cálcio, como observado na rizosfera de milho por isolados identificados como *Burkholderia* e *Bacillus*, liberando 67% e 58,5%, respectivamente, do fósforo total após 10 dias de crescimento (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

A inoculação de micro-organismos com capacidade de fixar N<sub>2</sub> e solubilizadores de fosfatos ou o manejo de suas populações têm sido sugeridos como forma de diminuir o uso de fertilizantes nitrogenados e fosfáticos solúveis, mediante um melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes ou adicionados ao solo e dos formados pela aplicação de fontes solúveis, como também as perdas de nitrogênio pela volatilização e lixiviação, ajudando assim a diminuir a poluição ambiental. A diversidade de bactérias endofíticas de cana-de-açúcar indicou a presença de isolados potenciais como os gêneros: *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Enterobacter* identificados nesse estudo quanto a atividade de solubilizar o fosfato inorgânico *in vitro*, como também fixar N<sub>2</sub>, sendo necessário mais estudos e sistemas de ensaios planejados com essas linhagens, objetivando avaliar a influência das mesmas sob condições naturais em campo.

## 6. CONCLUSÕES

1. Na interação bactéria/cana-de-açúcar, a densidade populacional total, foi observada uma influencia pelas variedades de cana avaliadas e pelos tecidos vegetais, e pelo manejo, mesmo que essa diferença seja significativa;
2. O uso do cupinicida não provocou alterações na comunidade bacteriana endofíticas de folha e raiz, e epifíticas do rizopiano, nas condições desse trabalho;
3. A densidade das bactérias é inversamente proporcional ao tempo (4 e 10 meses) em cada tecido ou região da planta amostrada e para cada genótipo;
4. A densidade das comunidades bacterianas foi maior na região do rizopiano na maioria dos casos;
5. As variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Nordeste apresentam uma comunidade bacteriana associada com potencial aplicação para a promoção de crescimento vegetal, pois possuem a capacidade de fixar N<sub>2</sub>, solubilizar fosfato inorgânico e produzir ácido idol acético;
6. As linhagens identificadas podem vim a ter um grande potencial para promoção de crescimento vegetal em campo, segundo a expressividade demonstrada em teste *in vitro*.
7. As linhagens bacterianas endofíticas identificadas possuem características de promoção de crescimento vegetal e são promissoras para testes para formulação de um inoculante para cana-de-açúcar, e gerar melhorias no manejo e na economia de insumos para a cultura.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREOTE, F.D. Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas. Piracicaba: ESALQ, 2007. 201f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ASGHAR, H.N. Isolation and screening of plant growth promoting rhizobacteria for increasing field and oil contents of *Brassica* sp. Faisalabad: University of Agriculture, 2002. 210f. Tese (Doutorado – Soil Science) - University of Agriculture, Faisalabad, 2002.

BLANCO, Y.; ARROYO, M.; LEGAZ, M.E.; VICENTE, C. Isolation from *Gluconacetobacter diazotrophicus* cell walls of specific receptors for sugarcane glycoproteins, which act as recognition factors. *Journal Chromatograph*. 1093:204–11, 2005.

BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.108, p.53-65, 1988.

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

BOLOGNA-CAMPBELL, I. Balanço de nitrogênio e enxofre no sistema solo-cana-de-açúcar no ciclo de cana-planta. Piracicaba: ESALQ, 2007. 112 f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CANBOLAT, M.Y.; BILEN, S.; ÇAKMAKCI, R.S.; AHIN, F.; AYDIN, A. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. *Biol Fertil Soils* 42:350–357, 2009. doi: 10.1007/s00374-005-0034-9.

COCKING, E. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. *Plant and soil*, v. 252, p. 169-175, 2003.

COELHO, C.H.M.; MEDEIROS, A.F.A.; POLIDORO, J.C.; XAVIER, R.P.; RESENDE, A.; QUESADA, D.M.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.; URQUIAGA, S. Identificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto ao potencial de contribuição da fixação biológica de nitrogênio. *Agronomia*, vol. 37, nº 2, p. 37 - 40, 2003.

COLLAVINO, M.M.; SANSBERRO, P.A.; MROGINSKI, L.A.; AGUILAR, O.M. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils*, 46: 727–738, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB 2010: Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar safra 2010/11, 3º levantamento, janeiro de 2011. Brasília: Companhia Nacional do Abastecimento, 2011.

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

DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. Rio de Janeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 1, p. 357-365, 1966.

DÖBEREINER, J.. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, v. 13, p. 1-13, 1992a.

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

DOBEREINER, J.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. *Fertilizer Research*, v.42, p. 339-346, 1995.



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

GARG, S.K.; BHATNAGAR, A.; KALLA, A.; NARULA, N. In vitro fixation, phosphate solubilization survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in an aquatic system. *Bioresource Technology*, v. 80, p. 101-109, 2001.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant and Soil*, 280:239–252, 2006.

HARTMANN, A.; SCHMID, M.; VAN TUINEN, D.; BERG, G. Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil*, 321:235–257, 2009.

HU, Y.; FAY, A.W.; LEE, C.C.; YOSHIZAWA, J.; RIBBE, M.W. Assembly of nitrogenase MoFe protein. *Biochemistry*, 47: 3973-3981, 2008.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research* 65:197-209, 2000.

JHA, B.; THAKUR, M.C.; GONTIA, I.; ALBRECHT, V.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. *European Journal of Soil Biology*, 45: 62–72, 2009.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v.96, n.3, p.473-480, 2003.

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.

KUNKLINSKY-SOBRAL, J. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta. Piracicaba: ESALQ, 2003.174f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

LOIRET, F.G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODES, P.; RODES, R.; DONG, Z.A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 97, p. 504-511, 2004.

LUVIZOTTO, D.M.; MARCON, J.; ANDREOTE, F.D.; DINI-ANDREOTE, F.; NEVES, A.A.C.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Genetic diversity and plant-growth related features of *Burkholderia* spp. from sugarcane roots. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, DOI 10.1007/s11274-010-0364-0, 2010.

MASSESSINI, A.M., COSTA, M.D., REIS, M.R. & SILVA, A.A. Atividade de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato na presença de formulações comerciais de glyphosate. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v.26, n. 4, p. 815-823, 2008.

MEDEIROS, A.F.A.; POLIDORO, J.C. & REIS, V.M. Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum* spp.). *Plant and Soil*, 279:141–152, 2006.

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*, 7259–7267, 2007.

MUÑOZ-ROJAS, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; CABALLERO-MELLADO, J. Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. *FEMS Microbiology Ecology*, 54:57–66, 2005.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J. & BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil*, 242:205-215, 2002.

OTTO, R. Desenvolvimento de raízes e produtividade de cana-de-açúcar relacionados à adubação nitrogenada. (Dissertação de Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, São Paulo, 2007. 117p.

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

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; SANTOS, P. E.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H.V.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. Applied and Environmental Microbiology, 3103–3110, 2006.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; P.E.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56: 1931–1937, 2006b.

POLIDORO, J.C. O Molibdênio na Nutrição Nitrogenada e na Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio Associada à Cultura da Cana-de-Açúcar. (Tese de Doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, Brazil, 210, 2001.

POLIDORO, J.C.; MEDEIROS, A. F. A.; XAVIER, R. P.; MEDEIROS, J. A.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. & URQUIAGA, S. Evaluation of Techniques for Determination of Molybdenum in Sugarcane Leaves. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 37:1, 77–91, 2006.

POSTMA, J.; NIJHUIS, E.H.; SOMEUS, E. Selection of phosphorus solubilizing bacteria with biocontrol potential for growth in phosphorus rich animal bone charcoal. Applied Soil Ecology, DOI:10.1016/j.apsoil.2010.08.016, 2010.

REIS, M.R.; SILVA, A.A.; GUIMARÃES, A.A.; COSTA, M.D.; MASSENSINI, A.M.; FERREIRA, E.A. Ação de herbicidas sobre microrganismos solubilizadores de fosfato inorgânico em solo rizosférico de cana-de-açúcar. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 26, n. 2, p. 333-341, 2008.

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

RENNIE, R. J.; DE FREITAS, J. R.; RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B. Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). *Canadian Journal of Microbiology*, v. 28, p. 462-467. 1982.

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

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.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *Journal of Biotechnology*, v.84, p. 155-161, 2000.

SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G.; SILVEIRA, A.P.D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.6, p.833-842, jun., 2007.

SALA, V.M.R.; FREITAS, S.S.; DONZELI, V.P.; FREITAS, J.G.; GALLO, P.B.; SILVEIRA, A.P.D. Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.29, p.345-352, 2005.

SANTOS, M.F.; PÁDUA, V.L.M.; NOGUEIRA, E.M.; HEMERLYD, A.S.; DOMONT, G.B. Proteome of *Gluconoacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. *Journal of proteomics* 73: 917–931, 2010.

SHI, Y.; LOU, K.; LI, C. Promotion of plant growth by phytohormone-producing endophytic microbes of sugar beet. *Biol Fertil Soils*, 45:645–653, 2009.

SHIOMI, H. F.; VICENSI, M.; DEDORDI, C.; OLIARI, Í.C.R. Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico, presentes em líquido ruminal bovino. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 4: 294 – 297, 2009.

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

VASSILEV, N; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.61, p. 435-440, 2003.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M.E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, v.30, p. 460-468, 2000.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, v.91, p.127-141, 2001.

WAKELIN, S.; WARREN, R.; HARVEY, P.; RYDER, M. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biol Fertil Soils* 40:36–43, 2004. doi:10.1007/s00374-004-0750-6