

METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO E PROSPECÇÃO DE  
COMPOSTOS SECRETADOS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS  
ENDOFÍTICAS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE  
CANA-DE-AÇÚCAR

**ERINEUDO DE LIMA CANUTO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

MARÇO - 2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO E PROSPECÇÃO DE  
COMPOSTOS SECRETADOS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS  
ENDOFÍTICAS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE  
CANA-DE-AÇÚCAR

**ERINEUDO DE LIMA CANUTO**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ

MARÇO – 2008

METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO E PROSPECÇÃO DE  
COMPOSTOS SECRETADOS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS  
ENDOFÍTICAS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS DE  
CANA-DE-AÇÚCAR

**ERINEUDO DE LIMA CANUTO**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 18 de março de 2008.

Comissão Examinadora:

---

Verônica Massena Reis (PhD., Agronomia) – Embrapa  
Agrobiologia

---

Rosana Rodrigues (DSc., Produção Vegetal) - UENF

---

Lucia Helena Boddey (PhD., Agronomia) - UENF

---

Fábio Lopes Olivares (PhD., Agronomia) - UENF  
(Orientador)

Além do horizonte deve ter  
Algum lugar bonito  
Prá viver em paz...

Roberto Carlos e Erasmo Carlos

*In memoriam* à minha mãe.

À minha família biológica pelo amor, confiança...  
À minha família carioca pelo carinho, amizade...  
É muito bom escolher uma família. Amo muito vocês!  
Dedico.

## **Agradecimentos**

A Deus pela dádiva da vida.

À minha família pelos ensinamentos de dignidade, respeito e amor ao próximo.

Ao meu orientador, prof. Fábio Lopes Olivares (eternamente, Fabinho!), pela amizade, confiança e aprendizagem. Obrigado pelos ensinamentos e oportunidades que proporcionaram a conquista deste meu objetivo!

Aos pesquisadores José Ivo Baldani, Vera Lúcia Baldani e Verônica Massena Reis da Embrapa Agrobiologia pela orientação, receptividade e trabalhos em colaboração. Obrigado pela disponibilidade de vossos laboratórios ao meu acesso!

Aos professores Carlos e Ivo Curcino pela colaboração e apóio na realização deste trabalho.

À prof<sup>a</sup> Lúcia Gracinda da Silva pela amizade e dedicação na revisão desta tese.

Às prof<sup>as</sup> Verônica Massena Reis, Lúcia Helena Boddey e Rosana Rodrigues pela avaliação desta tese. Obrigado pelas críticas e sugestões!

Aos bolsistas e funcionários dos Laboratórios Biologia Celular e Tecidual (LBCT), Ciências Químicas (LCQUI) da UENF e Ecofisiologia de Plantas da Embrapa Agrobiologia.

Às Instituições: UENF, Embrapa Agrobiologia (CNPAB) e UFRRJ – Campus Dr. Leonel Miranda.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	viii
RESUMO GERAL .....	xiii
GENERAL ABSTRACT .....	xvi
1 - INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1 - A Cultura da Cana-de-Açúcar .....	5
2.1.1 - Algumas Características Botânicas .....	6
2.2 - Bactérias Diazotróficas Endofíticas .....	8
2.2.1 - O Gênero <i>Azospirillum</i> .....	9
2.2.2 - O Gênero <i>Herbaspirillum</i> .....	10
2.2.3 - O Gênero <i>Gluconacetobacter</i> .....	11
2.2.4 - O Gênero <i>Burkholderia</i> .....	12
2.3 - Bactérias Diazotróficas e a Promoção do Crescimento Vegetal .....	12
2.3.1 - Fixação Biológica de Nitrogênio .....	13
2.3.2 - Produção de Fitormônio .....	15
2.4 - Fatores Bióticos e Abióticos na Associação Cana-de-Açúcar/Bactérias Diazotróficas .....	17
2.5 - Inoculação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Plantas de Cana- de-Açúcar .....	19
2.6 - Respostas de Cana-de-Açúcar à Inoculação com Bactérias Endofíticas .....	20
2.7 - Desenvolvimento de um Produto Biotecnológico como Inoculante .....	22
CAPÍTULO I .....	25
METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	25
RESUMO .....	26
ABSTRACT .....	27

1 - INTRODUÇÃO .....	28
2 – MATERIAL E MÉTODOS .....	30
2.1 – Efeito de Fatores Relacionados ao Protocolo Clássico de Inoculação de Bactérias Endofíticas em Plântulas Micropropagadas de Cana-de-Açúcar .....	30
2.1.1 - Ensaio I: Efeito da concentração de células em inóculo simples .....	32
2.1.2 - Ensaio II: Efeito da concentração de células em inóculo misto .....	33
2.1.3 - Ensaio III: Efeito da inoculação da bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) a partir das fases de crescimento lag, log e estacionária .....	33
2.2 – Metodologias de Inoculação de Bactérias Endofíticas em Toletes de Cana-de-Açúcar .....	34
2.2.1 – Concentração de células bacterianas utilizadas como inóculo misto em toletes de cana-de-açúcar .....	34
2.2.2 – Diferentes métodos de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em toletes de cana-de-açúcar .....	35
2.2.3 – Diferentes métodos de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em toletes pré-germinados de plantas de cana-de-açúcar .....	36
2.3 – Análises Estatísticas .....	37
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
3.1 - Avaliação do Efeito de Fatores Relacionados ao Protocolo Clássico de Inoculação de Bactérias Endofíticas em Plântulas Micropropagadas de Cana-de-Açúcar .....	38
3.1.1 - Ensaio I: Efeito da concentração de células em inóculo simples .....	38
3.1.2 - Ensaio II: Efeito da concentração de células em inóculo misto .....	51
3.1.3 - Ensaio III: Efeitos da inoculação da bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) a partir de suas diferentes fases de crescimento .....	55
3.2 – Avaliação da Concentração de Inóculo Misto de Bactérias Endofíticas em Toletes de Cana-de-Açúcar .....	58
3.3 – Avaliação de Métodos de Inoculação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Toletes de Cana-de-Açúcar .....	62
3.4 – Avaliação de Métodos de Inoculação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Toletes Pré-Germinados de Cana-de-Açúcar .....	66
4 – CONCLUSÕES .....	70
CAPÍTULO II .....	71
PROSPECÇÃO PRELIMINAR DE SUBSTÂNCIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO SECRETADAS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS .....	71

RESUMO.....	72
ABSTRACT .....	73
1 – INTRODUÇÃO .....	74
2 – MATERIAL E MÉTODOS .....	76
2.1 – Efeito da Composição do Inóculo Bacteriano Sobre a Promoção do Crescimento de Plantas de Cana-de-Açúcar .....	76
2.2 - Produção de Compostos da Classe Indol por Bactérias Diazotróficas Endofíticas Através do Método Colorimétrico Salkowisk.....	77
2.3 - Análise de Compostos em Meio de Cultura Bacteriano por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM).....	79
2.3.1 - Bactérias e meios de cultura utilizados .....	79
2.3.2 - Preparo das amostras e extração com solvente .....	79
2.3.3 - Análises Cromatográficas e Espectrométricas.....	80
2.4 - Identificação de Proteínas Secretadas por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) em Meio Líquido DYGS.....	80
2.5 – Solubilização de Fosfatos em Meio de Cultura por Bactérias Endofíticas.....	81
2.6 – Bactérias Endofíticas na Promoção de Crescimento de Plantas de Cana-de-Açúcar Oriundas de Sementes .....	81
2.6.1 - Desinfestação e pré-germinação das sementes .....	82
2.6.2 - Bactérias e inoculação .....	82
2.6.3 - Meio de cultura para o crescimento das plântulas .....	82
3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	83
3.1 - Efeito da Composição do Inóculo Bacteriano Sobre a Promoção do Crescimento de Plantas de Cana-de-Açúcar .....	83
3.2 - Produção de Compostos da Classe Indol por Bactérias Diazotróficas Endofíticas Através do Método Colorimétrico Salkowisk.....	87
3.3 – Análise de Compostos em Meio de Cultura Bacteriano por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) .....	92
3.4 - Identificação de Proteínas Secretadas por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) em Meio DYGS Líquido.....	107
3.5 – Bactérias Endofíticas na Solubilização de Fosfato.....	110
3.6 – Efeito da Inoculação de Bactérias Endofíticas no Crescimento de Plantas de Cana-de-Açúcar Oriundas de Sementes.....	111

4 – CONCLUSÕES .....	114
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Log do número de bactérias diazotróficas presentes em raízes desinfestadas e não desinfestadas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com bactéria endofíticas em diferentes concentrações de inóculo. Avaliação utilizando o método de contagem NMP aos 60 dias após a inoculação.....41
- Tabela 2:** Avaliação da frequência de bactérias aderidas às diferentes regiões anatômicas da superfície do eixo radicular de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, aos oito dias após a inoculação simples ( $10^5$ ,  $10^7$  e  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>). Os valores expressos em % representam a presença da bactéria no campo de visão em um total de 25 observações.....45
- Tabela 3:** Número populacional de bactérias diazotróficas em meio de cultura MS contendo as plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com o inóculo misto a partir das estirpes bacterianas PAL5, HRC54 e CBAmC. Contagem realizada através da técnica NMP. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.....52
- Tabela 4:** População de bactérias diazotróficas em raiz e parte aérea de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com uma mistura das estirpes PAL5, HRC54 e CBAmC sob diferentes concentrações de células bacteriana. Contagem realizada aos 60 dias após a inoculação, através do NMP. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.....55
- Tabela 5:** Acúmulo de massa seca da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar oriundas de toletes, que receberam inóculo misto das estirpes PAL5, HRC54, CBAmC, HCC103 e PPe8, em diferentes concentrações de células.....61
- Tabela 6:** Acúmulo de massa seca de raiz de plantas de cana-de-açúcar oriundas de toletes, que receberam inóculo misto das estirpes PAL5, HRC54, CBAmC, HCC103 e PPe8, em diferentes concentrações de células.....61
- Tabela 7:** Acúmulo de massa seca de raiz de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriunda de toletes, tratados e não tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação.....65
- Tabela 8:** Acúmulo de massa seca de parte aérea de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriunda de toletes, tratados e não tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação.....65
- Tabela 9:** Percentagem de nitrogênio em parte aérea de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriunda de toletes, tratados e não tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação.....66

<b>Tabela 10:</b> Acúmulo de massa seca de raiz de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriunda de toletes tratados e não tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação.....	69
<b>Tabela 11:</b> Acúmulo de massa seca de parte aérea de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriunda de toletes tratados e não tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação.....	69
<b>Tabela 12:</b> Produção de compostos indóis por estirpes das bactérias <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> , <i>Herbaspirillum</i> sp e <i>Burkholderia</i> sp em meio de cultura líquido (DYGS) e semi-sólido, sendo: LGI-P ( <i>G. diazotrophicus</i> ), JNFB ( <i>Herbaspirillum</i> sp) e JMV ( <i>Burkholderia</i> sp). Valores em médias de 3 repetições. .	91
<b>Tabela 13:</b> Peso molecular das proteínas secretadas pela bactéria <i>H. seropedicae</i> (HRC54) crescida em meio líquido DYGS, durante 48 horas.....	108

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Número populacional da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) em meio de cultura MS contendo as plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515. Contagem realizada utilizando o método micro-colônia. Avaliação aos 2, 4 e 8 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.....39
- Figura 2:** Número populacional da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) em meio de cultura MS contendo as plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515. Contagem realizada utilizando o método micro-colônia. Avaliação aos 2, 4 e 8 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.....39
- Figura 3:** Número populacional da bactéria *Azospirillum amazonense* (CBAmC) em meio de cultura MS contendo as plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515. Contagem realizada utilizando o método micro-colônia. Avaliação aos 2, 4 e 8 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.....40
- Figura 4:** Massa seca de raízes de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com as estirpes bacterianas PAL5, HRC54 e CBAmC. Plantas crescidas em vasos com substrato comercial durante 60 dias. Média de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 18,15%.....43
- Figura 5:** Massa seca de parte aérea de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com as estirpes bacterianas PAL5, HRC54 e CBAmC. Plantas crescidas em vasos com substrato comercial durante 60 dias. Média de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 33,45%.....43
- Figura 6:** Massa seca total de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com as estirpes bacterianas PAL5, HRC54 e CBAmC. Plantas crescidas em vasos com substrato comercial durante 60 dias. Média de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 23,48%. .....44
- Figura 7:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de segmentos do eixo radicular de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas sob diferentes concentrações de inóculo. (A) Visão do eixo radicular evidenciando a coifa, a zona de alongamento e diferenciação; (B) Visão de uma região de emissão de raízes laterais; (C) Detalhe da coifa; (D) Evidência da metodologia utilizada para avaliação da frequência de adesão da bactéria inoculada em diferentes concentrações, utilizando um círculo amostral de 100 µm de diâmetro; (E) Detalhe da foto em D, com campo de visão na zona de alongamento e diferenciação; (F) Segmento de raiz de planta não inoculada.....48

**Figura 8:** Microscopia eletrônica de varredura de segmentos do eixo radicular de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* (HRC54) na concentração  $10^5$  células mL<sup>-1</sup>. (A) Agregados discretos aderidos à células na região da coifa; (B) Detalhe da foto A evidenciando células isoladas e pequenos agregados associados à mucilagem; (C) Padrão típico de adesão na concentração de  $10^5$  células mL<sup>-1</sup>, evidenciando a colonização preferencial das junções das células epidérmicas na zona de alongamento; (D) Detalhe da foto C. Notar bactérias em monocamada nas junções epidérmicas envolvidas por mucilagem; (E) Pequenos agregados colonizando a zona de emergência de raízes laterais; (F) Padrão de adesão típico para a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) na concentração  $10^5$  células mL<sup>-1</sup> na zona de diferenciação. Notar colonização em monocamada predominantemente nas junções entre células da epiderme. .... 49

**Figura 9:** Microscopia eletrônica de varredura de segmentos do eixo radicular de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* (HRC54) na concentração de inóculo de  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>. (A) Agregados bacterianos proeminentes associados à zona de alongamento; (B) Agregado bacteriano de grande porte observado com maior frequência no tratamento com maior concentração de inóculo; (C) Visão geral do padrão de colonização na zona de formação de pêlos radiculares, evidenciando a emergência de um segmento de raiz lateral e grande número de agregados bacterianos; (D) Detalhe da foto C. Notar agregados de diferentes tamanhos associados à superfície periclinal externa da raiz e região de emergência dos pêlos radiculares; (E) e (F) Padrão de colonização predominante das junções entre células epidérmicas nas paredes anticlinais radiais e transversais, respectivamente. .... 50

**Figura 10:** Número populacional de bactérias diazotróficas em meio de cultura MS contendo plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com o inóculo misto a partir das estirpes bacterianas PAL5, HRC54 e CBAmC. Número obtido através da contagem em micro-colônia usando o meio de cultura NB sólido. Dados referentes a três repetições para cada diluição. .... 52

**Figura 11:** Massa seca de raízes de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a mistura das estirpes PAL5, HRC54 e CBAmC sob diferentes concentrações de células bacteriana. Coleta realizada aos 60 dias após a inoculação. Dados referentes a 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 18,79%. .... 54

**Figura 12:** Massa seca total de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a mistura das estirpes PAL5, HRC54 e CBAmC sob diferentes concentrações de células bacteriana. Coleta realizada aos 60 dias após a inoculação. Dados referentes a 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 22,78%. .... 55

**Figura 13:** Massa seca de raiz de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria HRC54 a partir de suas fases de crescimento. Coleta realizada aos 60 dias após a inoculação. Dados referentes a 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 24,68%. .... 57

<b>Figura 14:</b> Massa seca de parte aérea de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria HRC54 a partir de suas fases de crescimento. Coleta realizada aos 60 dias após a inoculação. Dados referentes a 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 17,80%. .....	57
<b>Figura 15:</b> População de bactérias diazotróficas em raiz de plantas de cana-de-açúcar oriundas de toletes, variedade RB72454, que receberam inóculo misto em diferentes concentrações. Contagem realizada através da técnica NMP, aos 45 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição. ....	60
<b>Figura 16:</b> População de bactérias diazotróficas em raiz de plantas de cana-de-açúcar oriundas de toletes, variedade RB867515, que receberam inóculo misto em diferentes concentrações. Contagem realizada através da técnica NMP, aos 45 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição. ....	60
<b>Figura 17:</b> População de bactérias diazotróficas em raiz e parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriundas de toletes tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação. Contagem realizada aos 30 dias após a inoculação através do NMP. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição. ....	62
<b>Figura 18:</b> População de bactérias diazotróficas em raiz e parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriundas de toletes não tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação. Contagem realizada aos 30 dias após a inoculação através do NMP. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição. ....	63
<b>Figura 19:</b> População de bactérias diazotróficas em raiz e parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriundas de toletes tratados termicamente, pré-germinados e submetidos a diferentes métodos de inoculação. Contagem realizada pelo NMP aos 30 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição. ....	68
<b>Figura 20:</b> População de bactérias diazotróficas em raiz e parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriundas de toletes não tratados termicamente, pré-germinados e submetidos a diferentes métodos de inoculação. Contagem realizada pelo NMP aos 30 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição. ....	68
<b>Figura 21:</b> Massa fresca total de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) sob diferentes composições do inóculo. Coleta realizada aos 15 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 34,51%. .....	84
<b>Figura 22:</b> Massa seca de parte aérea de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) sob diferentes composições do inóculo. Coleta realizada aos 15 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 25,07%. .....	84

<b>Figura 23:</b> Número de sítios de mitose em raízes de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) sob diferentes composições do inóculo. Análises realizadas aos 15 dias após a inoculação. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 20,22%.....	85
<b>Figura 24:</b> Comprimento radicular de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) sob diferentes composições do inóculo. Coleta realizada aos 15 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 43,17%.....	85
<b>Figura 25:</b> Massa seca de raízes e parte aérea de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) sob diferentes composições do inóculo. Coleta realizada aos 60 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 12,81% (raiz) e 15,57% (parte aérea).....	86
<b>Figura 26:</b> Massa seca de planta total de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculada com a bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) sob diferentes composições do inóculo. Coleta realizada aos 60 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 13,40%. .....	87
<b>Figura 27:</b> Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (PAL5) em meio de cultura líquido DYGS, região de 7 a 10 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,11 minutos.....	96
<b>Figura 28:</b> Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (PAL5) em meio de cultura líquido DYGS, região de 7 a 10 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,64 minutos.....	97
<b>Figura 29:</b> Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (PAL5) em meio de cultura líquido DYGS, região de 9 a 13 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 10,11 minutos.....	98
<b>Figura 30:</b> Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (PAL5) em meio de cultura líquido LGI-P (500mL), região de 7 a 11 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,60 minutos.....	99
<b>Figura 31:</b> Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (PAL5) em meio de cultura líquido LGI-P (1000mL), região de 7 a 9 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 7,47 minutos.....	100
<b>Figura 32:</b> Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (PAL5) em meio de cultura líquido LGI-P (1000mL), região de 7 a 9 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,17 minutos.....	101

<b>Figura 33:</b> Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (PAL5) em meio de cultura líquido LGI-P (1000mL), região de 7 a 9 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,20 minutos.....	102
<b>Figura 34:</b> Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) em meio de cultura líquido DYGS, região 7,5 a 12,5 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 10,10 minutos.....	103
<b>Figura 35:</b> Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) em meio de cultura líquido DYGS, região 7,5 a 12,5 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,08 minutos.....	104
<b>Figura 36:</b> Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) em meio de cultura líquido JNFB, região de 7 a 11 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,15 minutos.....	105
<b>Figura 37:</b> Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (HRC54) em meio de cultura líquido JNFB, região de 7 a 11 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 10,14 minutos.....	106
<b>Figura 38:</b> Gel SDS-PAGE 12% das proteínas secretadas pela bactéria <i>H. seropedicae</i> (HRC54) crescida em meio líquido DYGS, durante 48 horas. A: Gel corado com azul de Comassie; B: Gel corado com Prata e PM: peso molecular...	108
<b>Figura 39:</b> Espectro MALDI TOF da proteína DNA primase, DNAG [ <i>Clostridium acetobutylicum</i> ] secretada pela bactéria <i>H. seropedicae</i> (HRC54), crescida em meio de cultura líquido DYGS, durante 48 horas.....	109
<b>Figura 40:</b> Espectro MALDI TOF da proteína M secretada pela bactéria <i>H. seropedicae</i> (HRC54), crescida em meio de cultura líquido DYGS, durante 48 horas.....	110
<b>Figura 41:</b> Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas no acúmulo de massa seca total de plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes, cruzamento Co421 x SP70-1143, aos 70 dias após a inoculação. Dados referentes a 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v: 16,53%. 1º ENSAIO.....	113
<b>Figura 42:</b> Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas no acúmulo de massa seca total de plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes, cruzamento Co421 x SP70-1143, aos 70 dias após a inoculação. Dados referentes a 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v: 17,08%. 2º ENSAIO.....	113

## RESUMO GERAL

A falta de reprodutibilidade na resposta à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar dificulta a adoção de tecnologias em escala industrial. Dentre os entraves, pode-se destacar que até o momento, não foi possível estabelecer uma metodologia de inoculação padronizada que garanta a sobrevivência e estabilidade do inóculo, que possua amplitude temporal de resposta na planta hospedeira, bem como não se conhece ainda toda a comunidade microbiana e suas interações, responsáveis pela expressão da promoção do crescimento na cultura da cana-de-açúcar. Na primeira parte deste estudo, buscou-se avaliar diferentes fatores que integram diferentes metodologias de inoculação e sua influência na maximização das respostas à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar. Na segunda parte, ênfase foi dada à prospecção preliminar de compostos bioativos (derivativos de indóis e proteínas) secretados por estas bactérias em meios de cultura líquido e semi-sólido, potencialmente envolvidos na estimulação do crescimento por mecanismos outros que não a fixação biológica de nitrogênio. Para tanto, foram conduzidos experimentos onde bactérias diazotróficas endofíticas das espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), *Azospirillum amazonense* (CBAmC), *Burkholderia tropica* (PPe8), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) e *H. rubrisubalbicans* (HCC103) foram avaliadas como inóculo simples e misto. Estes inóculos, em diferentes concentrações de células, foram inoculados de diversas formas em plantas micropropagadas e toletes de cana-de-açúcar (tratados por termoterapia ou não). Também foi realizada a análise de 40 estirpes de bactérias destas mesmas espécies quanto à produção de substâncias promotoras de crescimento em meio de cultura líquido e semi-sólido através do método colorimétrico Salkowisk e técnicas cromatográficas e espectrometria de massas. As avaliações demonstraram que as plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foram beneficiadas com a inoculação simples de bactérias, já nas concentrações de inóculo mais baixas ( $10^5$  células mL<sup>-1</sup>). O inóculo com esta concentração de células possibilitou o maior número de células culturáveis no momento do transplante das mudas e o maior crescimento dessas plantas. Por outro lado, a inoculação com a

mistura das cinco estirpes de bactérias não promoveu diferenças na população bacteriana estabelecida em plantas inoculadas nas diferentes concentrações analisadas. Porém, um maior acúmulo de biomassa foi observado nas plantas que receberam o inóculo misto nas concentrações microbianas mais elevadas  $10^9$  e  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Ainda com relação ao efeito da concentração de inóculo, toletes de cana-de-açúcar da variedade RB72454 inoculados com a mistura bacteriana na concentração  $10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$  tiveram um crescimento superior às demais plantas. Com relação aos toletes da variedade RB867515, estes tiveram uma maior produção de biomassa quando inoculados com esta mesma mistura, porém na concentração  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . As plantas de ambas as variedades, quando inoculadas com a mistura bacteriana na concentração de célula  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  tiveram efeito negativo no acúmulo de massa seca de parte aérea. Quanto aos métodos de inoculação de bactérias em toletes, foi observado que naqueles em que as plantas foram tratadas termicamente, a adição da bactéria diretamente ao substrato possibilitou maior acúmulo de massa seca de raiz. Em contrapartida, os métodos de inoculação por imersão durante 2, 6 e 12 horas, registraram um maior acúmulo de massa seca de parte aérea. Nos toletes não tratados, não houve diferenças no acúmulo de massa seca de raiz. Apesar disto, nas plantas submetidas à inoculação por imersão durante 12 horas observou-se um maior acúmulo de massa seca de parte aérea. Na segunda parte do estudo, ficou evidenciado o efeito aditivo do meio condicionando associado à presença da bactéria para expressão de efeitos hormonais. Estes resultados estimularam estudos centrados na identidade química de compostos secretados pelo uso de diferentes métodos. Ensaio clássico de promoção de crescimento em plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes evidenciaram a capacidade de promoção de crescimento de todas as estirpes testadas em relação ao controle, em respostas variando entre 4 a 468%. Estas mesmas estirpes analisadas quanto à secreção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal, foram positivas para indóis em meio líquido DYGS em quantidades proporcionais à concentração crescente de triptofano adicionado ao meio de cultura, indicando sua importância como precursor das rotas de biosíntese de derivados do ácido indol acético. As análises em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) de substâncias secretadas pela estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* em meio líquido DYGS e LGI-P permitiram a identificação dos seguintes compostos: ácido indol-3-carboxialdeído, ácido indol-3-acético, ácido

indol-3-carboxílico metil éster, indol-5-aldeído e ácido indol acético metil éster. Estas análises realizadas para a estirpe HRC54 de *H. seropedicae* em meio líquido DYGS e JNFB permitiram a detecção de indol-3-carboxialdeído e indol-5-aldeído. Ademais, avaliando proteínas secretadas por *H. seropedicae* (HRC54), verificou-se por SDS-PAGE, a presença de 15 a 18 proteínas com massa molecular entre 20 e 210 kDa. Estas proteínas foram secretadas em meio DIGYS líquido e, destas, dez foram avaliadas quanto à sua identidade por espectrometria de massas. Esta avaliação permitiu a identificação de uma proteína de massa 68 kDa que corresponde a DNA primase de *E.coli*, outra de massa 27 kDa que corresponde a uma proteína M de *Streptococcus pyogenes*, bem como outras proteínas não identificadas.

**Palavras-chave:** Concentração de inóculo, inoculante, fixação biológica de nitrogênio, fitormônio.

## GENERAL ABSTRACT

The low reproducibility in relation to inoculation responses in sugarcane plants has impaired the adoption of technologies under industrial scale. Among these difficulties, until now it was not possible to establish an efficient methodology of inoculation that allows the survival and stability of the inoculums with high temporal response on the field, as well we still do not know the whole microbial community and its interaction involved with plant growth promotion expression. At the first part of this study we carried out a serie of assays to evaluate the influence of different factors over the inoculation methodology widely adopted with the objective to increase plant host response to endophytic diazotrophic bacteria. At the second part, emphasis was given to a preliminary prospection of bioactivy compounds (indole derivatives and proteins) secreted by these bacteria in defined culture media, potentially involved on plant growth promotion by other mechanisms than nitrogen fixation. Different experiments were carried out using the bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), *Azospirillum amazonense* (CBAmC), *Burkholderia tropica* (PPe8), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) e *H. rubrisubalbicans* (HCC103) as single and mixed inoculums. These inoculums, under different cell density, were inoculated by different way into micropropagated and seed-grown sugarcane plants (heat treated or not). Also were evaluated 40 bacterium strains in relation to their ability on production of substances correlated to the bacterial phytohormones biosynthesis in liquid and semi-solid media by using Salkowisk method and GC/MS. These evaluations showed that sugarcane plants inoculated with the inoculum concentration  $10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> were beneficed. This inoculum density showed a higher number of feasible cells when the plants were transferred to acclimatization. On the other hand, the mixed inoculation did not show differences between populations of inoculated plants by different inoculum concentration evaluated. However, a higher biomass production was observed in inoculated plants with mixed cell on concentration  $10^9$  and  $10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>. Sugarcane stalks, variety RB72454, inoculated with the bacterial mixture, at concentration  $10^3$  cel.mL<sup>-1</sup>, showed a higher biomass production. The same was observed when sugarcane stalks, variety RB867515, were inoculated with the bacterial mixture, concentration  $10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>. In both varieties, sugarcane plants

inoculated with bacterial mixture, concentration  $10^9$  cel.mL<sup>-1</sup>, showed negative effect on dry matter of aerial parts. In relation to delivery methods for introducing diazotrophic bacteria into sugarcane stalk, treated by thermotherapy, was observed that the method substrate drench was responsible for a higher increase on root dry matter. However, the methods stalks dip during 2, 6 and 12 hours showed an increase on dry aerial parts biomass. When these stalks were not treated, it was not observed increase on root dry matter but the method stalks dip during 12 hours showed a higher dry matter of aerial parts. At the second part of the study, it was evident the additive effect of the conditioned culture media associated with bacteria presence for the expression of the hormonal effects. These results stimulate subsequent studies centered on the chemical identity of secreted compounds by the use of different methodologies. Classical experiments on plant growth promotion in sugarcane seed-born showed positive effects of 40 diazotrophic bacteria with responses raging from 4 to 468%. All above strains were tested for the ability to secrete plant growth regulators being positive for indole production under DYGS liquid medium in concentrations correlated with triptofane dose, denotating its importance as a precursor of the AIA biosynthesis. The analyses in chromatography coupled with mass spectrometry (CG/MS) of released substances by *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) in liquid medium DYGS and LGI-P showed the compounds: acid indole-3-carboxaldehyde, acid indole-3-acetic, acid indole-3-carboxylic methyl ester, indole-5-aldehyde and acid indole-3-acetic methyl ester. The same analyses in relation to released substances by *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) in liquid medium DYGS and JNFB showed the compounds indole-3-carboxaldehyde and indol-5-aldehyde. Furthermore, evaluating the protein profile of *H. seropedicae* (HRC54) it was verified the presence of 15 to 18 proteins with molecular weight raging frm 20 to 210 KDa, which were secreted on DIGYS liquid medium. Ten of them were evaluated on mass spectroscopy which allows identifying a 68 KDa protein similar to DNA primase from *Escherichia coli*, a 27 KDa M protein from *Streptococcus pyogenes* and other unknowing proteins.

**Key words:** Inoculum concentration, inoculant, biological nitrogen fixation, phytohormone.

## 1 - INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da cana-de-açúcar tem contribuído para a independência econômica de inúmeros países tropicais. Esta cultura já proporcionou ao Brasil, no passado, dias de grande prosperidade e opulência, e, ainda hoje, é uma cultura de grande expressão econômica. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia e por Cuba. Aqui, ela é cultivada em diferentes tipos de solos que estão sob influência de diversos climas, com uma área plantada de aproximadamente 7,8 milhões de hectares e uma produtividade média superior a 76 Mg/ha de colmos frescos (IBGE, 2008).

Na década de 70, o Brasil implantou o maior programa de combustível biológico do mundo, o PROÁLCOOL, que além de atenuar a dependência brasileira pelo petróleo, permitiu reduzir a emissão de monóxido de carbono, hidrocarbonetos e óxidos de nitrogênio quando comparados com carros à gasolina. Assim, o país diminuiu a importação de petróleo em valores equivalentes a 200.000 barris por dia. Em termos sócio-econômicos representou a criação de cerca de 1 milhão de empregos e proporcionou a economia de 1,0 bilhão de dólares por ano na economia de divisas.

Com as crescentes elevações dos preços internacionais do petróleo, o cultivo de cana-de-açúcar torna-se novamente promissor devido ao reconhecimento pela comunidade internacional, do uso desta cultura para o seqüestro de carbono atmosférico. Além disso, com os problemas ambientais decorrentes do uso de combustíveis fósseis, a cana-de-açúcar vem sendo utilizada para produzir energia por ser uma das melhores opções dentre as fontes renováveis.

Novas variedades de cana-de-açúcar têm sido obtidas no Brasil através dos programas de melhoramento de cana-de-açúcar desenvolvidos pelo Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, Centro de Tecnologia Canavieira – CTC, Canavialis (Grupo Votoratin) e pelo programa RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento Sucroalcooleiro), constituído pelas universidades federais (UFRPE, UFAL, UFGO, UFV, UFRRJ, UFSCar, UFPR). Estudos paralelos ao desenvolvimento dessas variedades, relacionados à FBN por bactérias diazotróficas

endofíticas em associação com estas plantas, têm sido realizados visando atender à crescente demanda pela produção de cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar demanda grande quantidade de N, porém apresenta uma baixa resposta à adubação nitrogenada. Este fato sugere que a interação de alguns microrganismos diazotróficos endofíticos com estas plantas seja um sistema natural de reposição do N exportado, anualmente dos solos, pela colheita. No Brasil, a dose de N-fertilizante recomendada pela COPERSUCAR (Cooperativa de Produtores de Açúcar e Álcool de São Paulo) para a cana-de-açúcar é de  $50 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$  para cana planta e  $100 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ , a partir da primeira soca (COPERSUCAR, 2000).

Entretanto, estudos evidenciam que a FBN pode contribuir com até 60% de todo o N acumulado pelas plantas de cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2001; XAVIER, 2002). Esta contribuição pode depender do genótipo da planta e sua interação com os diversos gêneros de bactérias diazotróficas endofíticas (OLIVEIRA et al., 2002). Outros fatores como a classe de solo sob cultura, a disponibilidade de nitrogênio mineral, além de fatores ambientais como a precipitação pluviométrica também influenciam nesta taxa de contribuição. Já a quantificação da FBN associada às plantas de cana-de-açúcar, cultivadas no campo e sem inoculação, evidenciou contribuições variando de zero a 70%, conforme demonstrado através da técnica de abundância natural de delta  $^{15}\text{N}$  (POLIDORO et al, 2001; BODDEY et al., 2001).

Além do benefício obtido pela planta através da FBN, efeitos no crescimento vegetal promovido por microrganismos endofíticos estão relacionados também à síntese de substâncias reguladoras do crescimento vegetal, indução de resistência a doenças e aumento da disponibilidade de nutrientes. Além disso, a colonização vegetal por essas bactérias pode levar a um aumento tanto na densidade de pêlos radiculares como na taxa de emissão de raízes secundárias e do aumento da superfície radicular. Estas alterações podem acarretar um aumento da absorção de água, nutrientes e resistência a estresses ambientais (OLIVARES et al., 2002; FERREIRA, 2002).

Uma das formas de reprodução vegetativa da cana-de-açúcar é a técnica de micropropagação, a qual possibilita a obtenção de mudas com características genéticas originais, excelente grau de fitossanidade e rápida multiplicação. Entretanto, além de eliminar os microrganismos patogênicos, também promove a eliminação das bactérias benéficas, acarretando assim prejuízos às plantas (MORAES, 1995). Outra forma de reprodução destas plantas é a propagação através

de toletes, segmentos de colmo de uma a três gemas, os quais podem ser ou não tratados termicamente. O tratamento térmico de toletes tem por objetivo a redução ou controle do raquitismo da soqueira e outras doenças, com possíveis reflexos positivos na produtividade dos canaviais (CHAVES et al., 2002).

A introdução ou reintrodução de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas micropropagadas ou toletes de cana-de-açúcar tem auxiliado os estudos da associação plantas/bactérias diazotróficas. Além disso, tem permitido avaliar o potencial de FBN e de outros mecanismos de promoção de crescimento vegetal resultantes desta interação. Nesse contexto, a introdução/reintrodução destas bactérias em plantas de cana-de-açúcar, constitui um momento adequado para o uso de uma bactéria ou mistura bacteriana visando à promoção de crescimento destas plantas. No entanto, diante da complexidade da biota endofítica, não se conhece os principais microrganismos que integram a comunidade bacteriana promotora do crescimento vegetal, bem como a técnica adequada para a introdução destas bactérias nas referidas plantas.

Avanços no melhor entendimento e aproveitamento da interação bactérias endofíticas e plantas de cana-de-açúcar dependem de estudos de avaliação dos genótipos bacterianos e das variedades desta cultura. Estas avaliações, associadas a uma correta e eficiente metodologia de inoculação, podem ser um fator diferencial para o aumento da produtividade, redução dos custos de produção e possível geração de um inoculante para uso em larga escala em sistemas de produção agrícola.

No presente trabalho, foi realizada a avaliação de metodologias de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar. Esta avaliação foi baseada na premissa de que a maximização do potencial de crescimento destas plantas ocorre em função de fatores como o número adequado de células no inóculo associado a um eficiente método de inoculação. Este método deve favorecer uma maior sobrevivência das células e aumentar a possibilidade de infecção e colonização das plantas. Ainda neste sentido, foram identificadas algumas substâncias secretadas por bactérias endofíticas crescidas em condições *in vitro*. Estas substâncias estão relacionadas à ação bioestimulante sobre plantas de cana-de-açúcar, com ênfase em substâncias reguladoras de crescimento.

Os objetivos principais deste trabalho foram: i) aprimorar as bases tecnológicas da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas

micropropagadas e toletes de cana-de-açúcar; ii) identificar substâncias secretadas por bactérias diazotróficas em meio de cultura, candidatas a estimular o crescimento de plantas de cana-de-açúcar por mecanismos outros que não a fixação biológica de nitrogênio.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - A Cultura da Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar constitui o único produto de origem agrícola, destinado à alimentação, que ao longo dos séculos foi alvo de disputas e conquistas, mobilizando homens e nações (MIOCQUE, 1993). Provavelmente oriunda do sudeste da Ásia, nas regiões de Assam e Bengala, a cana-de-açúcar se expandiu no Ocidente. Obteve um maior desenvolvimento no continente americano, onde ocupou extensas áreas, constituindo, desde os tempos coloniais, a principal atividade econômica dessas regiões (PIMENTEL GOMES e LIMA, 1964).

Para o Brasil, estas plantas foram trazidas em 1530 pelos colonizadores portugueses, como sustentáculo econômico das capitanias hereditárias. Os historiadores afirmam que a introdução da cana-de-açúcar no Brasil, quase se confunde com a história da civilização de nosso país. Os primeiros cultivos foram realizados na Capitania de São Vicente, com mudas trazidas da Ilha da Madeira por Martim Afonso de Souza. O primeiro engenho do Brasil, segundo a maioria dos historiadores, foi o que Jerônimo de Albuquerque estabeleceu em Olinda, em 1540, com a denominação de Nossa Senhora da Ajuda (ANDRADE, 1985).

O Brasil, pelas condições de clima e solo, em especial na Região Nordeste, apresentava excelentes características para o plantio da cana-de-açúcar, o que conduziu a implantação desta monocultura, baseada no latifúndio, no trabalho escravo e na produção voltada para o mercado externo (CADERNOS TECNOLÓGICOS, 2004).

A primeira variedade de cana-de-açúcar cultivada comercialmente era conhecida como “cana crioula”, resultado do cruzamento de variedades do grupo mungo (*Saccharum barberi*) e uma cana nobre (*Saccharum officinarum*), importada para a América por Cristóvão Colombo, tendo sido cultivada por mais de 250 anos. No Brasil, a variedade Caiana foi amplamente cultivada, sendo responsável pela produção mundial do açúcar durante quase um século (ANDRADE, 1985).

Com a contínua importação de novas variedades apareceram os problemas de moléstias como o mosaico. A primeira ocorrência se deu em Campos - RJ, em 1838 expandindo-se para São Paulo, Pernambuco e Santa Catarina (MATTOS, 1942). Esta

moléstia contribuiu para a quase extinção da variedade Caiana, aumentando o interesse dos melhoristas por outras variedades. Sua substituição se deu pela variedade Manteiga. Até o advento das variedades híbridas provenientes principalmente dos programas de melhoramento de Java, da Índia e do Brasil, as outras variedades nobres não chegaram a ser predominantes no manejo dos canaviais (PINTO, 1965).

No início da década de 70, o Estado de São Paulo assumiu a liderança na produção e tecnologia de cana-de-açúcar no país. Neste período, novas opções de variedades para o plantio foram proporcionadas pelos programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar: IAC (Instituto Agrônomo de Campinas), RB (PLANALSUCAR) e as SPs (COPERSUCAR). Posteriormente, o censo varietal de 1996 destacava as variedades dos programas de melhoramento das séries RB (República do Brasil) e SP como as variedades mais importantes no cenário sucroalcooleiro.

No Estado do Rio de Janeiro, principalmente no município de Campos dos Goytacazes, a crise no setor sucroalcooleiro tem causado uma grande retração na atividade de usinas e destilarias. Como consequência, verifica-se uma redução de 20% da área cultivada com esta cultura e uma das mais baixas produtividades agrícolas e rendimento industrial do país. A cana-de-açúcar é historicamente estratégica na geração de divisas para o Rio de Janeiro e com a crise do setor, torna-se necessária a elaboração de planos de recuperação da atividade sucroalcooleira neste Estado.

### **2.1.1 - Algumas Características Botânicas**

A cana-de-açúcar pertence à classe Monocotyledoneae, família Poaceae, e ao gênero *Saccharum*, incluindo as espécies: *Saccharum officinarum* L.; *Saccharum spontaneum* L.; *Saccharum sinensis* Roxburgo; *Saccharum barberi* Jeswiet e *Saccharum robustum* Jeswiet. (JESWIET, 1925, citado por BACCHI, 1983).

O sistema radicular é composto por raízes temporárias, permanentes e adventícias, formando um sistema fasciculado bem desenvolvido com crescimento de até quatro metros ou mais. As raízes de *S. officinarum* concentram-se nos 20 cm superficiais do solo. Quando as plantas são originadas de sementes, possuem raízes primárias, secundárias e terciárias (CLEMENTS, 1980). Na reprodução em

forma de toletes, as primeiras raízes que se desenvolvem são as de fixação, originadas dos primórdios radiculares situados no entrenó. Após um período de aproximadamente 30 dias, começa o desenvolvimento das raízes dos perfilhos primários, secundários e assim sucessivamente, enquanto as raízes de fixação vão perdendo sua função. Cerca de 90 dias após o plantio, a planta passa a depender exclusivamente das raízes dos perfilhos (ROCHECOUSTE, 1967, citado por BACCHI, 1983).

O colmo é cilíndrico e de cores diferenciadas conforme a variedade (amarelo, creme, roxo ou listrado). É formado pelos entrenós, nós, folhas e inflorescência. Cada nó apresenta uma gema que se dispõe alternadamente ao longo do colmo. As gemas são protegidas pela bainha das folhas, que estão presas aos entrenós. As folhas mais velhas, ao caírem, deixam uma cicatriz acima da qual se situa a zona radicular, que contém os primórdios radiculares. Abaixo da cicatriz observa-se uma zona de concentração de cera, denominada zona cerosa. Cortado transversalmente, o colmo apresenta uma casca dura, fibras e a polpa interna, mais macia. O tecido mais macio é composto principalmente de células que armazenam o caldo contendo açúcar. Esta polpa envolve as fibras, que são os feixes vasculares (CLEMENTS, 1980).

As folhas da cana-de-açúcar são lanceoladas de filotaxia oposta. São compostas pela lâmina e bainha, ligadas por uma porção internamente membranosa, denominada lígula. A base de sua sustentação é a nervura central, da qual saem várias nervuras paralelas, cada qual contendo um feixe vascular. Entre estas nervuras se estendem fileiras de estômatos, presentes nas duas faces da folha (BACCHI, 1983).

A semente da cana-de-açúcar é muito pequena e de cor marrom, quando madura. Trata-se de um fruto denominado de cariopse de 1,5 mm de comprimento por 0,5 mm de diâmetro transversal. Surge de uma inflorescência paniculada de flores hermafroditas. Cada flor possui apenas um óvulo por ovário e estames em número de três, com uma antera cada. Artificialmente, o florescimento pode ser controlado através do manejo de água e de nutrientes, bem como através de variações na época de plantio e de corte (BACCHI, 1983).

O crescimento vegetal destas plantas é caracterizado pelo acúmulo de matéria seca, podendo ser caracterizado em diferentes fases. A primeira é caracterizada pela brotação de gemas, a exemplo da cultura de ciclo curto. Segue-

se a esta uma fase de crescimento menos lento que as anuais. Após o desenvolvimento do sistema radicular e emergência das folhas mais duradouras, a planta entra na terceira fase. Nesta, ocorre um crescimento mais rápido, associado com maiores taxas fotossintéticas que darão suporte à produção econômica da cultura. A partir daí a cultura entra na fase de senescência (LUCCHESI, 1987).

O solo, o clima, o manejo da cultura e a variedade de cana-de-açúcar são fatores que interferem na produção e qualidade de seus derivados. Em função disto, são constantemente estudados sob diferentes aspectos, objetivando promover um melhor rendimento da cultura e, conseqüentemente, maior lucratividade (DIAS, 1997).

## **2.2 - Bactérias Diazotróficas Endofíticas**

Devido ao estabelecimento de bactérias fixadoras de nitrogênio em tecidos de raízes e partes aéreas de plantas, tais microrganismos têm sido denominados diazotróficos endofíticos. Apesar de controvérsias, a definição mais aceita do termo endófito consiste de microrganismos que podem ser isolados de tecidos vegetais, superficialmente desinfestados, ou extraídos de dentro da planta, e que não causam danos visíveis ou induzem sintomas na planta (KLOEPPER et al., 1997).

A capacidade de colonizar habitats específicos no interior dos tecidos das plantas permite que estas bactérias estejam protegidas dos níveis de oxigênio que inibem a atividade da enzima nitrogenase. Além disso, permite que tenham acesso facilitado, com reduzida competição, por fontes de carbono. Desta forma, estas bactérias são beneficiadas e podem contribuir com a fixação do nitrogênio atmosférico diretamente nos tecidos das plantas. Esta colonização pode ser local, como nos espaços intercelulares das células do córtex radicular ou pode ser sistêmica, sendo transportada através dos elementos condutores (JAMES et al., 1994).

Os microrganismos endofíticos entram nas plantas, principalmente através das raízes, porém, partes aéreas das plantas como as folhas, caules e cotilédones podem constituir sítios de infecção. Bactérias endofíticas parecem penetrar ativamente nos tecidos das plantas usando enzimas hidrolíticas como celulasas e pectinases, além de usarem aberturas naturais ou provocadas por injúrias (QUADT-HALLMANN et al., 1997; REINHOLD-HUREK e HUREK, 1998). O modo de dispersão das

bactérias endofíticas no ambiente pode ser via sementes, propagação vegetativa, partes mortas da planta ou insetos (BALDANI et al., 1997).

Bactérias endofíticas podem atuar na promoção do crescimento vegetal através da fixação biológica de nitrogênio, síntese de hormônios vegetais e redução dos sintomas de doenças causadas por patógenos (CHEN et al., 1995). O fitormônio sintetizado pelas bactérias estimula o desenvolvimento radicular, aumenta a densidade e comprimento das raízes laterais e sua área superficial (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994; FERREIRA, 2002). Desta forma, a baixa tolerância de plantas axênicas a estresses pode estar associada, em partes, à ausência de microrganismos endofíticos (HALLMANN et al., 1997).

Nesta revisão serão abordadas apenas as bactérias diazotróficas endofíticas que serão objeto deste estudo.

### **2.2.1 - O Gênero *Azospirillum***

O gênero *Azospirillum* possui atualmente oito espécies, sendo sete consideradas diazotróficas e com capacidade de colonizar tanto a rizosfera quanto o interior de raízes de várias plantas forrageiras e cereais: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (TARRAND et al., 1978), *A. amazonense* (MAGALHÃES et al., 1983), *A. halopraeferens* (REINHOLD et al., 1987), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. largimobile* (DEKHIL et al., 1997), *A. dobereineriae* (ECKERT et al., 2001) e *A. oryzae* (XIE e YOKOTA, 2005).

Descrito por TARRAND et al. (1978), a espécie mais importante deste gênero é *A. brasilense*, por acumular maior número de informações sobre aspectos fisiológicos e moleculares. As espécies *A. lipoferum* e *A. brasilense* são encontrados freqüentemente colonizando a maioria das plantas de regiões tropicais e temperadas de interesse agrônômico como milho, sorgo, arroz e trigo (BALDANI et al., 1984; BALDANI et al., 1997). *A. lipoferum* também foi isolada de raízes de cevada na região sul do Brasil (DIDONET et al., 1998), predominado em raízes e folhas da forrageira *Miscanthus sinensis* cultivada na Alemanha (KIRCHHOF et al., 1997) e representou 85% dos isolados de *Azospirillum* obtidos de solo cultivados com arroz nas Filipinas (LADHA et al., 1983).

A espécie *A. amazonense*, inicialmente isolada de plantas forrageiras e da palmeira *Bactrix grassipus* (MAGALHÃES et al., 1983), coloniza os cereais milho, arroz e sorgo e também as raízes, caule e folhas de cana-de-açúcar. Esta espécie,

juntamente com *A. lipoferum* e *A. brasilense*, tem sido encontrada em altos números podendo chegar a  $10^7$  células por grama de massa fresca (BALDANI et al., 1997).

De ocorrência mais restrita, poucos trabalhos são encontrados referentes às demais espécies. *A. halopraeferens*, foi isolada somente do rizoplano e raízes da Poaceae Kallar, crescida em solos salinos no Paquistão (REINHOLD et al., 1987). *A. irakense* só foi encontrada em amostras da rizosfera e raízes de plantas de arroz cultivadas no Iraque (KHAMMAS et al., 1989). *A. largomobile* tem sua ocorrência restrita às águas de um lago na Austrália (DEKHIL et al., 1997) e não está descrita como fixadora de nitrogênio. A partir de plantas *Miscanthus sinesensis*, família Poaceae, foi isolada uma nova bactéria nomeada *A. doebereineriae* (ECKERT et al., 2001). *A. oryzae*, a última espécie descrita, como o próprio nome sugere, foi isolada de raízes de arroz em 1982, no Japão (XIE e YOKOTA, 2005).

### 2.2.2 - O Gênero *Herbaspirillum*

O gênero *Herbaspirillum* foi descrito juntamente com a primeira espécie, *H. seropedicae* (BALDANI et al., 1986), uma bactéria diazotrófica associada às poaceas no Brasil. Posteriormente, bactérias desta espécie foram isoladas de raízes, folhas e colmos de cana-de-açúcar, *Brachiaria decumbens* e *Digitaria decumbens* (OLIVARES et al., 1996), de raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar cultivada na Austrália (BODDEY et al., 1998), dendezeiro e pupunheira (FERREIRA et al., 1995), bananeira (CRUZ et al., 2001), detectada em capim elefante (REIS et al., 2000) e isolada em associação com arroz inundado (RODRIGUES, 2004; Brasil, 2005).

*H. rubrisubalbicans* originalmente descrito como *Pseudomonas rubrisubalbicans* (GILLIS et al., 1991) foi reclassificada por BALDANI et al. (1996). Tem sido encontrada em associação com cana-de-açúcar e raízes de *Digitaria insularis* crescida no interior da plantação de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1996). Foi detectada também em capim elefante (REIS et al., 2000), abacaxizeiros e bananeiras (CRUZ et al., 2001).

*H. frisingense* foi descrita a partir do isolamento de amostras de tecidos de raízes e colmos de diversos genótipos de capim elefante coletados no Brasil, e das poaceas *Spartina pectinata*, *Miscanthus sinensis* e *M. sacchariflorus*, coletadas na Alemanha (KIRCHHOF et al., 2001).

Das espécies descritas e propostas, apenas *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. frisingense* fixam nitrogênio em associação com plantas não leguminosas. A mais nova espécie diazotrófica descrita, *H. lusitanum*, foi isolada de nódulos de raízes de feijão coletados em Portugal (VALVERDE et al., 2003).

### 2.2.3 - O Gênero *Gluconacetobacter*

Dentre as bactérias descritas neste gênero, as espécies fixadoras de nitrogênio atmosférico são *G. diazotrophicus*, *G. azotocaptans* e *G. johannae*.

*Gluconacetobacter diazotrophicus* foi isolada por CAVALCANTE e DÖBEREINER (1988) a partir de tecidos de cana-de-açúcar cultivados nos estados brasileiros Alagoas, Pernambuco e Minas Gerais. Esta bactéria foi inicialmente denominada de *Saccharobacter nitrocaptans*. Estudos de homologia DNA-RNA (GILLIS et al., 1989), possibilitaram sua reclassificação em *Acetobacter diazotrophicus* e mais tarde foi incorporada ao gênero *Gluconacetobacter* (YAMADA et al., 1997).

*Gluconacetobacter diazotrophicus* possui poucos hospedeiros, tendo sido encontrada em associação com plantas ricas em açúcar como a cana-de-açúcar, batata-doce e capim cameroon, todas apresentando propagação vegetativa (DÖBEREINER, 1992). Esta bactéria foi isolada de inúmeras variedades de cana-de-açúcar crescidas nas diversas regiões do Brasil, tendo sido encontrada também na Austrália (LI e MACRAE, 1991), Cuba (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993), Argentina (DONG et al., 1994) e México (BELLONE et al., 1997). Esta bactéria coloniza raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar em números de até  $10^6$  células  $g^{-1}$  de massa fresca (REIS et al., 1994; BODDEY et al., 1998).

Esta bactéria apresenta baixa diversidade genética (CABALLERO-MELLADO et al., 1994; CABALLERO-MELLADO et al., 1995), sua população presente nos tecidos de cana-de-açúcar diminui consideravelmente com o avançar da idade da planta (SILVA, 1999; PERIN, 2003; MUÑOZ-ROJAS et al., 2003) e condições favoráveis de nível de nitrogênio (FUENTES-RAMÍRES et al., 1999; MUTHUKUMARASAMY, 1999; REIS Jr et al., 2000).

Segundo LEE et al. (2004) a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* apresenta dois efeitos benéficos principais em cana-de-açúcar associados à FBN e à produção de substâncias promotoras de crescimento destas plantas.

*G. azotocaptans* e *G. johannae* foram isoladas de rizosfera e rizoplano de plantas de café cultivadas no México (FUENTES-RAMÍREZ et al., 2001) e amostras de rizosfera de café cultivados no Brasil (SANTOS et al., 2006).

#### **2.2.4 - O Gênero *Burkholderia***

Bactérias diazotróficas deste gênero foram isoladas inicialmente de arroz (OLIVEIRA, 1992), mandioca (BALOTA, 1994), batata doce, algumas frutíferas e posteriormente de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1996).

Estudos utilizando a atividade de redução de acetileno (ARA) e a técnica de reação da DNA polimerase (PCR) para amplificar os genes *nifHDK*, em diversas espécies do gênero, identificaram a riqueza desconhecida de espécies diazotróficas (ESTRADA de LOS SANTOS et al., 2001).

Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* também se associam com plantas leguminosas, formando nódulos. As espécies *B. tuberum* e *B. phymatum* (VANDAMME et al., 2002), foram isoladas de *Aspalathus carnosae*, na África do Sul e *Machaerium lunatum*, na Guiana Francesa. Os dados disponíveis até o momento mostram que as bactérias que nodulam plantas leguminosas e, aquelas associadas às não leguminosas, são diferentes (VANDAMME et al., 2002).

Em cana-de-açúcar, duas espécies foram recentemente descritas. *B. unamae* (Caballero-Mellado et al., 2004), isolada de cana-de-açúcar, café e milho de diferentes lugares do México e *B. tropica* (Reis et al., 2004), isolada de plantas de cana-de-açúcar no Brasil e África do Sul, solo nos EUA e milho no México. Inúmeros isolados das espécies *B. tropica*, *B. kururiensis* e *B. caribensis* foram obtidos a partir de amostras de cana-de-açúcar brasileiras e australianas (BODDEY, 2002).

### **2.3 - Bactérias Diazotróficas e a Promoção do Crescimento Vegetal**

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) compõem um grupo heterogêneo de bactérias que podem ser encontradas na rizosfera e superfície da raiz atuando no crescimento das plantas de forma direta e indireta (AHMAD et al., 2008). Estas bactérias apresentam a habilidade de converter nutrientes importantes da forma indisponível para a disponível. Esta conversão

ocorre através de processos biológicos e sob a influência de fatores ambientais como, por exemplo, o tipo de solo (VESSEY, 2003).

Indiretamente, a promoção de crescimento de plantas também ocorre quando as PGPR diminuem ou evitam os efeitos deletérios de um ou mais organismos fitopatogênicos. A ação direta ocorre quando envolve a liberação de compostos sintetizados pela bactéria ou quando a presença da bactéria facilita a obtenção de nutrientes do ambiente (GLICK, 1995). Amplos grupos de organismos têm sido considerados promotores de crescimento vegetal como espécies de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Bacillus* (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994; Glick, 1995). Neste sentido, PGPR inclui as rizobactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que colonizam a rizosfera fornecendo nitrogênio para as plantas (GLICK, 1995).

Os mecanismos de ação direta das PGPR incluem, por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio, síntese de sideróforo (BAR-NESS et al., 1992), produção de fitormônios (BASTIÁN et al., 1998; GLICK et al., 1999), solubilização de fósforo e zinco (SUNDARA et al., 2002; SARAVANAN et al., 2007), dentre outros. Já os mecanismos de ação indiretos incluem a supressão de organismos deletérios do ambiente endofítico através de competição ou antibiose (NEJAD e JOHNSON, 2000, SOMERS, et al., 2005), redução de fatores de estresses como etileno endógeno (ENYEDI et al., 1992), antagonismos a fitopatógenos (TSIMILI-MICHAEL et al., 2000; PIÑÓN et al., 2002), dentre outros.

No entanto, nesta revisão, serão apresentados os eventos biológicos FBN e produção de fitormônios, responsáveis pela promoção de crescimento de plantas e realizados por bactérias promotoras do crescimento vegetal.

### **2.3.1 - Fixação Biológica de Nitrogênio**

O nitrogênio molecular ( $N_2$ ) constitui 78% da atmosfera, necessitando ser transformado em formas combinadas, passíveis de serem aproveitadas pelas plantas ( $NH_4^+$ , por exemplo). Esta transformação ocorre com gastos energéticos elevados, sendo necessário cerca de 15 Mcal para obtenção de 1 kg de N-fertilizante a partir do N do ar (MACEDO e KOLLER, 1997), requerendo energia derivada de combustíveis fósseis (Processo Haber-Bosch). Estes combustíveis possuem reservas limitadas, e conseqüentemente preços crescentes. Sendo assim,

é possível que o uso de plantas que se utilizam do N fixado pelas bactérias diazotróficas, seja uma das formas mais viáveis de disponibilizar o nitrogênio necessário para as culturas agrícolas.

A estabilidade do gás  $N_2$  é devido à presença de uma forte interação covalente, ligação tripla, entre os dois átomos de N. Apenas uma porção dos organismos do grupo dos procariotos consegue converter, via enzima nitrogenase, o nitrogênio da atmosfera em amônia, a qual pode ser incorporada para o crescimento e manutenção das células. Estes organismos são denominados diazotróficos, e, o mecanismo responsável pela incorporação de N à biomassa, é denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Há muitos gêneros e espécies capazes de realizar a FBN e que estão distribuídos no ambiente e associados às plantas. Essas associações podem variar em especificidade, estrutura, localização e microrganismo responsável. Existem as bactérias denominadas simbióticas, que são capazes de formar nódulos e pertencem principalmente ao grupo do rizóbio e do gênero *Frankia*. Há também bactérias que colonizam os tecidos internos das plantas e são denominadas de bactérias endofíticas. Um terceiro grupo forma associações na superfície dos tecidos radiculares, sobrevivem bem no solo e são caracterizados como espécie-específicas, sendo denominadas associativas (BALDANI et al., 1997). Todos esses microrganismos têm em comum a presença do complexo enzimático nitrogenase. Além desse grupo de bactérias heterotróficas, existem as cianobactérias de vida livre, cianobactérias simbióticas, bactérias que vivem no trato digestivo de animais, líquens e arqueas minerotróficas, domínio Archaea (REIS et al., 2006).

A FBN realizada por organismos procariotos e a transferência e/ou disponibilização deste nitrogênio assimilado para o metabolismo vegetal constitui o mecanismo mais estudado de promoção do crescimento vegetal. A contribuição das bactérias diazotróficas para a nutrição de plantas leguminosas através da FBN é bastante conhecida. No entanto, entre as espécies não leguminosas, a ocorrência da FBN ainda é motivo de muita discussão apesar dos vários trabalhos de inoculação mostrando a contribuição destas bactérias em diferentes plantas não leguminosas.

Bactérias diazotróficas em associação com algumas plantas apresentam importante contribuição na nutrição nitrogenada das mesmas. Estudos têm mostrado contribuições na ordem de 70% do nitrogênio necessário ao desenvolvimento da

cana-de-açúcar (URQUIAGA, 1992) e de 20 a 25% ao da cultura do arroz (BALDANI e BALDANI, 2005).

Além da incorporação de N no ecossistema, a FBN tem um papel fundamental na preservação do meio ambiente, principalmente pela redução dos níveis de nitrato lixiviado para lagos e rios advindos de fertilizantes nitrogenados. Estas perspectivas fazem da FBN um processo com elevado potencial de aplicação na agricultura comercial, e tem sido alvo de pesquisas desenvolvidas no Brasil e no mundo.

Até o momento sabe-se que a FBN em plantas não leguminosas poderá contribuir e não suprir toda a necessidade de nitrogênio, e alguns fatores como genótipo da planta e da bactéria precisam ser levados em consideração para obter melhores resultados, bem como fatores bióticos e abióticos do meio.

### **2.3.2 - Produção de Fitormônio**

Fitormônios são substâncias orgânicas que em baixas concentrações (menos de 1 mM) promovem, inibem ou modificam o crescimento e desenvolvimento de plantas. Seis principais grupos de fitormônios são identificados: giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, brassinosteróides e auxinas (MARTÍNEZ-MORALES et al., 2003). O principal representante do grupo auxinas é o hormônio ácido indol acético (AIA). Este hormônio é uma molécula sinal importante na regulação do desenvolvimento das plantas. Seu papel central é o de regulador de crescimento, o que torna a planta dependente de mecanismos de estreito controle de sua concentração (NORMANLY, 1997).

Diversos grupos de microrganismos do solo, epifíticos e endofíticos têm demonstrado capacidade de biosíntese de ácido indol acético (AIA) e seus conjugados. Esta habilidade pode ser demonstrada por cerca de 80% das bactérias isoladas da rizosfera (LEINHOS e VACEK, 1994, citado por PATTEN e GLICK, 1996). Este fato está relacionado às condições variáveis e fatores como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes neste ecossistema (PATTEN e GLICK, 1996; LEE et al., 2004).

A produção de hormônios vegetais associada a microrganismos diazotróficos tem sido demonstrada em *Azotobacter chroococum* e *Azotobacter vinelandii* (MARTÍNEZ-TOLEDO et al., 1988), em *Rhizobium* spp. (BADENOCH-JONES et al., 1982),

*Agrobacterium tumefaciens* (MORIS, 1986), *A. rhizogenes* (WHITE e NESTER, 1980), *Bradyrhizobium* spp. (MINAMISAWA et al., 1996; VEGA-HERNÁNDEZ, et al., 2002), *Azospirillum* spp. (MARTÍNEZ-MORALES et al., 2003; SOMERS et al., 2005), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BASTIÁN et al., 1998; PEDRAZA, et al., 2004), *Herbaspirillum seropedicae* (BASTIÁN et al., 1998), dentre outros.

O principal hormônio produzido por estirpes de *Azospirillum* é uma auxina, o ácido indol acético (AIA) (CROZIER et al., 1988), além de outros compostos indólicos como o ácido-3-indolbutírico (MARTÍNEZ-MORALES et al., 2003), também produzem citocininas (CACCIARI et al., 1989) e giberelinas (BOTTINI et al., 1989). Em sobrenadante de meio de cultura definido das espécies *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* foram detectados AIA e giberelinas A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> (BASTIÁN et al., 1998). RADWAN et al. (2002) constataram a produção de indóis por estirpes de *Herbaspirillum*, incluindo *H. rubrisubalbicans* e outros isolados não identificados.

Mecanismos genéticos fundamentais envolvendo a biosíntese e regulação do AIA têm sido estudados em *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum* e múltiplas vias para a biosíntese de AIA tem sido identificadas, sejam elas dependente ou independente de triptofano (GLICK et al., 1999).

A biosíntese do AIA, dependente de triptofano, possui três vias principais: ácido indol-3-pirúvico (AIP), indol-3-acetamida (IAM) e a via triptamina (TAM) (MÜLLER e WEILER, 2000). A via AIP é a mais comum e envolve uma reação de desaminação para formar AIP, seguido por uma descarboxilação para formar o indol-3-acetaldeído (IAId). Este é, então, oxidado a AIA por uma desidrogenase específica. A via IAM envolve as enzimas triptofano monoxigenase e a indol-3-acetamida hidrolase. Já a via TAM é semelhante à do AIP, exceto pela ordem inversa das reações de desaminação e descarboxilação, bem como outras enzimas envolvidas (PATTEN e GLICK, 1996).

Embora haja suspeitas da existência de vias de síntese de AIA, independente do triptofano, nenhuma abordagem genética disponível pode confirmar e definir a existência de tais vias (NORMANLY, 1997). Entretanto, a elucidação das vias e suas regulações é essencial no entendimento do papel do AIA no estabelecimento e funcionamento da associação planta/bactéria (ZAKHAROVA et al., 1999).

Segundo PRINSEN et al. (1993), cerca de 90% das estirpes da bactéria *Azospirillum brasilense* sintetizam AIA numa via dependente de triptofano. Diferentes vias de síntese deste hormônio por bactérias do gênero *Azospirillum* já foram identificadas como as vias indol-3-acetamida (IAM) e ácido indole-3-pirúvico (AIP) (DOBBELAERE et al., 1999; LAMBRECHT et al., 2000).

Algumas bactérias em interação com plantas podem liberar altos conteúdos de AIA, alterando o balanço local de hormônios endógenos e provocando respostas no hospedeiro, as quais dependem da concentração do fitormônio gerado, tipo de hospedeiro e sua sensibilidade a este hormônio (GLICK et al., 1999).

O interesse em estudar a produção de fitormônios por bactérias endofíticas não se restringe a seu efeito fisiológico no desenvolvimento das plantas, mas também sob o ponto de vista de identificação de seu possível papel na associação planta/bactéria (COSTACURTA e VANDERLEYDEN, 1995). A função da biosíntese de fitormônios em microrganismos não está bem elucidada. Em vários casos de fungos e bactérias patogênicos, estes compostos são envolvidos na patogenia de plantas (COSTACURTA e VANDERLEYDEN, 1995). No entanto, entre os efeitos no crescimento vegetal ocorrem estímulos ao desenvolvimento de raízes laterais e alongamento das raízes primárias (FERREIRA, 2002 e OLIVARES et al., 2002).

Fitormônios produzidos por bactérias associadas a plantas são considerados chave na estimulação do crescimento vegetal, na fitopatogênese e interações associativas e endofíticas plantas/microrganismos (CHRISTIANSEN-WENIGER, 1998).

#### **2.4 - Fatores Bióticos e Abióticos na Associação Cana-de-Açúcar/Bactérias Diazotróficas**

Bactérias endofíticas promotoras de crescimento vegetal associadas à cana-de-açúcar são descritas como responsáveis por importantes contribuições ao desenvolvimento destas plantas. O caráter endofítico destas espécies tem atribuído a estas um maior potencial na associação benéfica com as plantas. Porém, pouco se sabe sobre o comportamento destas espécies na ausência da planta hospedeira (BALDANI et al., 2002).

Bactérias endofíticas têm baixa sobrevivência no solo (BALDANI et al., 1997), embora tenha sido demonstrado que a morte celular é influenciada pelo teor de umidade do solo no momento da inoculação (OLIVEIRA et al., 2004). A população

bacteriana é influenciada também pelo estágio nutricional das plantas e fertilização nitrogenada (FUENTES-RAMIREZ et al., 1999; REIS JR et al., 2000; MUTHUKUMARASAMY et al. 2002). Esta população diminui drasticamente em relação à idade da planta, mesmo desconsiderando o nível de fertilizante nitrogenado, genótipo bacteriano e variedade de cana-de-açúcar (MUNÓZ-ROJAS e CABALLERO-MELLADO, 2003).

Segundo Lingle et al. (2000), quando a cana-de-açúcar é cultivada em solos salinos ou irrigada com águas nestas condições, a produtividade e qualidade do caldo de cana são reduzidas. Já o acúmulo de cloreto de sódio em tecidos destas plantas afeta o metabolismo e fisiologia dos organismos endofíticos resultando em significativa redução de produtividade (CHOWDHURY et al., 1997).

Segundo TEJERA et al. (2006), altas concentrações de aminoácidos no apoplasto de cana-de-açúcar, crescidas em condições de altas doses de nitrogênio fertilizante, podem inibir o processo de FBN. Segundo estes autores, há possibilidades do número de bactérias diazotróficas no apoplasto ser controlado também pelo conteúdo de algum aminoácido. A baixa concentração de aminoácidos na seiva do apoplasto de plantas inoculadas quando comparadas com plantas não inoculadas também ajuda na hipótese de que estes compostos possam estar envolvidos na associação planta/bactéria.

Estes e outros fatores influenciam tanto a FBN quanto a produção de fitormônios. A FBN pode ser influenciada diretamente em maior ou menor intensidade por alguns fatores como: umidade (BODDEY e DÖBEREINER, 1984), disponibilidade de molibdênio (POLIDORO, 2001), variedade das plantas (REIS JR et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2006), aplicação de nitrogênio (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999; REIS JR et al., 2000), tipo de propagação das plantas (OLIVEIRA et al., 2002; CANUTO et al., 2003). Por outro lado, a limitação de fontes de carbono, e consequente redução da taxa de crescimento, podem ser necessárias para biosíntese de AIA em *Azospirillum brasilense*. Tal fato resultaria em algumas implicações como a biosíntese de AIA em *Azospirillum brasilense* ser ativada por fatores de estresse, incluindo estresse de carbono e nitrogênio e a entrada na fase estacionária (ONA et al., 2005).

## 2.5 - Inoculação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Plantas de Cana-de-Açúcar

Uma das possibilidades de introdução de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar é a inoculação de sementes desta cultura. Estudos com este objetivo foram realizados indicando uma viabilidade no estudo da associação de bactérias diazotróficas com estas plantas. Desta forma, a inoculação de sementes de cana-de-açúcar, com bactérias diazotróficas, pode permitir que as plantas geradas possam ser beneficiadas do processo de FBN já que estariam sendo colonizadas por bactérias previamente selecionadas. Em estudos preliminares foi observado por GOI et al. (1998) uma forte influência da inoculação de *G. diazotrophicus* e *Azospirillum lipoferum* no aumento de raízes de plantas de cana-de-açúcar. Posteriormente, SILVA et al. (1999), observaram que a colonização das bactérias em plantas oriundas de sementes ocorreu na rizosfera e também nas células do córtex de raiz na inserção da base do colmo. Posteriormente, foi realizada uma seleção de estirpes de bactérias endofíticas para uso como insumo biológico em plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes (CANUTO et al., 2003).

A inoculação de bactérias diazotróficas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar tem sido realizada com sucesso. Estudos foram realizados visando promover modificações no meio de cultura tradicional MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) para o cultivo de tecidos vegetais, com o objetivo de manter um equilíbrio entre a solução de nutrientes e uma melhor associação planta/bactéria (REIS et al., 1999). O protocolo desenvolvido descreve a inoculação das bactérias ao final do período de enraizamento das plântulas, fase III do processo de micropropagação. O meio MS tradicional foi modificado pela supressão de hormônios ou vitaminas e pelo uso de 1/10 da concentração original de açúcares e minerais. A inoculação de bactérias diretamente no meio de cultura, durante o crescimento e diferenciação dos meristemas modificados, tem favorecido o estabelecimento dessas bactérias. O resultado destes estudos de infecção e colonização das plantas de cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas endofíticas, vem garantindo elevadas populações bacterianas nestas plantas.

Dentre os vários estudos de inoculação de bactérias utilizando esta tecnologia de cultura de tecidos vegetais, podem ser citados os de caracterização ecológica e

ultraestrutural da interação endofítica bactéria/cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1997; OLIVARES, 1997; JAMES e OLIVARES, 1998; SILVA, 2005) e inoculação combinada de bactérias endofíticas e associativas respondendo por 30% do acúmulo de N na planta via FBN (OLIVEIRA et al. 2002).

Outra tecnologia de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar é através da imersão direta de toletes, tratados ou não tratados termicamente, numa solução contendo bactérias. Alguns trabalhos têm sido realizados utilizando esta metodologia, porém há uma grande escassez de resultados com estes estudos. Há muitas dúvidas sobre o efetivo estabelecimento de populações bacterianas selecionadas, principalmente em toletes não tratados termicamente, o que tem dificultado a adoção de protocolos práticos de exploração desta tecnologia.

## **2.6 - Respostas de Cana-de-Açúcar à Inoculação com Bactérias Endofíticas**

Sucessos de 60 a 70% em estudos de inoculação de *Azospirillum* em experimentos de campo têm sido mostrados em diversas plantas de interesse agrícola crescidas em diferentes solos e regiões climáticas, com aumento de produtividade variando de 5 a 30% (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

Em cana-de-açúcar, contribuições da FBN na ordem de 60% têm sido relatadas para algumas variedades brasileiras (URQUIAGA et al., 1992). Outros resultados apresentaram uma incorporação de até 30% de nitrogênio via FBN, quando uma mistura de cinco espécies de bactérias diazotróficas foi inoculada *in vitro* em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002). Plantas inoculadas com mistura bacteriana e crescidas em condições de campo, durante 18 meses, receberam contribuições de 20 a 30% do total de N acumulado em seus tecidos (OLIVEIRA et al., 2003). Outros estudos de quantificação da FBN utilizando a técnica delta  $^{15}\text{N}$  em plantas de cana-de-açúcar, colonizadas naturalmente por bactérias diazotróficas, mostraram contribuições para variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil em torno de 30% (BODDEY et al., 2001). No entanto, estes

valores variaram de 0 a 70% dependendo do nível de molibdênio disponível no solo (POLIDORO, 2001).

MUTHUKUMARASAMY et al. (1999) mostraram um incremento na produção de biomassa e conteúdo de N em folhas de plantas de cana-de-açúcar oriundas de micropropagação e toletes, inoculadas com uma mistura de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *A. lipoferum* e fungo micorrízico. Segundo estes autores, as plantas responderam a esta inoculação de forma similar às que receberam nitrogênio fertilizante em dose equivalente a 275 kg ha<sup>-1</sup>.

Experimentos preliminares de inoculação de *G. diazotrophicus* em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar mostraram aumentos de até 28% no peso da matéria fresca da parte aérea (BALDANI et al., 2000). Resultados bastante promissores também foram obtidos quando plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foram inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) em associação com pequenas doses de nitrogênio (Moraes e TAUKE-TORNISIELO, 1997). Neste trabalho, as plantas inoculadas e adubadas com 50 kg de N.ha<sup>-1</sup> atingiram a mesma produtividade das que receberam dose de N equivalente a 100 kg.ha<sup>-1</sup>.

CANUTO et al. (2003) trabalharam com plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes (híbrido Co421 x SP70-1143) e inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas. Estes autores verificaram uma contribuição da FBN que variou de 8 a 28% e 39 a 52% na nutrição nitrogenada destas plantas, utilizando a técnica de abundância natural de  $\delta^{15}\text{N}$  e as culturas sorgo e *Pennisetum* como planta controle negativo, respectivamente.

A inoculação de *H. seropedicae* (HRC54) e *G. diazotrophicus* (PAL5) na variedade RB72454, estimulou a atividade da H<sup>+</sup> ATPase, provocou mudanças morfológicas radiculares e um incremento de nutrientes na fase inicial do estabelecimento da interação. Neste trabalho, foi observado ainda que a bactéria *H. seropedicae* contribuiu para o incremento da biomassa radicular, área foliar, conteúdo de clorofila e conteúdo de nutrientes (OLIVARES et al., 2002; FERREIRA, 2002).

As contribuições da FBN por bactérias associadas às plantas de cana-de-açúcar são bastante variáveis e dependentes de interações específicas entre

genótipos bacterianos e vegetais (JAMES, 2000). Estas interações possuem um grande potencial de utilização pelos benéficos produzidos (BALDANI et al., 1997).

## **2.7 - Desenvolvimento de um Produto Biotecnológico como Inoculante**

O termo inoculante bacteriano corresponde a toda formulação contendo uma ou mais estirpes (ou espécies) bacterianas benéficas em veículo econômico e de fácil uso, seja este orgânico, inorgânico ou sintetizado a partir de moléculas definidas (BASHAN, 1998). Segundo este mesmo autor, o termo biofertilizante tem sido amplamente utilizado, porém, de forma inadequada em substituição ao termo inóculo bacteriano. Usualmente, o termo biofertilizante se refere às preparações de microrganismos que podem ser parcial ou completamente substituídas por fertilizantes químicos. A razão para o uso do termo biofertilizante pode estar relacionada à maior facilidade de registro para uso comercial, em alguns países (BASHAN, 1998).

O processo tecnológico de desenvolvimento de um inoculante pode ser independente da estirpe bacteriana, pois a maioria delas divide muitas propriedades fisiológicas, dentro da mesma espécie. Assim, uma metodologia definida para uma estirpe particular pode ser adaptada para outra, de mesma espécie, com poucas alterações (FAGES, 1992). No entanto, o mesmo pode não ocorrer para diferentes gêneros bacterianos. Um exemplo disto está relacionado às concentrações de bactérias requeridas, as quais não devem ser padronizadas, pois variam de uma bactéria para outra (BASHAN, 1998).

Dentre as características desejáveis num produto a ser utilizado como inoculante, merecem destaque: i) a presença de características físicas e químicas uniformes; ii) qualidade consistente; iii) afinidade pela água; iv) de fácil produção; v) não apresentar toxidade; vi) ser de fácil manejo e vii) ser biodegradável e não oferecer riscos ambientais, dentre outras (BASHAN, 1998).

Do ponto de vista comercial e agrícola, a longa sobrevivência das bactérias numa formulação inoculante torna este produto mais atrativo. Esta sobrevivência é dependente de diversas variáveis como: i) o meio de cultura utilizado para o crescimento da bactéria; ii) o estado fisiológico da cultura quando da coleta para o preparo do inóculo; iii) o veículo utilizado como carreador; iv) a taxa de desidratação, dentre outras (FAGES, 1990; PAUL et al., 1993).

O veículo e a forma de inoculação de bactérias diazotróficas em plantas têm sido abordados por vários autores, como responsáveis pelas variações na resposta desta inoculação. Alguns estudos mostram aumento de 35% na produção de grãos de trigo usando turfa granulada em comparação com inoculante oleoso, que induziu um aumento de apenas 19% (BALDANI et al., 1983). FALLIK e OKON (1996) obtiveram aumento de 15% na produção de grãos de milho quando usaram turfa granulada em comparação com a pulverização no sulco e semente peletizada, que aumentaram 11 e 3%, respectivamente.

FERREIRA et al. (2003) avaliaram diferentes veículos de inoculação das bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *Burkholderia tropica* em sementes de arroz. Estes autores observaram que as células permaneceram viáveis, mantidas em temperatura em torno de 5 °C, em até 110 dias após a inoculação, na concentração de  $10^8$  células grama<sup>-1</sup> de sementes para os veículos turfoso e oleoso. Em plantas crescidas em condições de campo, e inoculadas com as referidas bactérias, usando o veículo turfoso, estes autores observaram aumentos na produção de grãos na ordem de 38 e 16%, respectivamente.

Sementes de milho recobertas com uma mistura à base de calcário foram inoculadas com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* associada a ácidos húmicos. O recobrimento das sementes não afetou a qualidade fisiológica das sementes inoculadas e armazenadas por até 60 dias em ambiente a 20 °C e 70% de umidade relativa (CONCEIÇÃO, 2007).

Apesar dos diversos experimentos conduzidos no intuito de avaliar os veículos e formas de inoculação de bactérias diazotróficas em plantas, poucas evidências existem na correta e adequada formulação de um inoculante. Da mesma forma, métodos de controle de qualidade para determinar o número de células viáveis neste inoculante não estão estabelecidos, bem como não há um regulamento do nível de contaminação aceitável na formulação de inoculantes (SMITH, 1992).

Apesar deste cenário, muitos fabricantes, de pequeno e médio porte, têm lançado no mercado mundial, nas últimas décadas, produtos como inoculante similares em qualidade e quantidade. Na Itália, Alemanha e Bélgica foi desenvolvido um produto com nome comercial de Zea-Nit<sup>TM</sup>, contendo uma mistura de *A. brasilense* (estirpe Cd) e *A. lipoferum* (estirpe Br17) comercializado nas formas de mistura com vermiculita ou líquida. Segundo os fabricantes, este produto reduziria a aplicação de 30 a 40% do nitrogênio necessário à cultura (OKON e LABANDERA-

GONZALEZ, 1994). Na Argentina foi lançado um produto denominado Graminante<sup>TM</sup> à base de pó de carbonato de cálcio contendo uma mistura de estirpes de *Azospirillum*. Os fabricantes informam que o produto pode aumentar a produção de grãos em cerca de 20% (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

Outros exemplos podem ser citados como: Soil implant<sup>®</sup>, inoculante à base de turfa não estéril (SMITH, 1995); Gold Coat<sup>TM</sup>, inoculante à base de vermiculita (PAAU et al., 1991, citado por BASHAN, 1998); Cell-Tech<sup>®</sup>, inoculante líquido para aplicação na semente de soja e Nitragin<sup>®</sup> Gold, um inoculante à base de solos (SMITH, 1995).

Fortes sugestões são feitas na implantação de agentes fiscalizadores do controle de qualidade dos inoculantes utilizados comercialmente, a exemplo do que existe na Austrália e Uruguai. Desta forma, deve-se manter critérios rigorosos que garantam o uso de estirpes eficientes numa concentração na ordem de  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{10}$  UFC g<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup> e recomendações adequadas para o correto uso pelos agricultores (OKON e ITZIGSOHN, 1995).

Poucos inoculantes comerciais têm sido recomendados para plantas não leguminosas, apesar dos grandes esforços no desenvolvimento destes produtos. No Brasil, a falta de consistência dos dados e investimentos em pesquisas tecnológicas tem dificultado o lançamento de inoculantes comerciais à base de bactérias endofíticas. Diversos efeitos positivos de inoculação destas bactérias em plantas não leguminosas têm sido obtidos, porém, não há um conhecimento sobre a melhor bactéria ou mistura de bactérias responsáveis por este processo biológico. Da mesma forma, é desconhecida a melhor formulação de um inoculante para este fim.

## CAPÍTULO I

### METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR

## RESUMO

Diversos estudos têm mostrado respostas positivas à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em plantas de cana-de-açúcar. Porém, ainda não foi possível estabelecer uma metodologia eficiente que garanta respostas consistentes e resultados reproduzíveis. Os experimentos realizados neste estudo tiveram como objetivos: 1) avaliar os efeitos de fatores relacionados ao protocolo clássico de inoculação de bactérias endofíticas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar; 2) avaliar a concentração de inóculo misto de bactérias endofíticas em toletes de cana-de-açúcar; 3) avaliar métodos de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em toletes, tratados e não tratados termicamente, de plantas de cana-de-açúcar. Para isto, plantas de cana-de-açúcar, variedades RB867515 e RB72454 foram inoculadas com as bactérias endofíticas *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), *Azospirillum amazonense* (CBAmC), *Burkholderia tropica* (PPe8), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) e *H. rubrisubalbicans* (HCC103). Como resultado foi observado que a inoculação simples de bactérias na concentração  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  possibilitou a detecção de um maior número de células cultiváveis e um maior acúmulo de massa seca de raiz e planta total, comparado à inoculação nas demais concentrações. Nas plantas submetidas à inoculação mista não foram detectadas diferenças nas populações bacterianas nas plantas inoculadas sob diferentes concentrações de inóculo. Porém, um maior acúmulo de biomassa foi observado nas plantas inoculadas com a mistura bacteriana nas concentrações  $10^9$  e  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Plantas de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriundas de toletes e inoculadas com a mistura bacteriana na concentração  $10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$  apresentaram acúmulo de biomassa superior às demais plantas inoculadas. Em relação à variedade RB867515, as plantas que apresentaram maior produção de biomassa foram aquelas que receberam o inóculo na concentração  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Em relação aos toletes tratados termicamente, a adição da bactéria diretamente ao substrato possibilitou um maior acúmulo de massa seca de raiz. Plantas inoculadas pelos métodos imersão durante 2, 6 e 12 horas obtiveram um maior acúmulo de massa seca de parte aérea.

**Palavras-chave:** Concentração de inóculo, inoculante, métodos de inoculação.

## ABSTRACT

Various studies had shown the positive effect of the inoculation with diazotrophic bacteria in sugarcane plants. However, there are no available methodologies that ensure consistency and reproducible inoculation responses to plant/bacteria association. The aims of the experiments carried out in this study were: 1) to evaluate the effects of the factors in relation to inoculation protocols of endophytic bacteria in sugarcane plants; 2) to evaluate the concentration of mixed inoculum of endophytic bacteria in sugarcane stalks; 3) to evaluate different delivery method for inoculating bacteria into sugarcane stalks to develop inoculation methodology that shows better responses on sugarcane to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. For these purposes, sugarcane plants, RB867515 and RB72454 varieties, were inoculated with the bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), *Azospirillum amazonense* (CBAmC), *Burkholderia tropica* (PPe8), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) e *H. rubrisubalbicans* (HCC103). As a result, sugarcane plants inoculated with the inoculum concentration  $10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> were benefited, showing a higher number of feasible cells when were transferred to acclimatization. On the other hand, the mixed inoculation did not show differences between populations of inoculated plants by different concentration evaluated. However, a higher biomass production was observed in inoculated plants with mixed cell concentration  $10^9$  and  $10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>. Sugarcane stalks variety RB72454 inoculated with the bacterial mixture, concentration  $10^3$  cel.mL<sup>-1</sup>, showed a higher biomass production. The same was observed when sugarcane stalks, variety RB867515, were inoculated with the bacterial mixture, density  $10^6$  cel.mL<sup>-1</sup>. In relation to delivery methods for introducing diazotrophic bacteria into sugarcane stalk, treated by thermotherapy, was observed that the method substrate drench was responsible for a higher increase on root dry matter. However, sugarcane plants inoculated by the methods stalks dip during 2, 6 and 12 hours showed a higher increase on dry aerial parts biomass.

**Key words:** Inoculum concentration, inoculant, inoculation methods.

## 1 - INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o quarto elemento mais abundante nas plantas, sendo superado apenas pelo carbono, pelo oxigênio e pelo hidrogênio. Ele participa de várias moléculas essenciais para as células, tais como: aminoácidos, proteínas estruturais e enzimáticas, bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios e clorofila, entre outras moléculas. O nitrogênio molecular ( $N_2$ ), apesar de ser o gás mais abundante na atmosfera (78%), não pode ser diretamente utilizado pelas plantas em seu metabolismo por ser uma molécula muito estável e pouco reativa. A maioria das plantas obtém este elemento do solo sob a forma de íon nitrato ( $NO_3^-$ ), havendo algumas que o absorvem sob a forma de íon amônio ( $NH_4^+$ ). O nitrogênio pode ser um nutriente crítico para as plantas porque seu suprimento no solo é limitado e, além disso, ele também é utilizado pelos microrganismos que habitam esse solo.

A adição de fertilizantes químicos no solo constitui a principal forma de aumento da produção de plantas. Entretanto, considera-se que a cana-de-açúcar é pouco responsiva a esta adição de fertilizantes nitrogenados, principalmente em cana planta. No estado do Rio de Janeiro, a aplicação de N-mineral nestas plantas pode variar de 60 a 100 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. Já em São Paulo, as recomendações estão em torno de 40 a 80 kg kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. No entanto, diversos são os riscos desta prática para o meio ambiente como a poluição do solo e água. Outros problemas relacionados à utilização de fertilizantes nitrogenados são os custos energéticos para produção e distribuição destes elementos.

O nitrogênio liberado pelas bactérias diazotróficas endofíticas, associadas às plantas de cana-de-açúcar, é considerado uma alternativa para a redução do uso de fertilizantes químicos nitrogenados. As principais vantagens das bactérias endofíticas, relacionadas à sua localização em tecidos vegetais são competitividade, habilidade de recolonização e liberação de substâncias orgânicas bioativas. A substituição total ou parcial de N-fertilizante pela FBN é uma estratégia que deve ser considerada não só do ponto de vista econômico, mas também pelo significado e importância em termos de preservação ambiental. Desta forma, a FBN constitui um

processo chave para se conseguir altas produções agrícolas reduzindo custos e possibilitando reduzir possíveis desequilíbrios do meio ambiente.

A inoculação destas bactérias em plantas de cana-de-açúcar tem sido feita utilizando única estirpe ou mistura de estirpes e/ou espécies bacterianas diferentes, objetivando a obtenção do melhor microrganismo ou combinação destes no maior desenvolvimento desta cultura. Apesar do sucesso destes experimentos de inoculação, não há um produto tecnológico comercial com esta base bacteriana.

Respostas variadas de plantas à inoculação com bactérias diazotróficas têm sido associadas também ao veículo e forma de inoculação destas bactérias. Diversas formas de inoculação têm sido utilizadas, porém poucos trabalhos têm sido realizados para aperfeiçoar o processo de inoculação. No entanto, métodos como imersão de sementes ou plântulas em cultura microbiana antes do plantio (ISLAM e BORA, 1998), adição da cultura bacteriana diretamente sobre o substrato (CANUTO et al., 2003) ou aplicação foliar (SINGH et al., 1999) têm sido utilizados com frequência. Outras metodologias de inoculação bastante estudadas têm sido as inoculações de bactérias diazotróficas em plântulas micropropagadas (REIS et al., 1999) e colmos (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999) de cana-de-açúcar.

Diversos têm sido os esforços em desenvolver uma metodologia eficiente de inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de cana-de-açúcar, garantindo o estabelecimento destas bactérias em alto número populacional nos tecidos das plantas.

Os objetivos deste trabalho foram: identificar uma concentração bacteriana adequada de inóculo simples ou misto no estabelecimento e promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar micropropagadas e oriundas de toletes; desenvolver uma metodologia que melhor possibilite a infecção e colonização de bactérias endofíticas em plantas de cana-de-açúcar propagadas através de toletes, com possibilidade de redução da demanda de nitrogênio fertilizante e conseqüente aumento de produtividade.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Efeito de Fatores Relacionados ao Protocolo Clássico de Inoculação de Bactérias Endofíticas em Plântulas Micropropagadas de Cana-de-Açúcar

Este grupo de experimentos teve como objetivos obter respostas mais consistentes à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar e aperfeiçoar os efeitos na promoção do crescimento das plantas inoculadas. Este se constituiu de três ensaios independentes.

O protocolo clássico refere-se à metodologia de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar no período de enraizamento destas plântulas, crescidas em meio MS modificado (REIS et al., 1999). A modificação ocorrida no meio se deu pela supressão de hormônios ou vitaminas e uso de 1/10 da concentração de açúcar e sais minerais do meio MS tradicional (MURASHIGE e SKOOG, 1962).

Estes ensaios foram conduzidos em casa de vegetação e as plantas foram crescidas em vasos com substrato comercial Plantmax, capacidade 2 kg. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 6 repetições.

A análise química do substrato utilizado apresentou pH 5,9 e teores de  $\text{Al}^{+3} = 0,0$ ;  $\text{Ca}^{+2} + \text{Mg}^{+2} = 54,0$ ;  $\text{Ca}^{+2} = 56,4$  e  $\text{Mg}^{+2} = 17,4$   $\text{Cmolc.dm}^{-3}$ . Os teores de P e K foram 821 e 975  $\text{mg.dm}^{-3}$ , respectivamente. A análise física do mesmo substrato apresentou teores de umidade (50 – 60%), capacidade de retenção de água (150%) e condutividade elétrica (1.0 – 1.5  $\text{mS.cm}^{-1}$ ).

Plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar da variedade comercial RB867515 foram inoculadas com as bactérias pertencentes às espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) e *Azospirillum amazonense* (CBAmC). As estirpes pertencem à Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia.

Os inóculos foram preparados a partir de colônias isoladas, crescidas em pré-inóculo em 5 mL de meio de cultura líquido DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986). Este pré-inóculo foi utilizado para produzir um volume maior de células (20 mL de meio líquido DYGS), crescidas até atingir uma densidade óptica superior a 1,0

(560nm), significando um número de células superior a  $10^8$  mL<sup>-1</sup>. Estas culturas foram crescidas em condições de 30 °C e 120 rpm.

A partir deste inóculo foram realizados os ajustes do número de células, utilizando câmara de Neubauer, necessários para atender às especificações experimentais determinadas para cada ensaio realizado. Ajustado o número de células no inóculo, 100 µL deste foram adicionados em 50 mL de meio MS modificado, em frascos de vidro (capacidade para 250 mL), contendo, aproximadamente, 5 plântulas por frasco.

Foi realizado um monitoramento da população microbiana no meio MS em condições *in vitro* e contagem da população bacteriana em plantas crescidas em casa de vegetação, aos 60 dias após a inoculação. Nesta ocasião, as plantas foram coletadas e secas em estufa a 60 °C e posteriormente mensurados os acúmulos de massa seca de raiz e parte aérea.

O monitoramento da população microbiana em condições *in vitro* foi realizado durante o período em que as plantas permaneceram nos frascos contendo o meio de cultura 1/10 de MS. A metodologia utilizada foi a contagem de micro-colônia (MILES e MISRA, 1938, citado por BALDANI, 1984), nos intervalos de 2, 4 e 8 dias após a inoculação. Para tal, 1 mL da solução (meio de cultura MS, células bacterianas e exudatos da bactéria e planta) contendo as plantas inoculadas foi utilizado numa diluição seriada de  $10^{-2}$  a  $10^{-9}$ . Alíquotas de 20µL de cada diluição foram adicionadas em três posições em cada quadrante da placa de Petri, contendo o meio de cultura sólido NB (Nutriente Broth).

A contagem das bactérias nas plantas inoculadas foi realizada aos 60 dias após transplante para casa de vegetação, utilizando a técnica Número Mais Provável (NMP) (POCHON e TARDIEUX, 1962). Para tal, foi utilizado 1 grama de raiz lavada com água destilada, cortada em pedaços e macerada em 9 mL de solução salina (1/4 dos sais do meio NFb (TARRAND et al., 1978)). Foi utilizado 1 mL desta solução para a realização das diluições seriadas de  $10^{-2}$  a  $10^{-8}$  em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL foi inoculada em frascos com capacidade para 12 mL, contendo 5 mL dos meios semi-sólidos e semi-seletivos para cada espécie inoculada: LGI-Pcaldo (REIS et al., 1994) para populações de *G. diazotrophicus*, JNFB (BALDANI et al., 1992) para *H. seropedicae* e LGI (BALDANI et al., 1984) para *A. amazonense*. Foram realizadas três repetições de inoculação em meio semi-sólido por diluição e a contagem do número de

microrganismos foi baseada na presença ou ausência de película característica utilizando-se a tabela de McCrady (POCHON e TARDIEUX, 1962).

As amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram preparadas a partir de segmentos de raízes de plântulas de cana-de-açúcar não inoculadas e inoculadas com bactérias diazotróficas endofíticas. Estes segmentos foram fixados em paraformaldeído [4%], glutaraldeído [2,5%] em tampão fostato [0,1 M, pH 6,8]. Em seguida, foram lavados em triplicata em tampão fostato [0,1 M] e pós-fixados com Tetróxido de Ósmio [1%] em tampão fostato [0,1 M] por 30 min. Procedeu-se nova lavagem no mesmo tampão. Logo após, foram desidratados em série acetônica crescente (15, 30, 50, 70, 90, 2x 100% e super seca) e, posteriormente completamente secos pelo ponto crítico do dióxido de carbono no *Critical Point Dryer* (CPD 030, BAL-TEC, Alemanha). Posteriormente, estes segmentos foram metalizados com ouro e observados em microscópio de varredura, modelo DSEM 962 Zeiss.

A determinação da percentagem de freqüência de adesão das bactérias no eixo radicular das plântulas inoculadas, nos diferentes tratamentos, foi realizada por amostragem aleatória utilizando um círculo de 100 µm de diâmetro. Para cada região foram observados até cinco segmentos e um total de 25 observações para compor a relação percentual entre número de observações positivas sobre número total de observações.

### **2.1.1 - Ensaio I: Efeito da concentração de células em inóculo simples**

Neste ensaio foram avaliadas diferentes concentrações de células em inóculo bacteriano simples em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar. As estirpes bacterianas utilizadas foram PAL5, HRC54 e CBAmC.

A partir do inóculo inicial, as concentrações de células bacterianas, para cada estirpe avaliada, foram ajustadas através de câmara de Neubauer para  $10^5$ ,  $10^7$ , e  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>. Tais concentrações foram utilizadas com base na determinação do protocolo clássico de inoculação, descrito anteriormente, que preconiza o uso das culturas bacterianas na concentração de  $10^7$  células mL<sup>-1</sup>. A partir desta concentração, foram adicionadas as concentrações  $10^5$  e  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>. A diluição foi realizada utilizando o meio de cultura DYGS. A população bacteriana inicial no

meio MS foi equivalente a 200,  $2 \cdot 10^4$  e  $2 \cdot 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente para as inoculações nas concentrações de células de inóculo  $10^5$ ,  $10^7$ , e  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

### **2.1.2 - Ensaio II: Efeito da concentração de células em inóculo misto**

Neste ensaio foram avaliadas diferentes concentrações de células em inóculo bacteriano misto em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar. As estirpes bacterianas utilizadas foram PAL5, HRC54 e CBAmC.

Com base nas avaliações do ensaio anterior foi observada uma pequena variação na dinâmica populacional destas bactérias, em função da concentração de células inoculadas. Assim, neste ensaio, foram utilizadas concentrações de células com maior amplitude. Desta forma, a partir do inóculo inicial, as concentrações de células bacterianas, para cada estirpe avaliada, foram ajustadas através de câmara de Neubauer para  $10^3$ ,  $10^6$ , e  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ . A diluição foi realizada utilizando o meio de cultura DYGS. Após este ajuste do número de células, as bactérias foram misturadas, e, 100  $\mu\text{L}$  desta mistura foram adicionados nos frascos com 50 mL de meio MS modificado e as plântulas individualizadas e enraizadas. Desta forma, a população bacteriana inicial no meio MS foi equivalente a 2,  $2 \cdot 10^3$  e  $2 \cdot 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente para as inoculações nas concentrações de células de inóculo  $10^3$ ,  $10^6$ , e  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

### **2.1.3 - Ensaio III: Efeito da inoculação da bactéria *H. seropedicae* HRC54 a partir das fases de crescimento lag, log e estacionária**

Com base nas informações da curva de crescimento da bactéria *H. seropedicae* (HRC54), foi realizado um experimento para avaliar a inoculação desta bactéria, a partir de suas diferentes fases de crescimento (fases lag, log e estacionária), em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar. A concentração de células bacterianas nos diferentes inóculos foi ajustada para  $10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$ , conforme descrito anteriormente.

Para a determinação da curva de crescimento, as células foram crescidas em meio de cultura líquido DYGS como pré-inóculo durante 12 horas. Após este período, o número de células foi ajustado para aproximadamente  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , utilizando câmara de Neubauer. Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  deste pré-inóculo foi

adicionada em tubo de ensaio, capacidade 20 mL, contendo 5 mL do referido meio de cultura do pré-inóculo. Este material foi incubado a 30 °C e 120 rpm. Foram utilizadas 30 repetições. As avaliações consistiram da coleta de cada repetição a cada 2 horas após a inoculação. Nesta ocasião, foi determinada a densidade óptica (436 nm) em espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus (Labsystem Oy, Helsinki, Finlândia) e realizada a contagem do número de células pelo método NMP, conforme descrito no item 2.1.

Na coleta de amostras para a inoculação, foram consideradas como fases de crescimento da bactéria *H. seropedicae* (HRC54): fase lag (tempo 8 horas), fase log (tempo 18 horas) e fase estacionária (tempo 36 horas) (ver anexo).

## **2.2 – Metodologias de Inoculação de Bactérias Endofíticas em Toletes de Cana-de-Açúcar**

### **2.2.1 – Concentração de células bacterianas utilizadas como inóculo misto em toletes de cana-de-açúcar**

Neste experimento foram avaliadas diferentes concentrações de células de bactérias diazotróficas como inóculo misto no estabelecimento endofítico e promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar oriundas de toletes tratados termicamente. As bactérias avaliadas foram *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), *H. rubrisubalbicans* (HCC103), *Azospirillum amazonense* (CBAmC) e *Burkholderia tropica* (PPe8).

Estas bactérias, a partir de colônias isoladas, foram crescidas, separadamente, em meio líquido DYGS e o número de células ajustado em aproximadamente  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>, em câmara de Neubauer. A partir desta concentração bacteriana, foi realizada uma diluição para as concentrações  $10^6$  e  $10^3$  células mL<sup>-1</sup>, utilizando o mesmo meio líquido de cultura. Após o ajuste do número de células destas culturas, foi realizada uma mistura das mesmas para compor o inóculo misto. A inoculação foi realizada por imersão dos mini-toletes na solução bacteriana nas referidas concentrações de células. O tempo de permanência dos mini-toletes em imersão na solução inoculante foi de 2 horas, e em seguida, transferidos para caixas contendo 10 kg de substrato areia e vermiculita na proporção 2:1, autoclavado duas vezes.

Como material propagativo foi utilizado toletes de uma gema (mini-toletes) de cana-de-açúcar, variedades RB72454 e RB867515, fornecidos pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, campus Dr. Leonel Miranda. Estes toletes foram tratados termicamente por imersão em água na temperatura de 50 °C, durante 30 minutos. Este experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, sediada no município de Seropédica-RJ. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial combinando os fatores: 2 variedades e 3 concentrações de inóculo, adicionado do tratamento controle sem adição de bactéria. Foram utilizadas 4 repetições, sendo cada uma composta por 4 plantas por caixa.

A presença das bactérias nestas plantas foi analisada aos 30 dias após a inoculação através da técnica Número Mais Provável, utilizando os meios semi-sólidos e semi-seletivos para cada espécie inoculada: *G. diazotrophicus* (LGI-Pcaldo), *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* (JNFB), *B. tropica* (JMV) e *A. amazonense* (LGI), conforme descrito no item 2.1. Aos 45 dias após a inoculação, as plantas foram coletadas e secas em estufa a 60 °C. Foram mensurados os acúmulos de massa seca de raiz e parte aérea destas plantas.

### **2.2.2 - Diferentes métodos de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em toletes de cana-de-açúcar**

Neste experimento foram avaliados diferentes métodos de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em toletes de cana-de-açúcar, tratados e não tratados termicamente. O objetivo deste experimento foi desenvolver uma metodologia que melhor possibilite uma infecção e colonização das plantas inoculadas, visando a um maior e melhor desenvolvimento destas.

O experimento foi realizado em vasos com substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>, capacidade 3 L, dispostos em casa de vegetação, área experimental da UENF. Foram utilizados toletes de uma gema de cana-de-açúcar, variedade RB72454, procedentes da área experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, campus Dr. Leonel Miranda, cidade de Campos dos Goytacazes. Toletes tratados e não tratados termicamente foram inoculados com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54). Esta bactéria possui marca de resistência natural ao

antibiótico ácido nalidíxico [15 mg. L<sup>-1</sup>]. A bactéria foi crescida em erlenmayer contendo 1,5 L de meio de cultura líquido DYGS e o número de células ajustado para 10<sup>8</sup> células mL<sup>-1</sup>, compondo a solução inoculante para o material vegetal propagativo.

Foram utilizados como métodos de inoculação cinco diferentes tratamentos: 1) Imersão dos toletes na solução inoculante durante 12 horas; 2) Imersão durante 6 horas; 3) Imersão durante 2 horas; 4) Adição da suspensão bacteriana diretamente sobre os toletes e substrato e 5) tratamento controle não inoculado. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, combinando dois fatores: tratamento térmico (2) e métodos de inoculação (5), obtendo um fatorial de 2 x 5 com 6 repetições.

Foi realizada uma contagem da população bacteriana nas plantas inoculadas objetivando confirmar a eficiências dos diferentes métodos de inoculação. Esta contagem foi realizada utilizando a técnica do NMP, descrita no item 2.1. Esta confirmação pode ser obtida devido ao uso da bactéria com resistência ao antibiótico ácido nalidíxico. A contagem em NMP foi realizada aos 30 dias após a inoculação. Foram mensurados os acúmulos de matéria seca de raiz e parte aérea das plantas sob os diferentes tratamentos, aos 90 dias após a inoculação.

### **2.2.3 – Diferentes métodos de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em toletes pré-germinados de cana-de-açúcar**

Este experimento foi conduzido em condições experimentais similares às do experimento anterior. No entanto, com algumas modificações em relação aos tratamentos de inoculação. Neste experimento foram avaliados diferentes métodos de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em toletes pré-germinados de cana-de-açúcar.

Toletes de cana-de-açúcar, variedade RB72454, tratados e não tratados termicamente, foram germinados em bandejas contendo substrato areia e vermiculita, proporção 2:1, com o objetivo de obter mudas para posteriores inoculações com bactérias diazotróficas, obedecendo aos devidos critérios da experimentação.

Foi utilizada a mesma bactéria, crescida em iguais condições às do experimento anterior. No entanto, foram utilizados como métodos de inoculação quatro diferentes tratamentos: 1) Imersão em solução inoculante durante 6 horas; 2) Imersão em solução inoculante durante 2 horas; 3) Aplicação do inóculo sobre as raízes da planta disposta em vaso contendo o substrato, no momento do transplante e 4) Tratamento controle não inoculado. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, combinando dois fatores: tratamento térmico (2) e métodos de inoculação (4), obtendo um fatorial de 2 x 4 com 6 repetições.

Os diferentes métodos de inoculação foram avaliados conforme descrito no experimento anterior. No entanto, estas plantas foram coletadas aos 60 dias após a inoculação. Isto ocorreu devido à inoculação ter sido realizada após a germinação dos mini-toletes.

### **2.3 – Análises Estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas através do programa de análise de variância SisVar (versão 5.0) desenvolvido pelo Prof. Dr. Daniel Furtado Ferreira, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Lavras (UFLA). A normalidade de médias foi realizada aplicando-se o teste de Shapiro Wilk também desenvolvido pelo Prof. Dr. Daniel Furtado Ferreira. Em todas as análises de médias foi aplicado o teste LSD (Least Significant Difference) com nível de significância de 5%.

### 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

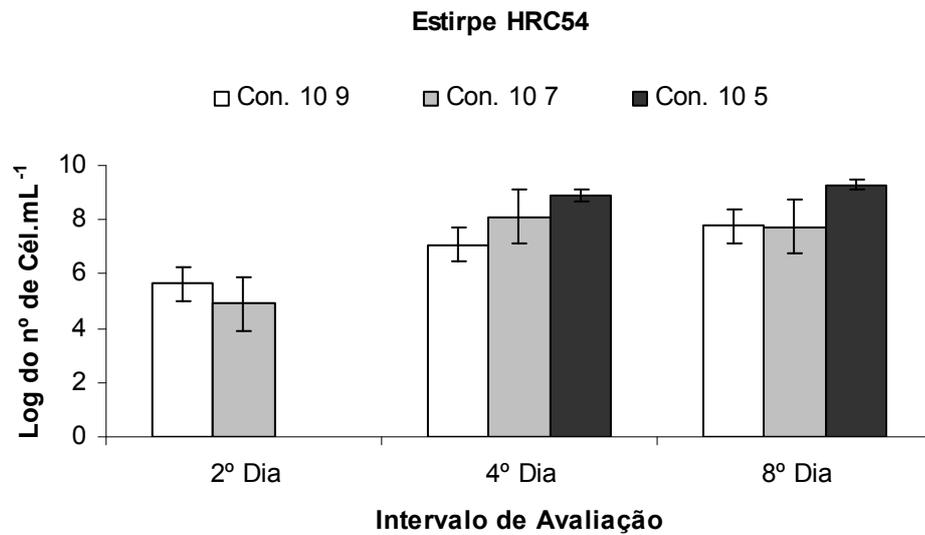
#### 3.1 - Avaliação do Efeito de Fatores Relacionados ao Protocolo Clássico de Inoculação de Bactérias Endofíticas em Plântulas Micropropagadas de Cana-de-Açúcar

##### 3.1.1 - Ensaio I: Efeito da concentração de células em inóculo simples

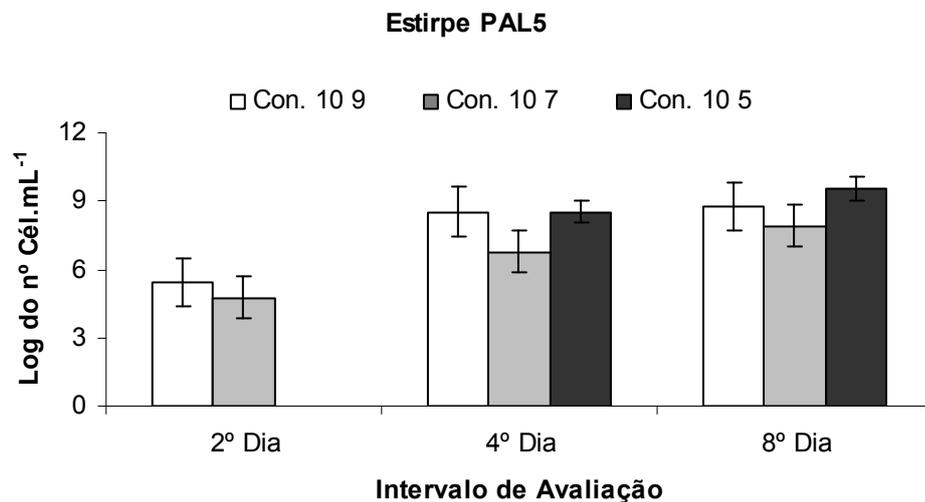
Foi observado um aumento na população da bactéria *H. seropedicae* (HRC54), no meio de cultura MS, em função do tempo. Esta observação foi realizada através da técnica de micro-colônia. No entanto, este aumento foi maior nos tratamentos inoculados com a menor concentração de células. Ao final do período de avaliação (oitavo dia), a maior população de células culturáveis foi observada no tratamento  $10^5$  células mL<sup>-1</sup> (Figura 1). Já os meios inoculados com as concentrações de células  $10^7$  e  $10^9$  células mL<sup>-1</sup> permaneceram com a população de células culturáveis praticamente estável entre o quarto e oitavo dias (Figura 1).

A estirpe PAL5 apresentou população estável no meio MS no quarto e oitavo dias, não diferindo entre as concentrações de inóculo utilizadas (Figura 2). Já a estirpe CBAmC apresentou uma população crescente em função do tempo de avaliação, embora havendo pequena variação no número de células entre as concentrações analisadas (Figura 3). Em todas as estirpes bacterianas analisadas, não foi possível a detecção de células na concentração  $10^5$  células mL<sup>-1</sup> no segundo dia de avaliação. Isto ocorreu devido à baixa diluição do inóculo, a partir da qual foi realizada a inoculação em meio de cultivo semi-sólido para a contagem do número de células pela técnica NMP.

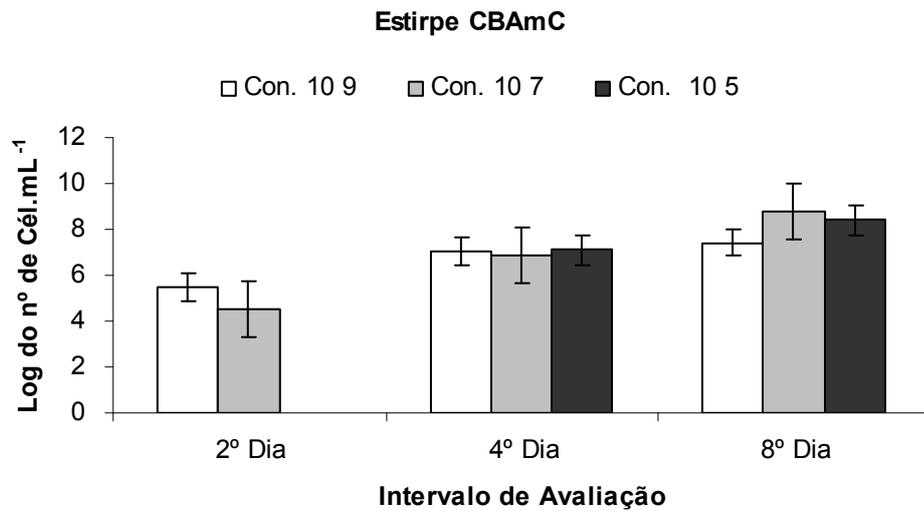
Em função dos dados apresentados acima, foi verificado que a inoculação de células numa menor concentração, já no quarto dia, manifestou populações iguais ou superiores às inoculações com maiores concentrações de células. Isto pode significar população fisiologicamente mais ativa, em oposição à uma proporção da população em fase estacionária nas outras duas concentrações. Isto sugere que a população bacteriana introduzida no meio de cultura em baixas concentrações possibilita alta viabilidade do inóculo no meio MS, no período de transplante das plântulas para as fases de enviveiramento.



**Figura 1:** Número populacional da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) em meio de cultura MS contendo as plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515. Contagem realizada utilizando o método micro-colônia. Avaliação aos 2, 4 e 8 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.



**Figura 2:** Número populacional da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) em meio de cultura MS contendo as plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515. Contagem realizada utilizando o método micro-colônia. Avaliação aos 2, 4 e 8 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.



**Figura 3:** Número populacional da bactéria *Azospirillum amazonense* (CBAmC) em meio de cultura MS contendo as plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515. Contagem realizada utilizando o método micro-colônia. Avaliação aos 2, 4 e 8 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.

A quantificação da população bacteriana no interior das raízes das plantas, avaliada através da técnica do Número Mais Provável, indicou o estabelecimento endofítico efetivo para todos os tratamentos. As maiores populações de bactérias endofíticas foram encontradas em raízes, desinfestadas e não desinfestadas, das plantas que receberam os inóculos com a concentração  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Altas populações foram observadas nas plantas inoculadas com as bactérias em concentrações inferiores (Tabela 1). Desta forma, estes dados apontam uma possibilidade de uso destas bactérias como inóculo em concentrações mais baixas, reduzindo o volume de inóculo inicial a ser produzido, para inoculações em larga escala.

A contagem da população bacteriana realizada em plantas controles, não inoculadas, apresentou populações nativas equivalentes a 2,58 Log. do nº células. $\text{g}^{-1}$  de massa fresca (raízes desinfestadas) e 3,83 Log. do nº células. $\text{g}^{-1}$  de massa fresca (raízes não desinfestadas).

Apesar da técnica NMP ser uma das ferramentas mais utilizadas para a contagem de bactérias endofíticas associadas às plantas, esta técnica apresenta algumas limitações. Seus resultados dependem da culturabilidade do microrganismo e seletividade do meio de cultura utilizado. Os meios de cultura semi-sólidos,

utilizados nestes experimentos, são considerados semi-seletivos para as espécies de bactérias avaliadas. Por outro lado, apesar do material vegetal em avaliação ser oriundo de micropropagação, estas plantas foram crescidas em substrato não estéril e irrigadas com água nas mesmas condições. Devido a isto, o crescimento de microrganismos de outras espécies e/ou da mesma espécie, obtido por colonização natural destas plantas, pode ocorrer com frequência nos meios de cultura utilizados para contagem de população das bactérias inoculadas.

Co-inoculação de fungo micorrízico e bactéria promotora de crescimento vegetal foi realizada por FREY-KLETT et al. (1999). Estes autores observaram maior micorrização em plantas da família Pineaceae ao inocular a bactéria em menor concentração, confirmando que esta bactéria atuou em concentração inferior a  $10^2$  UFC  $g^{-1}$  de solo e seu efeito foi suprimido com o aumento da concentração celular. Estes dados contrastam com a maioria dos resultados obtidos com outras bactérias promotoras de crescimento vegetal, usadas como agentes rizosféricos de biocontrole. Geralmente, a dose mínima recomendada neste tipo de inoculação é de  $10^5$  UFC  $g^{-1}$  de solo para expressar efeitos positivos (BULL et al., 1991). Nestas condições, ao aumentar a dose de inoculação, geralmente aumenta a proteção das plantas. No entanto, em outros estudos de inoculação de PGPR em plantas foram observados efeitos negativos de altas doses de células bacterianas como  $10^8$  UFC  $mL^{-1}$  no crescimento radicular destas plantas (BASHAN, 1986).

**Tabela 1:** Log do número de bactérias diazotróficas presentes em raízes desinfestadas e não desinfestadas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com bactéria endofíticas em diferentes concentrações de inóculo. Avaliação utilizando o método de contagem NMP aos 60 dias após a inoculação.

Estirpes	Log. do nº células.g <sup>-1</sup> de massa fresca (±desvpad)					
	Raízes desinfestadas			Raízes não desinfestadas		
	Concentração do inóculo			Concentração do inóculo		
	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>9</sup>
PAL5	6,62 ± 1,0	6,20 ± 0,1	5,86 ± 0,3	6,97 ± 0,5	7,38 ± 0,3	7,74 ± 0,4
CBAmC	6,41 ± 0,7	6,65 ± 0,2	7,14 ± 0,6	7,30 ± 0,6	6,90 ± 0,3	7,11 ± 0,1
HRC54	5,01 ± 1,0	5,65 ± 0,3	6,17 ± 1,4	7,20 ± 1,3	6,25 ± 0,6	7,69 ± 1,4

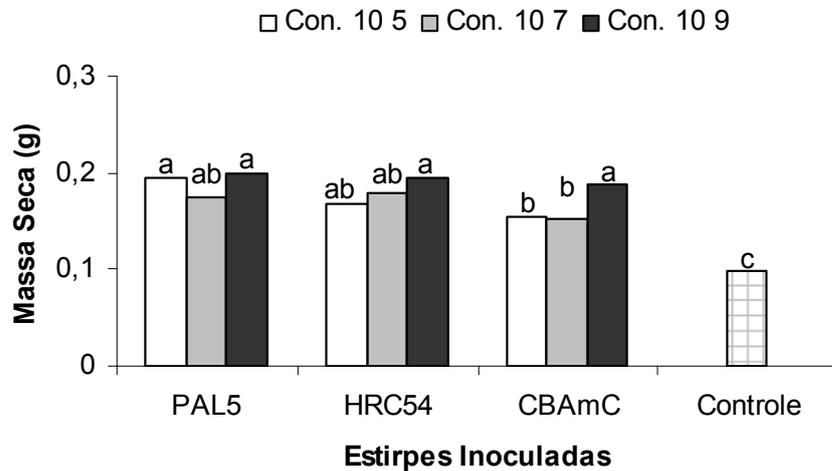
Em relação à produção de biomassa destas plantas, foi observado acúmulo significativo de massa seca de raiz em todas as plantas inoculadas comparadas às plantas controles. Esta produção de biomassa foi similar entre as plantas inoculadas com as estirpes PAL5 e HRC54, em diferentes concentrações de célula. Desta forma, não foi possível obter diferenças na produção de biomassa entre as plantas que receberam inóculo com diferentes concentrações de uma mesma estirpe bacteriana (Figura 4). Para as plantas inoculadas com a bactéria CBAmC, maior acúmulo de massa seca de raiz foi observado em plantas que receberam a bactéria na concentração  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ . As plantas inoculadas com a estirpe HRC54 nas concentrações  $10^5$  e  $10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ , apresentaram acúmulo de biomassa seca de parte aérea e planta total superior às plantas inoculadas com a concentração  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 5 e 6). Por outro lado, não houve diferenças entre as plantas inoculadas com as demais bactérias em suas respectivas concentrações analisadas, comparadas às plantas controle, quando avaliados os acúmulos de massa seca de parte aérea e planta total.

Não houve diferenças no desenvolvimento das plantas quando utilizadas as diferentes concentrações de inóculo para uma mesma bactéria. Entretanto, nas características agronômicas de acúmulo de massa seca de raiz e planta total, estas diferiram em relação ao controle, o que sugere a possibilidade de uso da bactéria numa menor concentração como inóculo. Estas observações podem indicar também que o fator concentração do inóculo, que maximiza a promoção de crescimento, pode ser diferente em função da espécie e da estirpe bacteriana utilizadas.

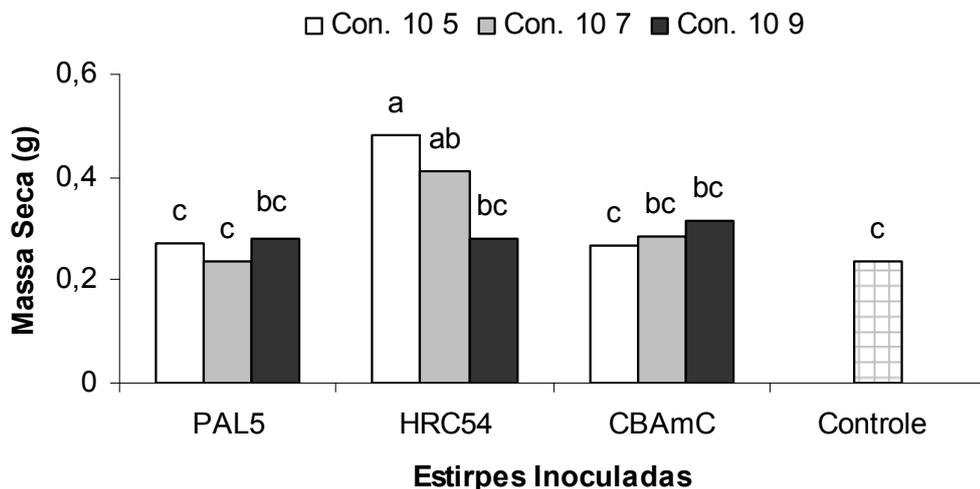
Apesar do assegurado potencial de associação positiva de bactérias endofíticas com plantas de cana-de-açúcar, os resultados de inoculação não têm apresentado muita reprodutibilidade. A bactéria *G. diazotrophicus* pode ser benéfica para o crescimento de cana-de-açúcar, mas esta reposta é dependente tanto do genótipo da bactéria quanto da variedade das plantas (MUNÓZ-ROJAS e CABALLERO-MELLADO, 2003). Outros fatores são conhecidos ou especulados sobre suas influências nesta associação natural, como a qualidade do inóculo, por exemplo. No entanto, há muitas divergências sobre esta qualidade desejada.

Para BASHAN (1998), um inoculante deve conter um nível bacteriano suficiente para colonizar as plantas e garantir ganhos de produtividade, sendo que estes níveis requeridos não podem ser estabelecidos como um padrão, pois variam de uma

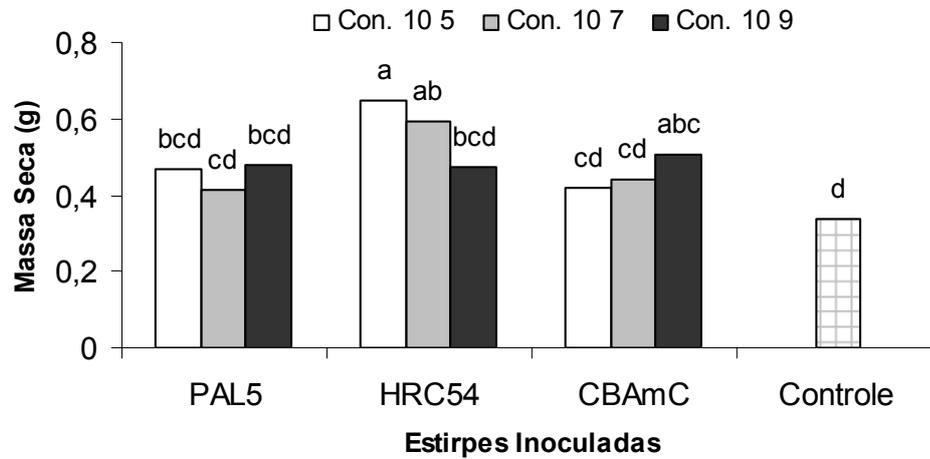
bactéria para outra. Já KENNEDY et al. (2004) consideram fundamental estabelecer um inóculo com número de células viáveis superior a  $10^8$  células mL<sup>-1</sup>.



**Figura 4:** Massa seca de raízes de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com as estirpes bacterianas PAL5, HRC54 e CBAmC. Plantas crescidas em vasos com substrato comercial durante 60 dias. Média de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 18,15%.



**Figura 5:** Massa seca de parte aérea de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com as estirpes bacterianas PAL5, HRC54 e CBAmC. Plantas crescidas em vasos com substrato comercial durante 60 dias. Média de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 33,45%.



**Figura 6:** Massa seca total de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com as estirpes bacterianas PAL5, HRC54 e CBAmC. Plantas crescidas em vasos com substrato comercial durante 60 dias. Média de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 23,48%.

O padrão de colonização do eixo radicular de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas em inoculação simples, foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura aos 8 dias após a inoculação. Segmentos de raízes inoculadas com as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) e *Azospirillum amazonense* (CBAmC), isoladamente, nos três tratamentos de concentração de inóculo ( $10^5$ ,  $10^7$  e  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) foram avaliados quanto ao padrão de adesão e a frequência de observação de “agrupamentos bacterianos”. Estas observações ocorreram nas diferentes regiões anatômicas do eixo radicular (coifa, zona de alongamento/diferenciação e zona de formação de pêlos radiculares/diferenciação). Como resultado foi observado que independente da estirpe e da concentração de inóculo, todas as bactérias colonizaram as diferentes regiões do eixo radicular com frequência de adesão muito similares entre as regiões anatômicas, conforme pode ser notado na Tabela 2.

**Tabela 2:** Avaliação da frequência de bactérias aderidas às diferentes regiões anatômicas da superfície do eixo radicular de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, aos oito dias após a inoculação simples ( $10^5$ ,  $10^7$  e  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>). Os valores expressos em % representam a presença da bactéria no campo de visão em um total de 25 observações.

Zonas Radiculares Bactérias	Concentração do inóculo	Coifa (%)	Zona de alongamento e diferenciação (%)	Zona pilífera e diferenciada (%)
<b><i>H. seropedicae</i></b> <b>HRC54</b>	$10^5$	60	88	92
	$10^7$	60	84	92
	$10^9$	64	96	88
<b><i>G. diazotrophicus</i></b> <b>PAL5</b>	$10^5$	72	88	80
	$10^7$	84	92	80
	$10^9$	84	92	88
<b><i>Azospirillum</i></b> <b>Amazonense CBAmC</b>	$10^5$	76	92	96
	$10^7$	76	80	88
	$10^9$	nd	nd	nd

Nd = não determinado

A frequência de adesão não foi influenciada pela concentração de inóculo nas regiões anatômicas da raiz. Entretanto, a análise estrutural da interação entre as bactérias inoculadas e a superfície da parede periclinal externa radicular revelou diferenças interessantes quanto ao padrão de agregação. A seguir são descritos apenas resultados comparativos para a menor concentração de inóculo (Figura 7) e maior concentração (Figura 8) no tratamento com a bactéria *H. seropedicae* (HRC54). Deve ser ressaltado que as outras estirpes apresentaram perfil de interação similar (dados não mostrados).

Na Figura 7 observa-se por MEV uma visão geral de um segmento do eixo radicular de plântulas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, evidenciando a coifa, a zona de alongamento e diferenciação. Estas foram utilizadas para avaliação da distribuição das bactérias e sua frequência de observação (Figura 7A). Na Figura 7B, uma visão geral de um segmento radicular, evidenciando a região de emissão de raízes laterais, que foi demonstrado ser o principal sítio de infecção para estabelecimento das diferentes bactérias endofíticas associadas às plantas de cana-de-açúcar.

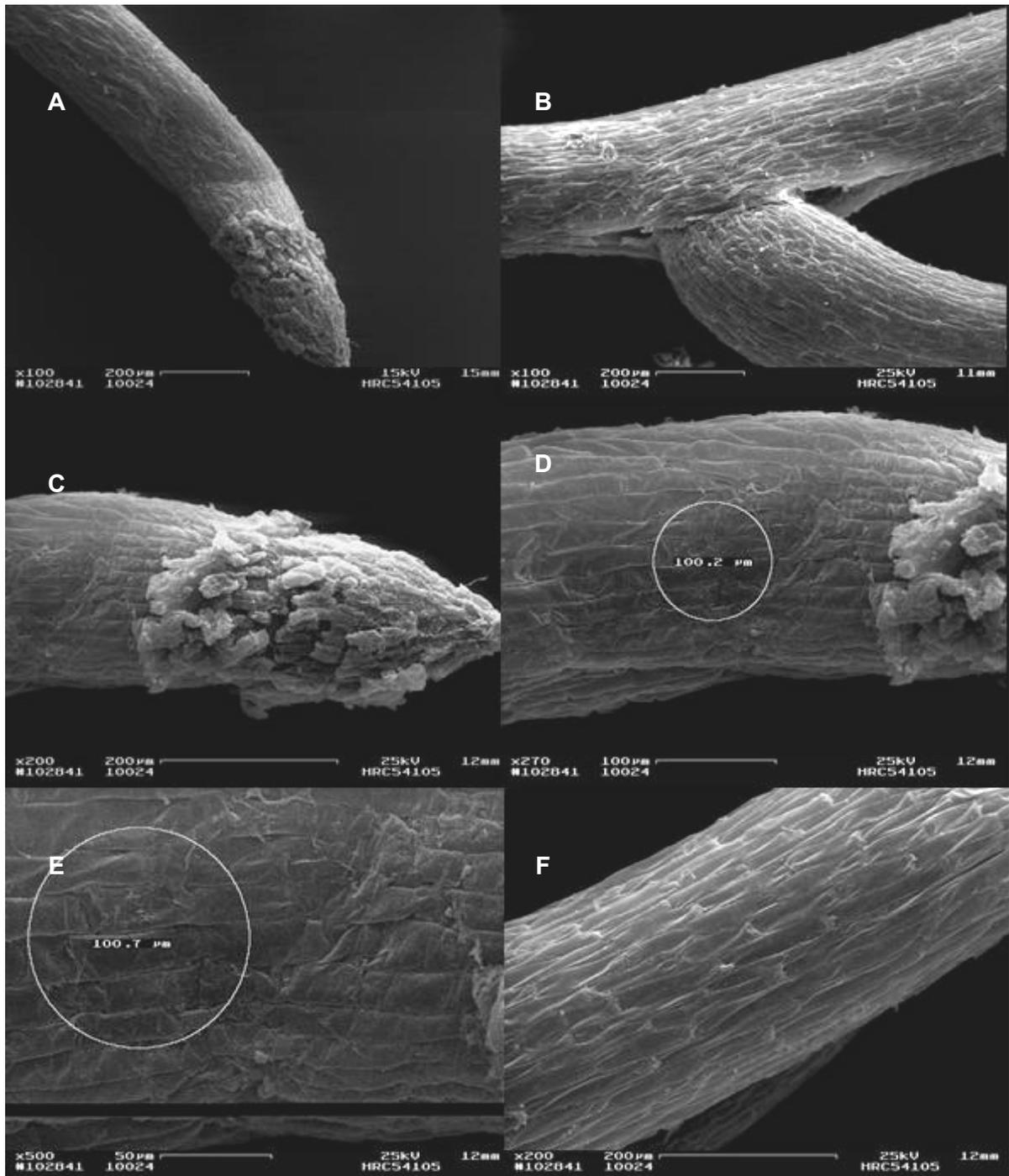
Na Figura 7C, pode-se observar a região da coifa em detalhe. A metodologia para determinação da porcentagem de frequência de adesão pelas diferentes bactérias nos diferentes tratamentos é evidenciada nas Figuras 7D e E. Um segmento de raiz de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, não inoculadas, é apresentado na Figura 7F.

A análise por MEV de segmentos do eixo radicular de plântulas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* (HRC54) na concentração de inóculo de  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  é apresentada na Figura 8. Apesar da concentração de inóculo não influenciar na distribuição de frequência, ou seja, a bactéria colonizou todo o eixo radicular, a despeito das diferenças de até 10.000 células  $\text{mL}^{-1}$  no inóculo, diferenças no padrão de colonização foram observadas. No caso da concentração de inóculo mais baixa ( $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), a bactéria aderiu-se predominantemente à superfície das raízes como células isoladas ou em agregados discretos, através de ataque apolar em monocamada como descrito por OLIVARES (1997). Este padrão de colonização é evidenciado nas diferentes regiões do eixo radicular, por exemplo, na coifa com agregados discretos aderidos às células e associados à mucilagem (Figuras 8A e B).

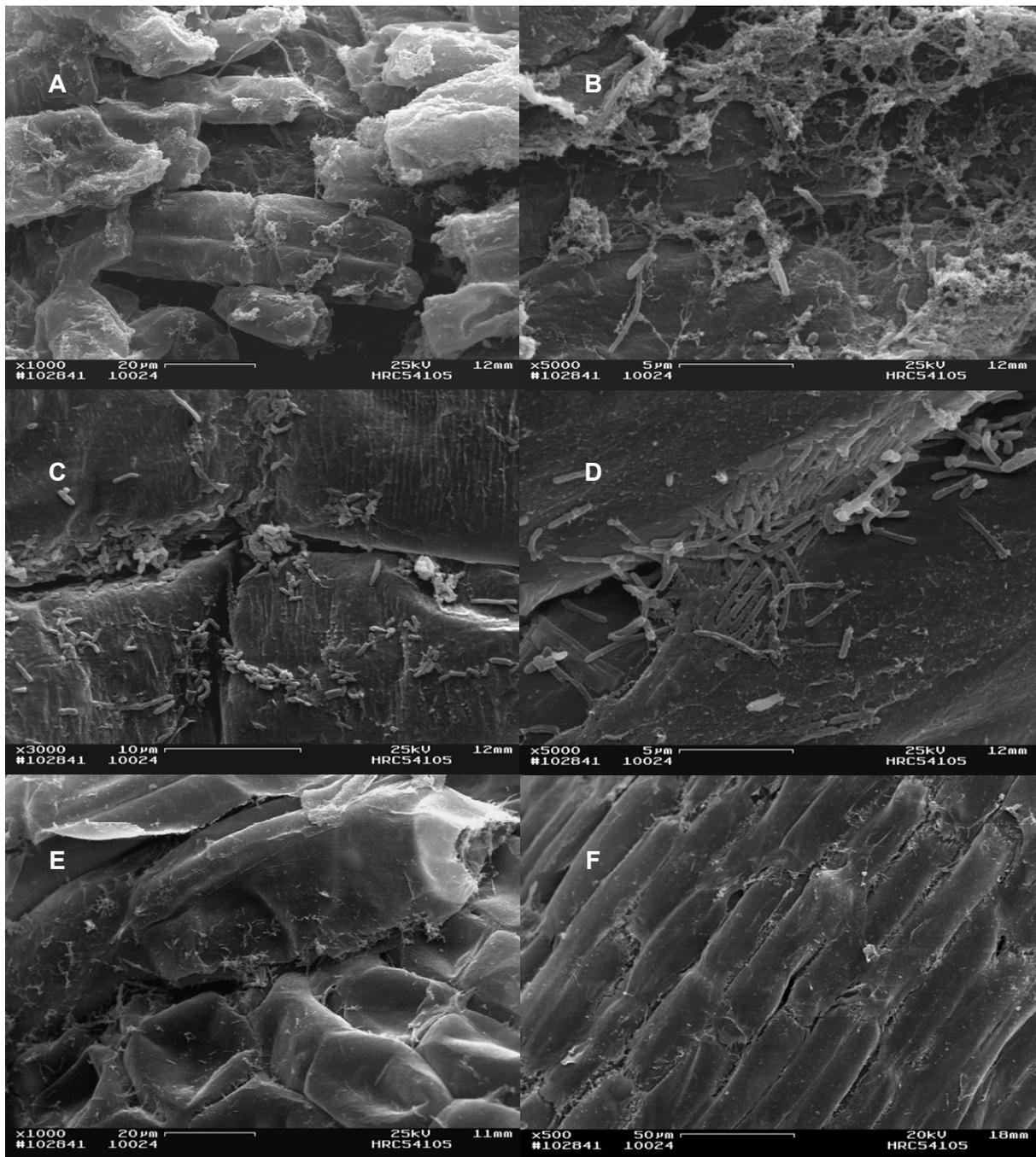
Na região de alongamento/diferenciação, o mesmo padrão predomina manifestado pela colonização preferencial das junções das células epidérmicas (Figuras 8C e D) e na junção da zona de emergência de raízes laterais. Na Figura 8F, é apresentado o padrão de adesão típico para a estirpe HRC54 ( $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) na zona de diferenciação, caracterizado por colonização em monocamada, predominantemente nas junções entre células da epiderme. Este padrão independe da concentração de inóculo, sendo observado também para a mesma estirpe na concentração de inóculo  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ , através da colonização das junções entre células epidérmicas nas paredes anticlinais radiais e transversais, respectivamente (Figuras 9E e 9F).

A análise por MEV de segmentos do eixo radicular de plântulas de cana-de-açúcar variedade RB867515, inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* (HRC54) na concentração de inóculo de  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  é apresentada na Figura 9. Neste caso, embora o padrão de colonização seja bem similar aos tratamentos de menor concentração de inóculo, observou-se um incremento na proporção de macro-agregados distribuídos ao longo das diferentes regiões do eixo radicular, como observado na zona de alongamento e diferenciação (Figuras 9A e B). Este

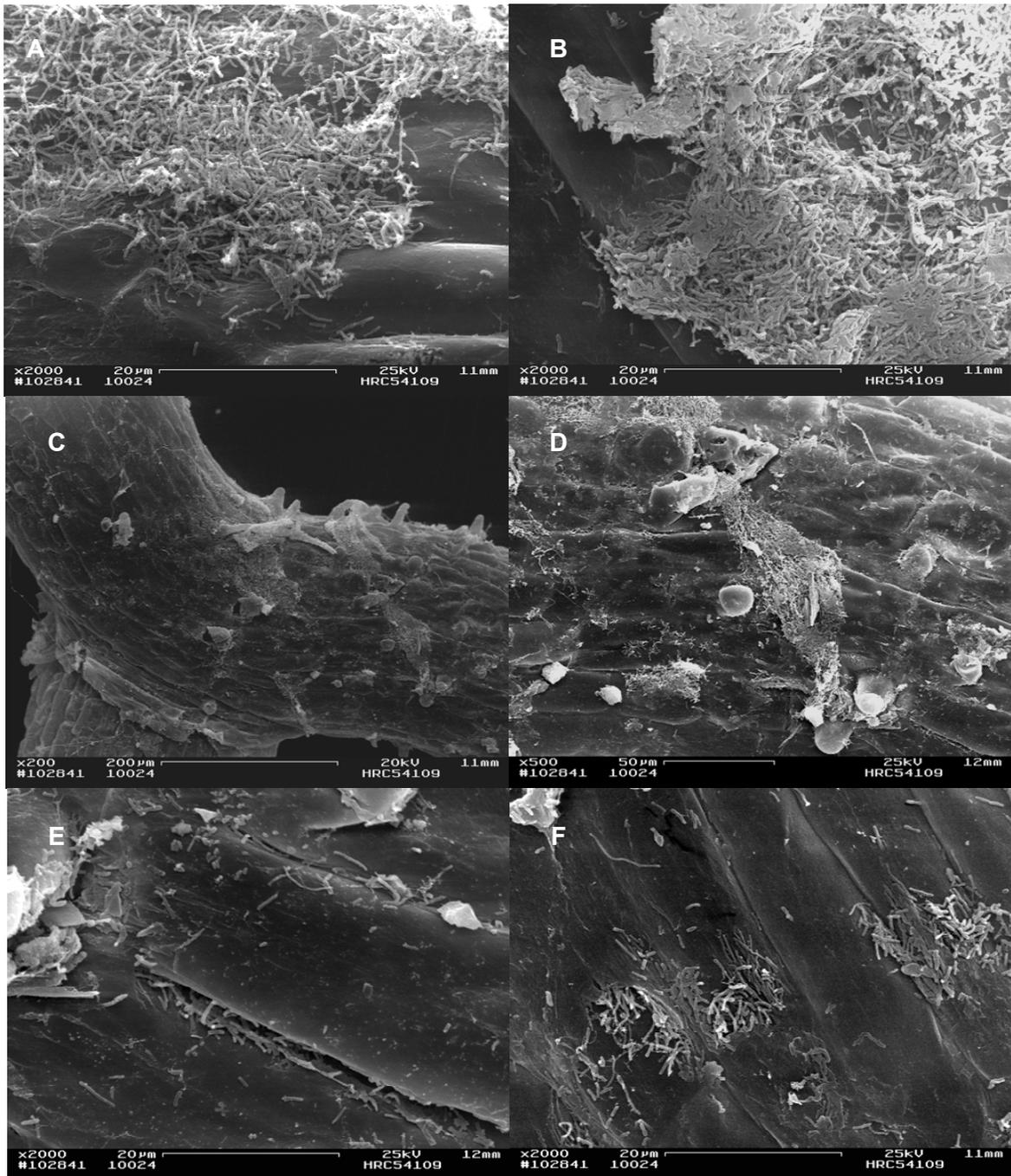
predomínio de macro-agregados bacterianos foi observado na zona de formação de pêlos radiculares. Na região de emergência de um segmento de raiz lateral nota-se um grande número de agregados bacterianos (Figura 9C). Detalhes dos agregados de diferentes tamanhos associados à superfície da epiderme e circunferência de emergência dos pêlos radiculares (Figura 9D). Padrão de colonização predominante das junções entre células epidérmicas nas paredes anticlinais radiais e transversais, respectivamente (Figuras 9E e F).



**Figura 7:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de segmentos do eixo radicular de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas sob diferentes concentrações de inóculo. (A) Visão do eixo radicular evidenciando a coifa, a zona de alongamento e diferenciação; (B) Visão de uma região de emissão de raízes laterais; (C) Detalhe da coifa; (D) Evidência da metodologia utilizada para avaliação da freqüência de adesão da bactéria inoculada em diferentes concentrações, utilizando um círculo amostral de 100 µm de diâmetro; (E) Detalhe da foto em D, com campo de visão na zona de alongamento e diferenciação; (F) Segmento de raiz de planta não inoculada.



**Figura 8:** Microscopia eletrônica de varredura de segmentos do eixo radicular de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* (HRC54) na concentração  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . (A) Agregados discretos aderidos às células na região da coifa; (B) Detalhe da foto A evidenciando células isoladas e pequenos agregados associados à mucilagem; (C) Padrão típico de adesão na concentração de  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ , evidenciando a colonização preferencial das junções das células epidérmicas na zona de alongamento; (D) Detalhe da foto C. Notar bactérias em monocamada nas junções epidérmicas envolvidas por mucilagem; (E) Pequenos agregados colonizando a zona de emergência de raízes laterais; (F) Padrão de adesão típico para a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) na concentração  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  na zona de diferenciação. Notar colonização em monocamada predominantemente nas junções entre células da epiderme.

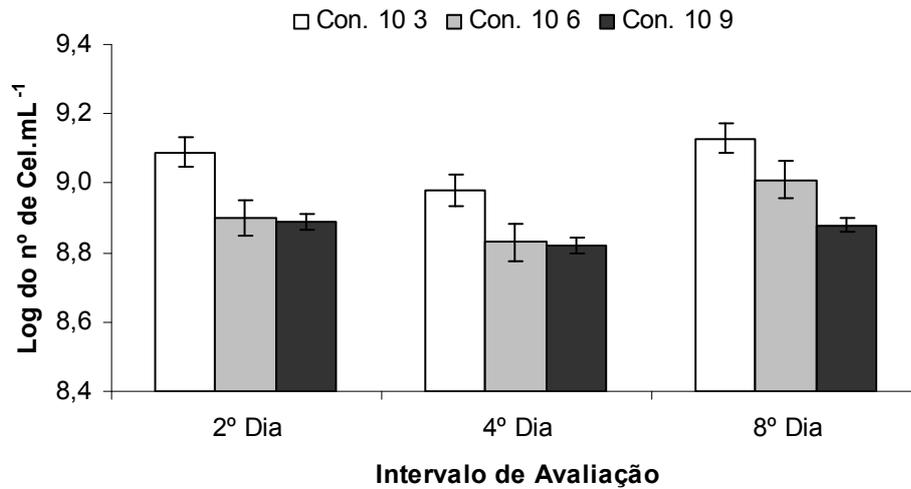


**Figura 9:** Microscopia eletrônica de varredura de segmentos do eixo radicular de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria *H. seropedicae* (HRC54) na concentração de inóculo de  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ . (A) Agregados bacterianos proeminentes associados à zona de alongamento; (B) Agregado bacteriano de grande porte observado com maior frequência no tratamento com maior concentração de inóculo; (C) Visão geral do padrão de colonização na zona de formação de pêlos radiculares, evidenciando a emergência de um segmento de raiz lateral e grande número de agregados bacterianos; (D) Detalhe da foto C. Notar agregados de diferentes tamanhos associados à superfície periclinal externa da raiz e região de emergência dos pêlos radiculares; (E) e (F) Padrão de colonização predominante das junções entre células epidérmicas nas paredes anticlinais radiais e transversais, respectivamente.

### 3.1.2 - Ensaio II: Efeito da concentração de células em inóculo misto

O monitoramento da população microbiana foi realizado através da contagem em micro-colônia a partir de amostras oriundas do meio de cultura MS, inoculado com a mistura das estirpes de bactérias diazotróficas PAL5, HRC54 e CBAmC. O referido meio de cultura, contendo as plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, apresentou maior população de células culturáveis nos meios que receberam as menores concentrações de células bacterianas. Isto foi observado nos três períodos de avaliação deste experimento. A maior população, independentemente da concentração de células inoculadas, foi observada no oitavo dia após a inoculação. Esta maioria populacional foi observada no meio que recebeu a mistura de bactérias na concentração  $10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 10). Não foi observada diferença no número populacional para a inoculação realizada nas concentrações de células  $10^6$  e  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ , especialmente nas primeiras avaliações (2° e 4° dias).

A população microbiana presente em meio de cultura MS contendo as plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar também foi monitorada através de contagem pelo método NMP. Embora nesta contagem, tenham sido utilizados os meios de cultura semi-sólidos e semi-seletivos para as bactérias inoculadas em condições estéreis, não foi possível observar diferenças entre os tratamentos (Tabela 3). Embora não tenha sido objetivo comparar métodos de contagem bacteriana, estas técnicas apresentam poder de detecção e limitações diferenciadas, o que resulta em dados contrastantes. Isto foi confirmado em análises comparativas pelos métodos ELISA e NMP em contagem de bactéria em tecidos de plantas de cana-de-açúcar (SILVA, 1999). Segundo BODDEY et al. (2000), o primeiro método é capaz de detectar número superior de células bacteriana de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae*, de forma que o método de contagem NMP pode subestimar a população de bactérias fixadoras em tecidos das plantas analisadas.



**Figura 10:** Número populacional de bactérias diazotróficas em meio de cultura MS contendo plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com o inóculo misto a partir das estirpes bacterianas PAL5, HRC54 e CBAmC. Número obtido através da contagem em micro-colônia usando o meio de cultura NB sólido. Dados referentes a três repetições para cada diluição.

**Tabela 3:** Número populacional de bactérias diazotróficas em meio de cultura MS contendo as plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com o inóculo misto a partir das estirpes bacterianas PAL5, HRC54 e CBAmC. Contagem realizada através da técnica NMP. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.

Log do nº de Células.g <sup>-1</sup> de massa fresca									
Meios de Cultura	Coleta 2º dia			Coleta 4º dia			Coleta 8º dia		
	Concentração do Inóculo			Concentração do Inóculo			Concentração do Inóculo		
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>9</sup>
LGI-Pc	5,78±0,2	5,97±0,3	5,97±0,3	5,78±0,2	5,97±0,3	5,91±0,2	5,94±0,3	6,24±0,7	5,94±0,3
LGI	5,98±0,3	5,81±0,3	6,14±0,0	5,78±0,2	6,31±0,3	6,43±0,4	5,94±0,3	5,78±0,2	5,78±0,2
JNFb	5,81±0,3	5,41±0,6	5,44±0,4	6,27±0,3	5,97±0,3	5,65±0,0	5,81±0,3	6,64±0,5	6,40±0,3

Apesar de não existir efeito da inoculação mista destas bactérias nas concentrações 10<sup>9</sup> e 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup>, na população bacteriana presente no meio de cultura MS associado às plantas micropropagadas, estes tratamentos de inoculação

promoveram maior acúmulo de biomassa seca em raízes e planta total, quando comparados ao tratamento de concentração  $10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$  e ao controle (Figuras 11 e 12).

Foram encontradas bactérias nos tecidos das plantas micropropagadas e inoculadas aos 60 dias após a inoculação. Apesar de pouco significativa, foi observada diferença no número de células relacionado à concentração do inóculo. Este fato ocorreu nas populações em raiz utilizando os três meios de cultura semi-sólidos utilizados. O mesmo não foi observado em relação à parte aérea, que independentemente do meio semi-sólido utilizado e a concentração de bactéria inoculada, a população bacteriana variou na ordem de 3,17 a 4,52 Log do nº de células por grama de massa fresca (Tabela 4).

A população bacteriana nos tecidos das plantas inoculadas foi considerada muito baixa se comparada à população observada nas plantas inoculadas com inóculo simples. Quando apenas uma estirpe bacteriana foi inoculada, independentemente da concentração do inóculo e das raízes terem sido desinfestadas ou não, a população nas plantas que foram inoculadas com a estirpe PAL5 atingiu valores mínimo e máximo de 5,86 e 7,74 Log do nº de células por grama de massa fresca de raiz, respectivamente (Tabela 1). No caso da inoculação mista das três estirpes, a maior população observada através do meio de cultura semi-sólido LGI-P foi de 5,18 Log do nº de células por grama de massa fresca de raiz (Tabela 4).

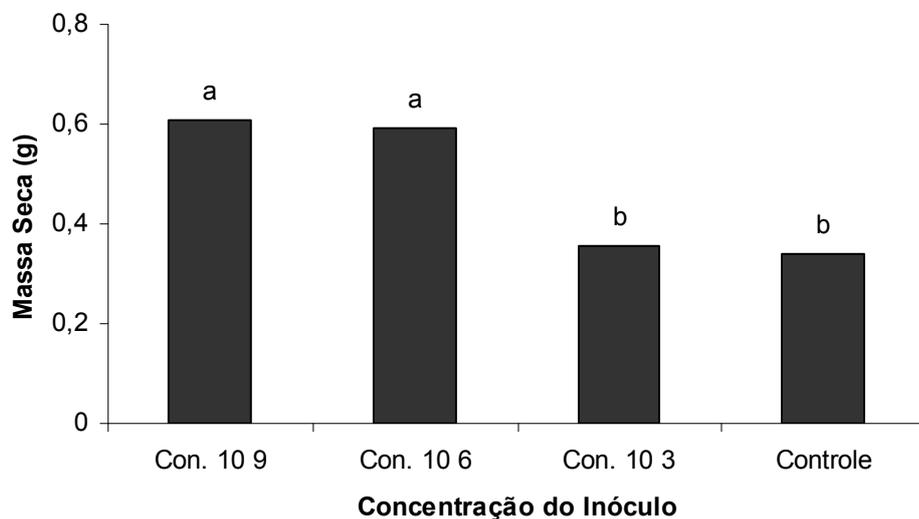
Isto sugere que a inoculação mista promoveu alguma interação entre as bactérias inoculadas e/ou genótipo vegetal, reduzindo o nível populacional individual das bactérias inoculadas. Neste tipo de associação é difícil apontar os efeitos de um fator individual, onde em cada sistema os fatores atuam como interdependentes, não podendo ser avaliados isoladamente (KENNEDY et al., 2004). Segundo estes autores, geralmente, maiores produtividades de plantas representam uma ótima expressão da interação genótipo/ambiente.

QUADT-HALLMANN et al. (1997) observaram menores populações das espécies endofíticas *Enterobacter asburiae* e *Paenibacillus macerans* quando inoculados conjuntamente em algodão, comparadas às populações nas plantas inoculadas com estas estirpes isoladas.

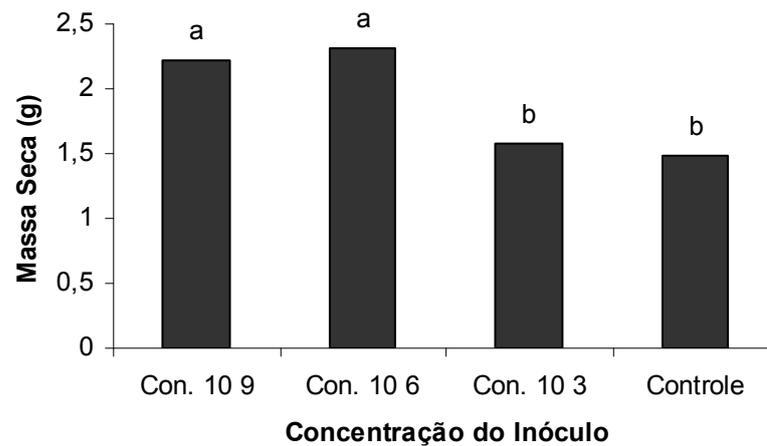
O efeito do genótipo no padrão de colonização, população endofítica total e contribuição da FBN em diferentes variedades de trigo colonizadas com *Azospirillum*

já foram observados no final da década de 1980 por BALDANI et al. (1987). Estes resultados foram confirmados posteriormente por SCHLOTER e HARTMANN (1998), ao observarem diferenças no padrão de colonização em duas variedades de trigo.

OLIVEIRA et al. (2002) observaram uma diminuição da população de bactérias endofíticas em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com uma mistura de cinco espécies de bactérias diazotróficas, aos 45 dias após a inoculação. Isto sugere que a elevada carga bacteriana, no momento da inoculação, pode não ser favorável ao desenvolvimento inicial destas plantas.



**Figura 11:** Massa seca de raízes de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a mistura das estirpes PAL5, HRC54 e CBAmC sob diferentes concentrações de células bacteriana. Coleta realizada aos 60 dias após a inoculação. Dados referentes a 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 18,79%.



**Figura 12:** Massa seca total de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a mistura das estirpes PAL5, HRC54 e CBAmC sob diferentes concentrações de células bacteriana. Coleta realizada aos 60 dias após a inoculação. Dados referentes a 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 22,78%.

**Tabela 4:** População de bactérias diazotróficas em raiz e parte aérea de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com uma mistura das estirpes PAL5, HRC54 e CBAmC sob diferentes concentrações de células bacteriana. Contagem realizada aos 60 dias após a inoculação, através do NMP. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.

Meios de Cultura	Log do nº de Células.g <sup>-1</sup> de massa fresca					
	Raiz			Parte Aérea		
	Concentrações do Inóculo			Concentrações do Inóculo		
	10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>9</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>9</sup>
JNFB	5,18±0,3	5,65±0,0	6,34±0,3	4,21±0,3	4,52±0,5	4,07±0,2
LGI	4,81±0,2	4,97±0,0	5,39±0,0	4,18±0,3	4,02±0,5	3,81±0,2
LGI-Pc	4,97±0,0	4,81±0,2	5,18±0,3	3,17±0,3	3,97±0,0	3,52±0,2

### 3.1.3 - Ensaio III: Efeitos da inoculação da bactéria HRC54 a partir de suas diferentes fases de crescimento

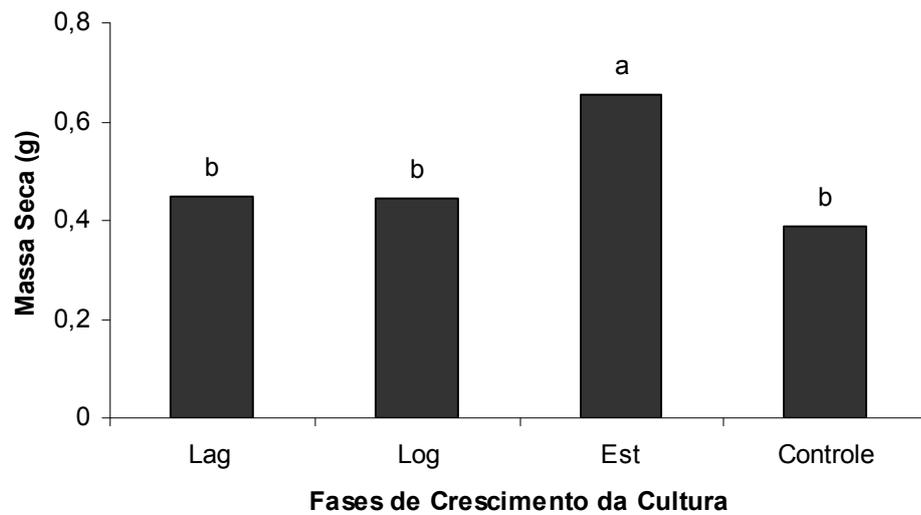
A inoculação da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) a partir de sua fase estacionária de crescimento promoveu maior desenvolvimento das plantas

comparadas àquelas inoculadas com a mesma bactéria a partir de suas fases iniciais de crescimento (lag e log), bem como, comparado às plantas não inoculadas. Tais observações são válidas para as características agrônômicas de acúmulo de massa seca de raiz e parte aérea das plantas inoculadas (Figuras 13 e 14).

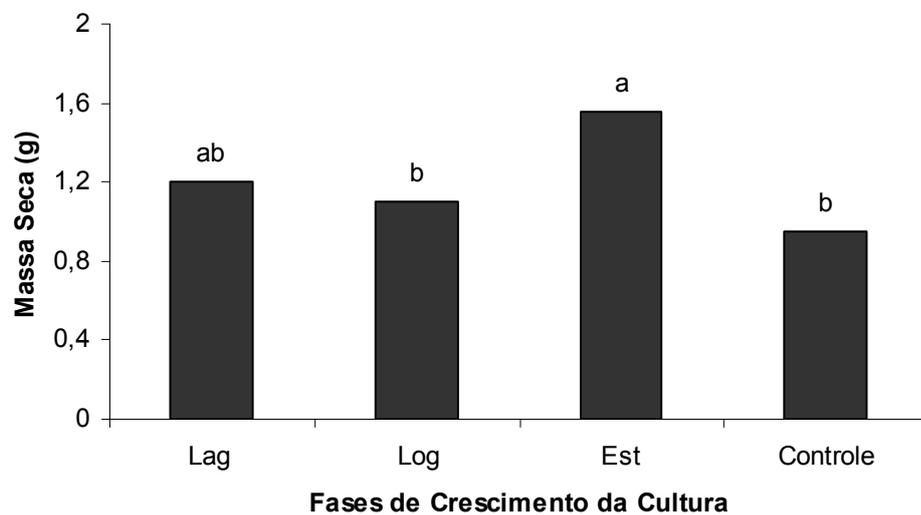
Estes efeitos na promoção de crescimento vegetal, demonstrado pela inoculação de bactérias, podem estar relacionados à síntese de substâncias reguladoras de crescimento, por exemplo. Uma vez que são considerados vários efeitos positivos desta associação planta/bactéria, seja favorecendo a FBN, aumentando a superfície radicular, resistência a fatores bióticos e abióticos, dentre outros.

Os resultados aqui apresentados sugerem que o maior período em que a bactéria permaneceu no meio de cultura de crescimento, até a fase estacionária, possibilitou a síntese ou a maior produção de compostos fitormonais. Isto está de acordo com as observações feitas por TIEN et al. (1979) e ONA et al. (2005) de que a concentração de AIA aumentou com a idade da cultura até alcançar a fase estacionária. Estes mesmos autores observaram que combinações de ácido indol acético, citocininas e giberelinas aplicadas em sementes de *Pennisetum americanum* L. produziram mudanças na morfologia radicular similar às produzidas pela inoculação com *A. brasilense*.

Segundo GLICK et al. (1999), bactérias endofíticas em interação com plantas liberam altos conteúdos de AIA, podendo mudar o balanço local de hormônio endógeno provocando respostas no hospedeiro, as quais dependem da concentração do fitormônio gerado, tipo de hospedeiro e sua sensibilidade ao hormônio.



**Figura 13:** Massa seca de raiz de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria HRC54 a partir de suas fases de crescimento. Coleta realizada aos 60 dias após a inoculação. Dados referentes a 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 24,68%.



**Figura 14:** Massa seca de parte aérea de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria HRC54 a partir de suas fases de crescimento. Coleta realizada aos 60 dias após a inoculação. Dados referentes a 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 17,80%.

### 3.2 – Avaliação da Concentração de Inóculo Misto de Bactérias Endofíticas em Toletes de Cana-de-Açúcar

Aos 45 dias após a inoculação foi realizada a avaliação da população bacteriana nas plantas inoculadas. Foi observada uma pequena variação populacional destas bactérias em raízes das plantas que receberam inóculo misto em diferentes concentrações. Esta variação foi observada na população crescida no meio JNFB a partir de raiz de plantas das variedades RB72454 (Figura 15) e RB867515 (Figura 16). Já em relação à população detectada pelo meio JMV, a partir de raiz das plantas da variedade RB867515, variou de forma inversamente proporcional à concentração de células bacterianas inoculadas (Figura 16).

Este resultado mostra que o estabelecimento endofítico das bactérias foi efetivo para todos os tratamentos, embora não havendo diferenças significativas da população bacteriana nas plantas inoculadas.

Neste experimento, foi observado um efeito da inoculação no acúmulo de massa seca de parte aérea das plantas entre as variedades e dentro das concentrações de inóculo. Entre as variedades, foi observado que a inoculação mista nas concentrações  $10^3$  e  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  realizada nas plantas da variedade RB867515 promoveu um maior acúmulo de massa seca de parte aérea comparado às plantas da variedade RB72454 inoculadas com as mesmas concentrações de inóculo (Tabela 5). Com relação ao efeito da concentração de inóculo, as plantas da variedade RB72454 que receberam o inóculo na concentração  $10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$  tiveram uma promoção de crescimento significativamente superior às demais desta mesma variedade. O mesmo foi observado nas plantas da variedade RB867515, que receberam o inóculo misto na concentração  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  (Tabela 5). Também foi observado, nas duas variedades, que as plantas que receberam maior concentração de células bacteriana ( $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ ), apresentaram um menor acúmulo de massa seca de parte aérea.

Já em relação ao acúmulo de massa seca de raiz, não foi possível observar efeito da inoculação destas bactérias, entre variedades e dentro das concentrações de inóculo, na promoção do crescimento radicular das plantas de ambas as variedades (Tabela 6). No entanto, de forma similar à produção de biomassa de

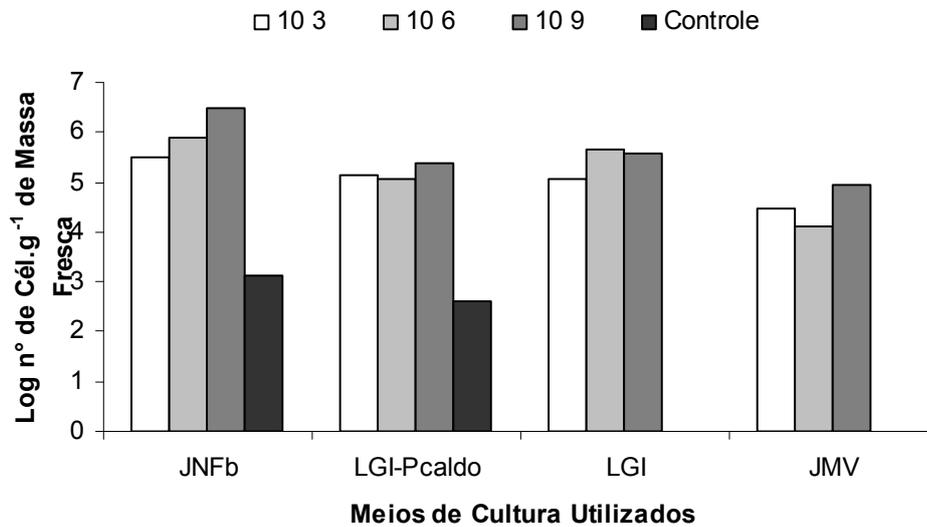
parte aérea, um menor acúmulo de massa seca de raiz foi observado nas plantas que receberam inóculo na concentração  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>.

Estes dados demonstram a eficiência da introdução das espécies de bactérias pela metodologia de inoculação utilizada. Esta observação está de acordo com os resultados obtidos por OLIVEIRA et al. (2006) que observaram viabilidade da inoculação conjunta de cinco espécies de bactérias endofíticas, sendo as mesmas utilizadas neste experimento. Estes autores observaram também a influência do tipo de solo, mistura bacteriana e níveis de nitrogênio na resposta da FBN por duas variedades de cana-de-açúcar oriundas de micropropagação.

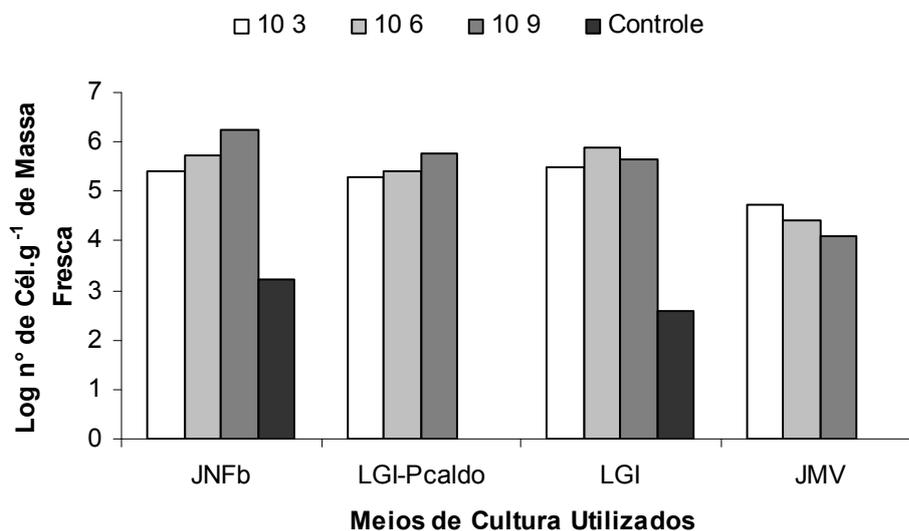
Alguns autores acreditam que devido à grande diversidade de estirpes encontradas naturalmente em rizosfera de plantas, o uso de um inoculante à base de mistura bacteriana pode ser benéfico para o aumento da produtividade, reduzindo a dependência da cultura por fertilizantes nitrogenados. NGUYEN et al. (2002) citado por KENNEDY et al. (2004), obtiveram resultados promissores com a utilização de inoculantes mistos de estirpes selecionadas para diferentes efeitos benéficos como a solubilização de fósforo, produção de fitormônios e FBN. Entretanto, segundo estes autores, nem todos os experimentos conduzidos em casa de vegetação e campo têm demonstrado respostas positivas à este tipo de inoculação, havendo casos em que houve redução no ganho de produtividade das plantas inoculadas.

Incrementos, na produção de biomassa e nitrogênio, em folhas de plantas de cana-de-açúcar oriundas de micropropagação e toletes, foram observados quando inoculadas com bactérias diazotróficas em conjunto com fungos micorrízicos (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999). Esta interação promoveu efeitos sinérgicos no crescimento e incremento do conteúdo de fósforo nas plantas, aumento da infecção do fungo e absorção de nutrientes minerais como fósforo, nitrogênio e zinco (LI et al., 1992; GORI e FAVILLI, 1995). Já a inoculação mista de *Azospirillum* em condições *in vitro* mostrou maior produção de fitormônio (JANZEN et al., 1992), condições mais favoráveis para FBN (HOLGUIN e BASHAN, 1996) e maior eficiência no controle biológico de patógenos (BASHAN, 1998).

Plantas de cana-de-açúcar inoculadas com a mistura das bactérias *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), *H. rubrisubalbicans* (HCC103) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), e posterior inoculação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, apresentaram resistência ao raquitismo da soqueira na variedade Co421, em cana-planta (CARNEIRO JR., 2006).



**Figura 15:** População de bactérias diazotróficas em raiz de plantas de cana-de-açúcar oriundas de toletes, variedade RB72454, que receberam inóculo misto em diferentes concentrações. Contagem realizada através da técnica NMP, aos 45 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.



**Figura 16:** População de bactérias diazotróficas em raiz de plantas de cana-de-açúcar oriundas de toletes, variedade RB867515, que receberam inóculo misto em diferentes concentrações. Contagem realizada através da técnica NMP, aos 45 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.

**Tabela 5:** Acúmulo de massa seca da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar oriundas de toletes, que receberam inóculo misto das estirpes PAL5, HRC54, CBAmC, HCC103 e PPe8, em diferentes concentrações de células.

Tratamentos de Inoculação	Massa Seca Parte Aérea (g)					
	Variedade RB72454			Variedade RB867515		
Conc. Inóculo $10^3$	11,65	a	B	15,13	ab	A
Conc. Inóculo $10^6$	11,09	ab	B	16,43	a	A
Conc. Inóculo $10^9$	7,81	c	A	10,24	c	A
Controle	7,98	bc	B	12,19	bc	A

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Avaliação aos 45 dias após a inoculação. Médias de 4 repetições. cv: 19,19%.

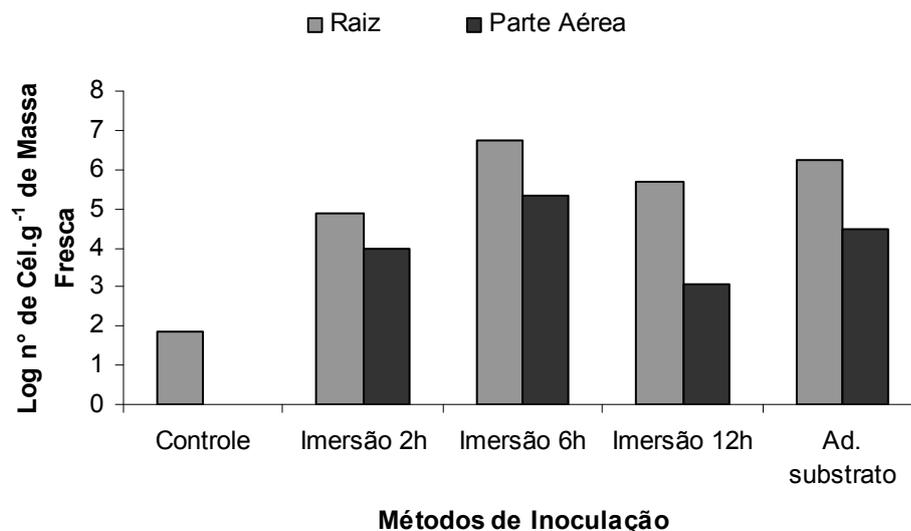
**Tabela 6:** Acúmulo de massa seca de raiz de plantas de cana-de-açúcar oriundas de toletes, que receberam inóculo misto das estirpes PAL5, HRC54, CBAmC, HCC103 e PPe8, em diferentes concentrações de células.

Tratamentos de Inoculação	Massa Seca Raiz (g)					
	Variedade RB72454			Variedade RB867515		
Conc. Inóculo $10^3$	2,19	a	A	2,29	a	A
Conc. Inóculo $10^6$	1,92	a	A	2,30	a	A
Conc. Inóculo $10^9$	1,35	b	A	2,18	a	A
Controle	1,79	ab	A	2,07	a	A

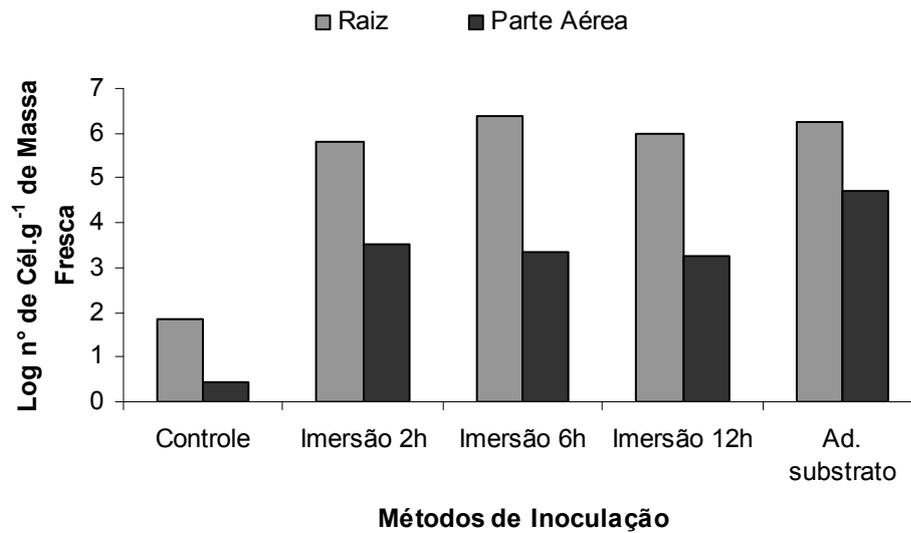
As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Avaliação aos 45 dias após a inoculação. Médias de 4 repetições. cv: 34,13%.

### 3.3 – Avaliação de Métodos de Inoculação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Toletes de Cana-de-Açúcar

A análise do crescimento de bactérias endofíticas demonstrou uma maior população nas plantas submetidas ao método de inoculação por imersão durante 6 horas, seguido da adição do inóculo no substrato. Este maior valor populacional em raízes e parte aérea das plantas oriundas de toletes tratados termicamente (Figura 17). Com relação às plantas oriundas de toletes não tratados, não houve diferença nos números populacionais encontrados nas plantas inoculadas pelos diferentes métodos. No entanto, na parte aérea das plantas que tiveram o inóculo adicionado sobre o substrato foi observado um maior número populacional de células (Figura 18).



**Figura 17:** População de bactérias diazotróficas em raiz e parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriundas de toletes tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação. Contagem realizada aos 30 dias após a inoculação através do NMP. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.



**Figura 18:** População de bactérias diazotróficas em raiz e parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriundas de toletes não tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação. Contagem realizada aos 30 dias após a inoculação através do NMP. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.

Foi observado efeito do tratamento térmico apenas quando o inóculo foi adicionado diretamente sobre o substrato. Assim, foi observado que as plantas oriundas de toletes tratados termicamente apresentaram maior acúmulo de massa seca de raiz, comparadas às plantas que foram inoculadas pelo mesmo método, porém, oriundas de toletes não tratados (Tabela 7). O mesmo foi observado no acúmulo de massa seca de parte aérea das plantas inoculadas pelos métodos de imersão durante 2 e 6 horas, bem como, da adição do inóculo no substrato (Tabela 8).

Apenas o método de adição da bactéria ao substrato possibilitou, às plantas inoculadas e tratadas termicamente, acúmulo de massa seca de raiz significativamente superior às inoculadas pelos demais métodos ou às plantas controles (Tabela 7). Foi observado um maior acúmulo de massa seca de parte aérea nas plantas que tiveram os toletes tratados termicamente e inoculadas por imersão durante 2, 6 e 12 horas. Por outro lado, apenas as plantas oriundas de toletes não tratados termicamente, e inoculadas pelo método de imersão durante 12 horas, apresentaram acúmulo de massa seca de parte aérea superior às plantas controles não inoculadas (Tabela 8).

Em relação à percentagem de nitrogênio total nos tecidos de plantas de cana-de-açúcar oriundas de toletes, foi observado haver efeito do tratamento térmico no acúmulo de nitrogênio nestas plantas. No presente experimento, as plantas tratadas termicamente e inoculadas pelos métodos de imersão durante 2 e 6 horas, apresentaram um maior percentual de nitrogênio total em parte aérea. Com relação aos métodos de inoculação, não houve diferenças entre os mesmos para as plantas oriundas de toletes tratados. No entanto, para as plantas oriundas de toletes não tratados foi observado que os métodos de inoculação referentes a 2 e 12 horas de imersão proporcionaram às plantas um maior acúmulo de nitrogênio total na parte aérea comparados aos demais métodos e às plantas não inoculadas (Tabela 9).

Foi observada uma pequena variação populacional entre as plantas que tiveram os toletes tratados em relação aos não tratados termicamente. Isto pode ter sido observado devido à sensibilidade destas bactérias aos fatores abióticos como temperatura e umidade. Entretanto, estes dados confirmam que a temperatura de 50 °C durante 2 a 3 horas, usualmente usado para controle de patógenos pelos produtores de cana-de-açúcar, não elimina completamente os microrganismos endofíticos (ORTEGA et al., 2001). A inibição parcial da atividade da nitrogenase pelo tratamento térmico (50 °C, 2 h) detectado por ORTEGA et al. (2001), pode ser explicado, em parte, pelo decréscimo da população endofítica.

A variação populacional, entre os tratamentos analisados neste experimento, pode ter sido influenciada pelo substrato utilizado. Conforme já discutido anteriormente, a dinâmica da população de bactérias endofíticas em plantas de cana-de-açúcar tem sido influenciada pelo estado nutricional nitrogenado (REIS JR et al., 2000), tecido vegetal utilizado e idade da planta (FUENTES-RAMIREZ et al., 1999; PERIN, 2003), teor de umidade do solo (OLIVEIRA et al., 2004), bem como se as amostras analisadas são ou não provindas de plantas inoculadas e crescidas em substratos esterilizados (SEVILLA et al., 2001).

**Tabela 7:** Acúmulo de massa seca de raiz de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriunda de toletes, tratados e não tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação.

Métodos de Inoculação	Tratamento Térmico			
	Tratado		Não Tratado	
	Massa Seca Raiz (g)			
Controle	3,369	b A	2,916	a A
Imersão 2 h	3,843	ab A	3,839	a A
Imersão 6 h	4,079	ab A	2,936	a A
Imersão 12 h	4,424	ab A	3,834	a A
Adição no Substrato	4,977	a A	2,793	a B

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Coleta realizada aos 90 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. cv: 25,53%.

**Tabela 8:** Acúmulo de massa seca de parte aérea de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriunda de toletes, tratados e não tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação.

Métodos de Inoculação	Tratamento Térmico			
	Tratado		Não Tratado	
	Massa Seca Parte Aérea (g)			
Controle	19,319	b A	17,918	b A
Imersão 2 h	22,122	a A	19,667	ab B
Imersão 6 h	23,428	a A	18,188	b B
Imersão 12 h	22,938	a A	21,059	a A
Adição no Substrato	21,224	ab A	17,717	b B

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Coleta realizada aos 90 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. cv: 8,01%.

**Tabela 9:** Percentagem de nitrogênio em parte aérea de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriunda de toletes, tratados e não tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação.

Tratamentos de Inoculação	Percentagem de Nitrogênio (%N)					
	Tratamento Térmico					
	Tratado			Não Tratado		
Controle	1,42	ab	A	1,37	c	A
Imersão 2 h	1,38	ab	B	1,59	a	A
Imersão 6 h	1,28	b	B	1,54	ab	A
Imersão 12 h	1,53	a	A	1,42	bc	A
Adição no Substrato	1,35	b	A	1,38	c	A

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Coleta realizada aos 90 dias após a inoculação. Médias de 3 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. cv: 19,17%.

### 3.4 – Avaliação de Métodos de Inoculação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Toletes Pré-Germinados de Cana-de-Açúcar

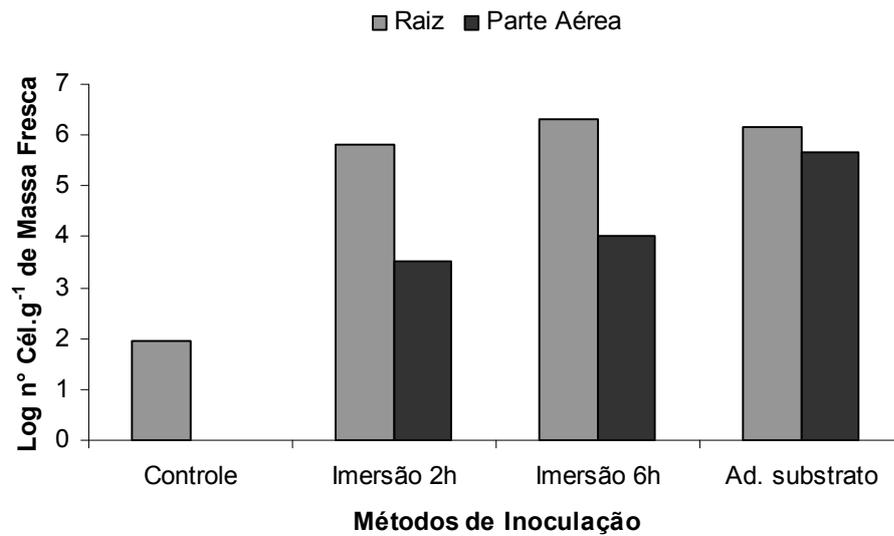
A inoculação de bactérias endofíticas em toletes de cana-de-açúcar pré-germinados, tratados e não tratados termicamente, possibilitou a infecção e colonização destas bactérias nos tecidos de raiz e parte aérea das plantas. Através da contagem pela técnica NMP foi possível observar que a população bacteriana nas raízes das plantas inoculadas não diferiu entre as plantas oriundas de toletes pré-germinados tratados e não tratados termicamente (Figuras 19 e 20). Em relação à população bacteriana na parte aérea destas plantas, foi observado uma maior população nas plantas inoculadas pelo método de adição da bactéria no substrato, seguido dos métodos de inoculação por imersão durante 2 e 6 horas (Figuras 19 e 20).

A avaliação dos métodos de inoculação de bactérias em toletes pré-germinados mostrou não haver efeito do tratamento térmico na promoção do crescimento de raiz e parte aérea das plantas inoculadas pelos métodos analisados

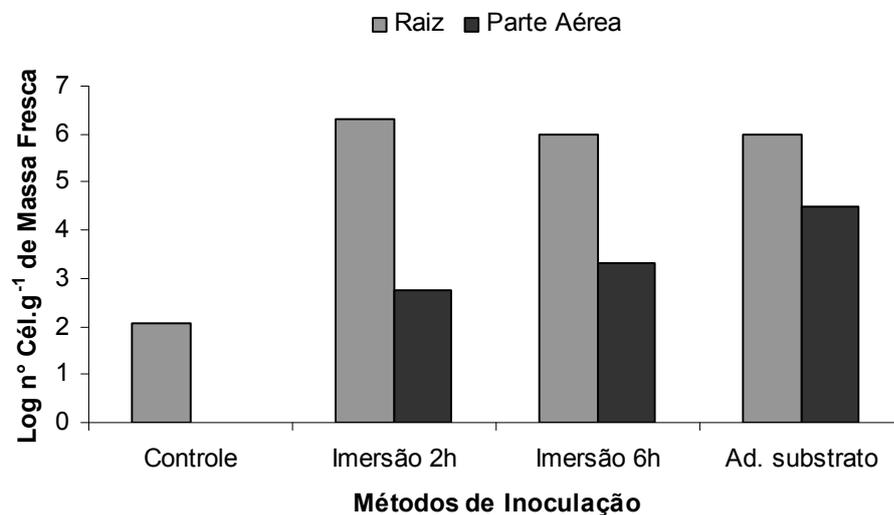
(Tabelas 10 e 11). No entanto, foi observado que as plantas inoculadas pelo método de imersão durante 2 horas, oriundas de toletes tratados e não tratados, apresentaram maior acúmulo de massa seca de raiz em comparação às plantas inoculadas pelos demais métodos e controles não inoculados (Tabela 10).

Em relação à produção de biomassa seca de parte aérea, foi observado que as plantas oriundas de toletes tratados e inoculados pela adição de bactéria no substrato apresentaram uma maior biomassa seca comparado às demais plantas. Nas plantas oriundas de toletes não tratados e inoculados pela adição da bactéria ao substrato e imersão durante 6 horas, apresentaram maior produção de biomassa em parte aérea comparadas aos demais tratamentos (Tabela 11).

A busca por metodologias eficientes de inoculação de bactérias endofíticas em diversas culturas de potencial agrícola tem sido objeto de estudos nos últimos anos. Como exemplo, diferentes métodos de inoculação de bactérias diazotróficas em plantas de milho foram avaliados por BRESSAN e BORGES (2004). Os métodos avaliados foram: sementes tratadas, imersão no inóculo durante 2 horas; corte em 50% das raízes seguida da imersão no inóculo durante 2 minutos; spray foliar, após o transplante, em toda a área foliar; adição de inóculo no solo, 25 mL sobre a semente e sementes tratadas adicionado de 25 mL de inóculo diretamente no solo. Segundo estes autores, todos os métodos foram eficientes na infecção e colonização das raízes das plantas inoculadas. Entretanto, dos 10 isolados bacterianos inoculados, em cada método de inoculação, apenas 4 foram reisolados quando inoculados pelo método de tratamento de sementes. Já em relação à população em parte aérea, não foi reisolada nenhuma bactéria das plantas inoculadas pelo método spray foliar e tratamento de sementes.



**Figura 19:** População de bactérias diazotróficas em raiz e parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriundas de toletes tratados termicamente, pré-germinados e submetidos a diferentes métodos de inoculação. Contagem realizada pelo NMP aos 30 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.



**Figura 20:** População de bactérias diazotróficas em raiz e parte aérea de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriundas de toletes não tratados termicamente, pré-germinados e submetidos a diferentes métodos de inoculação. Contagem realizada pelo NMP aos 30 dias após a inoculação. Dados referentes a 3 repetições para cada diluição.

**Tabela 10:** Acúmulo de massa seca de raiz de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriunda de toletes tratados e não tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação.

Tratamentos de Inoculação	Tratamento Térmico					
	Tratado			Não Tratado		
	Massa Seca Raiz (g)					
Controle	1,90	b	A	1,92	b	A
Imersão 2 h	2,62	a	A	2,76	a	A
Imersão 6 h	2,39	ab	A	2,26	ab	A
Adição no Substrato	2,45	ab	A	2,54	ab	A

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Avaliadas aos 60 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. cv: 18,99%.

**Tabela 11:** Acúmulo de massa seca de parte aérea de cana-de-açúcar, variedade RB72454, oriunda de toletes tratados e não tratados termicamente e submetidos a diferentes métodos de inoculação.

Tratamentos de Inoculação	Tratamento Térmico					
	Tratado			Não Tratado		
	Massa Seca Parte Aérea (g)					
Controle	9,31	b	A	9,58	c	A
Imersão 2 h	10,97	ab	A	10,40	bc	A
Imersão 6 h	10,24	b	A	10,50	ab	A
Adição no Substrato	12,55	a	A	12,33	a	A

As letras maiúsculas separam as médias dentro das linhas e as minúsculas separam as médias dentro de cada coluna. Avaliação aos 60 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. cv: 12,02%.

#### 4 – CONCLUSÕES

- O inóculo bacteriano simples introduzido em diferentes concentrações de células em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, demonstrou que a concentração  $10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$  possibilitou maior número de células culturáveis no meio MS, no período de transplante das plântulas.
- O inóculo bacteriano misto em diferentes concentrações de células e introduzido em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar não apresentou diferenças quanto ao número populacional de bactéria culturável, quando do transplante das plantas.
- As plantas que receberam o inóculo misto das estirpes PAL5, HRC54 e CBAmC, nas concentrações de  $10^9$  e  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ , apresentaram um maior acúmulo de biomassa seca em raízes e planta total.
- A inoculação de *H. seropedicae* estirpe HRC54, a partir de sua fase estacionária de crescimento, promoveu um maior desenvolvimento de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.
- Um maior desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB72454 e oriundas de toletes, foi obtido quando receberam o inóculo misto das estirpes PAL5, HRC54 e CBAmC na concentração  $10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$ .
- Um maior desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar, variedade RB867515 e oriundas de toletes, foi obtido quando receberam o inóculo misto das estirpes PAL5, HRC54 e CBAmC na concentração  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$ .
- A bactéria *H. seropedicae* (HRC54) foi encontrada em maior número populacional em plantas de cana-de-açúcar, variedade RB72454 e oriundas de toletes, inoculadas por imersão durante 6 horas ou adição do inóculo no substrato.

## CAPÍTULO II

### PROSPECÇÃO PRELIMINAR DE SUBSTÂNCIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO SECRETADAS POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

## RESUMO

Bactérias diazotróficas endofíticas têm sido consideradas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). Em plantas de cana-de-açúcar, essas bactérias têm sido responsáveis por parte do aumento na produção de biomassa dessas plantas. Dentre as contribuições estão: a disponibilidade de nitrogênio fixado biologicamente; aumento na disponibilidade de nutrientes na rizosfera; influência positiva na morfologia e crescimento de raízes, dentre outros efeitos benéficos na interação plantas/microrganismos. Este trabalho teve como objetivos identificar e caracterizar substâncias secretadas por bactérias diazotróficas endofíticas em meios de cultura líquido e semi-sólido e avaliar o potencial destas bactérias na promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar micropropagadas e oriundas de sementes. Todas as estirpes de bactérias analisadas secretaram compostos indóis em menor ou maior intensidade, dependendo da concentração de triptofano no meio de cultura. As análises em Cromatografia Gasosa acopladas à Espectrometria de Massa (CG-EM) de substâncias secretadas pela bactéria *G. diazotrophicus* (PAL5) em meio líquido DYGS e LGI-P apresentaram os compostos: ácido indol-3-carboxialdeído, ácido indol-3-acético, ácido indol-3-carboxílico metil éster, indol-5-aldeído e ácido indol acético metil éster. Estas análises realizadas em substâncias secretadas pela bactéria *H. seropedicae* (HRC54) em meio líquido DYGS e JNFB apresentaram os compostos indol-3-carboxialdeído e indol-5-aldeído. Todas as plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes e inoculadas com bactérias endofíticas apresentaram maior acúmulo de biomassa. Ademais, avaliando proteínas secretadas por *H. seropedicae* (HRC54), verificou-se por SDS-PAGE, a presença de 15 a 18 proteínas com massa molecular entre 20 e 210 kDa. Estas proteínas foram secretadas em meio DIGYS líquido e, destas, dez foram avaliadas quanto à sua identidade por espectrometria de massa. Duas proteínas, uma de massa 68 kDa que corresponde a DNA primase de *E.coli*, e outra de massa 27 kDa que corresponde a uma proteína M de *Streptococcus pyogenes* foram identificadas.

**Palavras-chave:** Auxina, inoculação, *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

## ABSTRACT

Endophytic diazotrophic bacteria have been considered as plant growth promoting bacteria (PGPB). These bacteria in association with sugarcane have been responsible for improving biomass production through different modes of action including fixing nitrogen, increasing the availability of nutrients in the rhizosphere, positively influencing on root growth and morphology, and promoting other beneficial plant/microorganism associations. The aims of this work were to identify and characterize released substances from chemically-defined liquid and semi-solid culture media, as well evaluate the bacterial potential on plant growth promotion of sugarcane plants originated from micropropagation and true seed-born. All strains evaluated were able to produce substances like phytohormone depending on concentration of triptofano used as precursor. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) grown on liquid media LGI-P and DYGS and analyzed through GC/MS produced the substances: acid indole-3-carboxaldehyde, acid indole-3-acetic, acid indole-3-carboxylic methyl ester, indole-5-aldehyde and acid indole-3-acetic methyl ester. These analyzes in relation to substances released by *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) grown on liquid media DYGS and JNFB showed the substances acid indole-3-carboxaldehyde and indole-5-aldehyde. All sugarcane plants seed-born and inoculated with endophytic diazotrophic bacteria obtained better growth promotion. Furthermore, evaluating the protein profile of *H. seropedicae* HRC54 we verified the presence of 15 to 18 proteins with molecular weight raging from 20 to 210 KDa, which were secreted on DIGYS liquid medium. Ten of them were evaluated on mass spectroscopy which allows identifying a 68 KDa protein similar to DNA primase from *Escherichia coli*, a 27KDa M protein from *Streptococcus pyogenes* and other unknowing proteins.

**Key words:** Auxin, inoculation, *Herbaspirillum seropedicae* and *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

## 1 – INTRODUÇÃO

A obtenção de efeitos maximizados da associação plantas/bactérias diazotróficas, através de promotores de crescimento de plantas requer estratégias sistemáticas que envolvam os aspectos positivos, possibilitando a manutenção ou aumento de produtividade das plantas, enquanto a aplicação de fertilizantes é reduzida (KENNEDY et al., 2004).

Diversas bactérias diazotróficas apresentam habilidade para a síntese de compostos promotores de crescimento vegetal. O maior número de relatos refere-se à biosíntese do ácido indol acético (AIA) em interação com bactérias associadas a plantas. Este composto estimula a densidade e o comprimento dos pêlos radiculares, a frequência de raízes laterais e o aumento da superfície de raiz. Tais efeitos na morfologia e fisiologia da raiz resultam em aumento de absorção de água e nutrientes, aumentando assim a capacidade da planta de produzir e suportar estresses ambientais (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

A produção de ácido indol acético (AIA) por microrganismos pode variar entre estirpes e espécies de bactérias e depende da variabilidade de substratos. Existem diferentes vias biosintéticas na produção de AIA, sejam dependentes ou independentes do aminoácido triptofano como precursor da reação de síntese. Estas vias podem atuar paralelamente em alguns microrganismos (LEE et al., 2004).

Plantas de cana-de-açúcar, sejam oriundas de sementes ou micropropagadas, são favorecidas pela inoculação de bactérias endofíticas em condições *in vitro*. Estas condições constituem ambientes favoráveis para infecção e colonização destas plantas inoculadas devido à desinfestação de sementes e o processo de cultura de meristemas que possibilitam uma redução da presença de competidores nesta associação planta/bactéria. Desta forma, estudos de promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar obtidas nas condições descritas acima e inoculadas com bactérias endofíticas têm sido realizados com sucesso.

A quantificação de reguladores de crescimento vegetal produzidos por estas bactérias pode ser realizada por algumas metodologias disponíveis, entre eles o método colorimétrico com reagente Salkowisk. Este método baseia-se na oxidação de compostos indólicos por sais férricos, presentes no reagente de Salkowisk.

Assim, a reação de uma solução contendo o padrão AIA com o reagente de Salkowski resulta numa coloração rosa avermelhado, indicativo de uma reação positiva.

Outro método utilizado é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Esta é uma eficiente técnica de separação com alta sensibilidade, podendo ser utilizada para separar e purificar compostos. Já a espectrometria de massas permite a separação de compostos e obtenção de um espectro de massas para cada pico, de forma que o padrão de fragmentação pode ser comparado com aqueles disponíveis na biblioteca de espectros de massas, presentes no equipamento.

Os experimentos descritos neste capítulo tiveram como objetivos: 1) avaliar o potencial de bactérias diazotróficas endofíticas na promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar, micropropagadas e oriundas de sementes; 2) identificar e caracterizar compostos produzidos por estas bactérias em meios de cultura líquido e semi-sólido através do método colorimétrico Salkowisk e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 – Efeito da Composição do Inóculo Bacteriano Sobre a Promoção do Crescimento de Plantas de Cana-de-Açúcar

Plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar da variedade comercial RB867515 foram inoculadas com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) sob diferentes composições do inóculo: i) Bactéria com meio de cultura; ii) Suspensão bacteriana em solução salina; iii) Meio de cultura condicionado (meio de cultura após o crescimento celular, livre de células viáveis) e iv) Controle, sem bactéria.

A inoculação foi realizada conforme descrito no item 2.1 do primeiro capítulo deste documento. Nos tratamentos que receberam células bacterianas, o inóculo continha uma concentração de  $10^7$  células mL<sup>-1</sup>. Após a inoculação, as plântulas permaneceram em condições *in vitro* durante 15 dias e foram posteriormente transferidas para casa de vegetação. Nesta condição, as plantas foram crescidas em vasos com substrato comercial Plantmax, capacidade 2 L, durante 45 dias. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 6 repetições.

As plantas inoculadas neste experimento foram destinadas às avaliações em dois momentos. No primeiro, 15 dias após a inoculação, o efeito da inoculação da bactéria nestas plantas foi avaliado através da contagem do número de sítio mitótico em raiz e mensuração da área e massa radicular das plantas inoculadas. No segundo, as plantas crescidas em casa de vegetação foram avaliadas aos 60 dias após a inoculação através da mensuração do acúmulo de massa seca de raiz e parte aérea.

Para a contagem do número de sítios mitóticos as raízes foram lavadas com água e clareadas em solução de KOH 0,5% durante 20 minutos em banho maria a 75 °C. Decorrido este período de clareamento, as raízes foram lavadas novamente e mantidas no escuro durante 14h para coloração com hematoxilina férrica. Após esse período, as raízes foram novamente lavadas com água e clareadas com ácido láctico 80% durante 30 a 90 segundos em banho a 75 °C. As raízes foram transferidas individualmente para placas de Petri com água destilada e observadas sob uma lupa estereoscópica para contagem do número de sítios de mitose. O estoque de solução

de hematoxilina foi preparado com 1 g de hematoxilina, 0,5 g de sulfato férrico de amônio e 50 mL de ácido acético a 45%. A solução corante estoque foi mantida em ambiente protegido da luz em temperatura ambiente e em sua preparação para uso, diluída em água destilada 40 vezes.

Para a obtenção do comprimento radicular, as raízes foram lavadas e digitalizadas em *scanner* de mesa. As imagens foram analisadas através do software SIARCS® (Sistema Integrado para Análises de Raízes e Cobertura de Solos).

## **2.2 - Produção de Compostos da Classe Indol por Bactérias Diazotróficas Endofíticas Através do Método Colorimétrico Salkowisk**

Neste experimento foi avaliada a capacidade de produção de compostos da classe indol por bactérias diazotróficas endofíticas através da metodologia colorimétrica adaptada a partir de SARWAR e KREMER (1995).

Foram avaliadas 40 estirpes de bactérias: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PPe4, PRJ2, CHCA, 26R-2, PRJ56, 20F-2, AF32, PAL5, PRJ55, PAL3, PSP17, BR11329, 3R-2, 4R-2, 5R-2, PRJ50, 34R-2, CHR e PRJ14), *Herbaspirillum* sp (HRC54, HCC100, Z67, HRC80, 198, HCC101, M4, M5, HRC53, HCC103, HRC51, Z94 e HRC50), *Burkholderia* sp (M130, PPe8, PPe6 e BR3407) e *Azospirillum* sp (Cd, 5SP, CBAmC e Az6). Estas estirpes foram analisadas em condições de crescimento em meio de cultura líquido e semi-sólido. O meio de cultura líquido DYGS foi utilizado para todas as estirpes, diferenciando apenas a fonte de carbono como a supressão do ácido málico para crescimento das estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Já nas condições de avaliação em meio de cultura semi-sólido, foram utilizados os meios: LGI-P para o crescimento de estirpes da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, JNFB para *Herbaspirillum* sp, JMV para *Burkholderia* sp e NFb para *Azospirillum* sp. Em todos estes meios de cultura semi-sólidos foi suprimido o indicador de pH azul de bromotimol.

Colônias puras das referidas bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS como pré-inóculo durante 24 horas. Após este período, foi realizado um ajuste do número de células para  $10^8$  células mL<sup>-1</sup> através de contagem das mesmas em câmara de Neubauer e diluídas em meio líquido DYGS. A inoculação foi realizada utilizando 5 µL do pré-inóculo adicionados em frascos de tubo de ensaio contendo 5

mL de meio líquido ou esta mesma alíquota adicionada em frascos de penicilina, capacidade 12 mL, contendo 5 mL de meio semi-sólido.

Nas duas condições de avaliação foi utilizada a adição de triptofano nas concentrações 0, 100 e 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  filtrado em millipore de malha 0,2  $\mu\text{m}$ . Foram utilizadas 3 repetições para cada estirpe e dose de triptofano. O crescimento das culturas ocorreu em câmara escura com agitação (meio líquido) a 120 rpm durante 72 horas a 30 °C.

A metodologia utilizada para determinação de compostos indóis foi descrita inicialmente por SARWAR e KREMER (1995), modificada por REIS Jr (2002). Para tanto, as culturas crescidas em meio líquido e semi-sólido foram centrifugadas a 7000 rpm durante 5 minutos. Uma alíquota de 150  $\mu\text{L}$  da solução sobrenadante foi aplicada em placa de poliestireno com capacidade de 300  $\mu\text{L}$ , sobre a qual foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Salkowisk (1 mL de  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,5 M em 50 mL de  $\text{HClO}_4$  a 35%). O tempo desta reação foi de 30 minutos em ausência de luz. Ocorrendo reação positiva, foi observada a formação de uma coloração rósea e realizada a leitura de absorvância. O espectrofotômetro utilizado foi Labsystem Multiskan Plus (Labsystem Oy, Helsinki, Finlândia) com filtro de interferência de 492 nm e os dados processados pelo programa Labsystem Transmit Multiskan Plus for Windows.

A análise de compostos, produzidos por bactérias em meio de cultura pode ser realizada de forma rápida e eficiente utilizando o método Salkowisk. Foi utilizada como referência, uma curva padrão determinada previamente a partir do AIA (Merck). As concentrações utilizadas foram: 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 e 400  $\mu\text{M}$ . Assim, as medidas de absorvância das amostras em análise foram comparadas com a referida curva padrão. Como esta curva foi produzida a partir do composto AIA, os resultados são expressos diretamente em unidades equivalentes a  $\mu\text{M}$  de AIA.

## **2.3 - Análise de Compostos Secretados em Meio de Cultura Bacteriano por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)**

### **2.3.1 - Bactérias e meios de cultura utilizados**

As bactérias utilizadas foram *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5). Estas bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS como pré-inóculo (5 mL) durante 24 horas e o número de células ajustado para  $10^8$  células mL<sup>-1</sup> através de contagem em câmara de Neubauer.

Foram utilizados os meios de cultura líquidos DYGS e JNFB para a estirpe HRC54 e os meios líquidos DYGS e LGI-P para a estirpe PAL5. O volume dos respectivos meios de cultura utilizados foi de 1 L em erlenmayer com capacidade de 2 L. A inoculação foi realizada pela adição de 100 µL de cada cultura a partir do pré-inóculo. Foi utilizado como precursor da síntese de reguladores de crescimento, o aminoácido triptofano na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup>. Após a inoculação, os frascos foram incubados em condições de escuro, a 30 °C e sob agitação de 120 rpm durante 72 horas.

### **2.3.2 - Preparo das amostras e extração com solvente**

A metodologia utilizada teve como referência as descritas em BASTIÁN et al. (1998) e MARTINEZ MORALES et al. (2003). Entretanto, vários ajustes foram necessários devido à escassez de informações na descrição desta metodologia, realizada pelos autores acima citados.

As culturas bacterianas em suspensão foram centrifugadas a 15000 rpm, durante 30 minutos a 5 °C. Em seguida, foi ajustado o pH da solução sobrenadante para 3,5. A extração foi realizada em funil de separação utilizando como solvente orgânico o acetato de etila, média polaridade, na proporção 2:1. As soluções obtidas foram destiladas a pressão reduzida em evaporador rotativo automático, fornecendo os extratos brutos.

Foram realizadas extrações utilizando apenas os meios de cultura sem a presença de bactérias, como controle, com o objetivo de análise dos cromatogramas apresentados pelos compostos exclusivos dos respectivos meios de cultura.

### 2.3.3 - Análises Cromatográficas e Espectrométricas

As análises cromatográficas e espectrométricas foram realizadas no Laboratório de Ciências Químicas da UENF.

Foram realizadas análises cromatográficas em camada delgada analítica utilizando cromatofolhas Al com sílica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck. A eluição foi feita com diclorometano/metanol (12%). A presença de substâncias foi verificada pela irradiação ultravioleta a 254 e 365 nm ou pulverizada com o reagente cromatogênico vanilina a 2% em ácido sulfúrico 2N, seguido de aquecimento.

As amostras obtidas das extrações foram diluídas em metanol e analisadas pela injeção direta (1 µL) num Cromatógrafo a Gás CG-17A (SHIMADZU), acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG/EM), GCMS-QP 5050A (SHIMADZU). A coluna utilizada foi a DB-5, J&W Scientific (Folsom, USA), com filme 0,25 µm, cujo comprimento e diâmetro são 30 m e 0,25 mm, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 100 °C chegando a 280 °C numa razão de 15 °C minuto<sup>-1</sup>, permanecendo por 18 minutos nesta última temperatura. A temperatura do injetor foi de 280 °C e da interface entre GC-MS foi de 280 °C. O gás de arraste foi o hélio com fluxo de 1,5 mL minuto<sup>-1</sup>.

### 2.4 - Identificação de Proteínas Secretadas por *Herbaspirillum Seropedicae* (HRC54) em Meio Líquido DYGS

A bactéria *H. seropedicae* (HRC54) foi crescida em meio líquido DYGS (500 mL) durante 48 horas a 32 °C e agitação constante a 120 rpm. Após este período, a cultura bacteriana foi centrifugada a 3.000g durante 30 minutos a 4 °C com o objetivo de separar as bactérias do meio líquido, seguido de filtração em membrana 0,22 µm. As proteínas foram precipitadas com acetona gelada (2h a -20 °C). Em seguida, o material foi centrifugado a 3.000g durante 30 minutos a 4 °C. O *pellet* foi diluído em tampão de amostra para eletroforese 4x concentrado.

As proteínas presentes no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford e aplicadas em gel de acrilamida 12% (SDS-PAGE). O gel contendo as amostras aplicadas foi corado com prata e azul de coomassie. As proteínas separadas no gel SDS-PAGE foram retiradas, descoradas, tripsinizadas e desalinizadas com ZipTips (Eppendorf). Estas proteínas tiveram sua identidade

bioquímica determinada após análise de extratos tripsinizados através de espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF-TOF. Este método utiliza a energia de um feixe de laser para ionizar uma matriz sólida misturada aos fragmentos tripticos ionizando-os. Estes peptídeos ionizados conseguem se deslocar em um tubo de vôo dentro do aparelho e chegam ao detector por ordem de tamanho, sendo os fragmentos mais leves a chegarem primeiro. Esta codição gera um gráfico denominado PMF (Peptide Mass Fingerprint), o qual pode ser utilizado para análise computacional em bancos de dados de proteínas como o MASCOT e o NCBI.

## **2.5 – Solubilização de Fosfatos em Meio de Cultura por Bactérias Endofíticas**

Foram avaliadas 30 estirpes de bactérias: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (CHCA, 26R-2, AF32, PAL5, PAL3, BR11329, 3R-2, 4R-2, PRJ50, 34R-2, CHR e PRJ14), *Herbaspirillum* sp (HRC54, HCC100, Z67, HRC80, 198, HCC101, M5, HRC53, HCC103, HRC51, Z94 e HRC50), *Burkholderia* sp (M130, PPe8, PPe6) e *Azospirillum* sp (5SP, CBAmC e Az6). Estas bactérias foram crescidas, individualmente, em meio líquido DYGS como pré-inóculo. Posteriormente, uma alíquota de 20 µL de cada cultura em suspensão foi adicionada diretamente sobre a superfície de um meio sólido disposto em placa de Petri e contendo, como fonte de fósforo inorgânico, o composto fosfato de cálcio. Este meio de cultura foi desenvolvido por VERMA et al. (2001), de composição (L<sup>-1</sup>): 10g de glicose; 5g de NH<sub>4</sub>Cl; 1g de NaCl; 0,8g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,8g de CaS(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH; 15g de agar. O pH do referido meio foi ajustado em 7,2.

A superfície da placa de Petri foi dividida em seis quadrantes, comportando, portanto, seis isolados por placa. Foram utilizadas três repetições por estirpe de bactéria. Após a aplicação das bactérias, as placas foram incubadas durante cinco dias a 30 °C.

## **2.6 – Bactérias Endofíticas na Promoção de Crescimento de Plantas de Cana-de-Açúcar Oriundas de Sementes**

Foram utilizadas as mesmas estirpes de bactéria avaliadas no experimento de solubilização de fosfatos. Assim, considerando o número de estirpes analisadas, este experimento foi dividido em dois ensaios, em condições *in vitro*.

### **2.6.1 - Desinfestação e pré-germinação das sementes**

As sementes de cana-de-açúcar do cruzamento Co421 x SP70-1143 foram imersas em solução de estreptomicina 0,1%, contendo duas gotas de detergente comercial, agitadas a 100 rpm por 10 minutos. Em seguida, foram lavadas duas vezes em água destilada estéril sob agitação e em solução de HgCl<sub>2</sub> na proporção de 1:1000 por 10 minutos. As sementes foram em seguida lavadas oito vezes em água estéril sob agitação por 3 minutos.

Após a desinfestação, as sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri com meio Agar/água (0,1%) e incubadas a uma temperatura de 30 °C por 72 horas.

### **2.6.2 - Bactérias e inoculação**

As bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS como pré-inóculo e 1 mL desta suspensão bacteriana foi adicionada nos frascos contendo o meio de crescimento para as plantas. A adição da bactéria foi realizada antes de ocorrer a solidificação do meio de cultura.

### **2.6.3 - Meio de cultura para o crescimento das plântulas**

O meio de cultura para o desenvolvimento das plântulas provenientes de sementes foi desenvolvido por SILVA et al., (1998), constituído de ¼ de sais de LGI sem adição de fonte de carbono e indicador de pH, adicionando 5g de Agar por litro e ajustando o pH para 6,0.

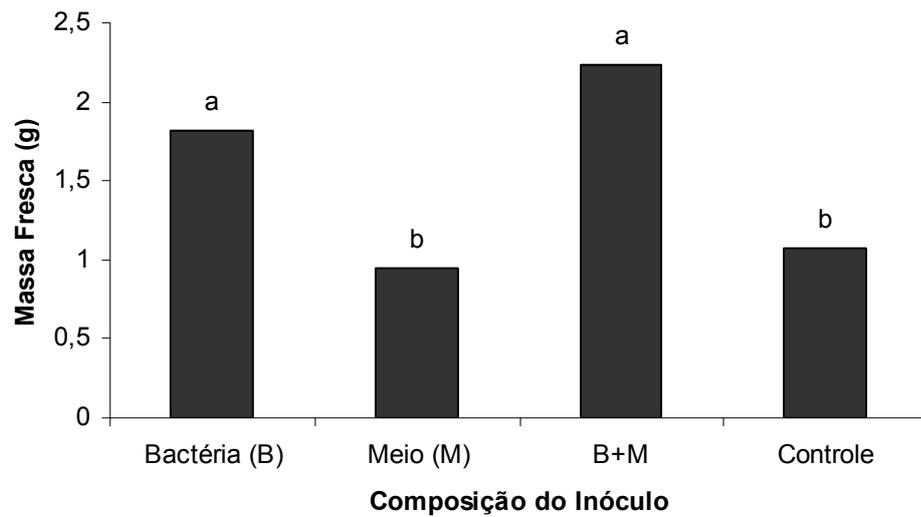
Após a adição das bactérias e solidificação do meio de crescimento, as plântulas de cana-de-açúcar foram transferidas para os tubos onde permaneceram por até 70 dias, dispostos em sala de crescimento sob temperatura e luminosidade controladas. Foram utilizadas 6 repetições para cada estirpe bacteriana e o experimento conduzido em dois ensaios devido ao alto número de estirpes testadas. As avaliações consistiram da medida do acúmulo de massa seca total das plantas.

### 3 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

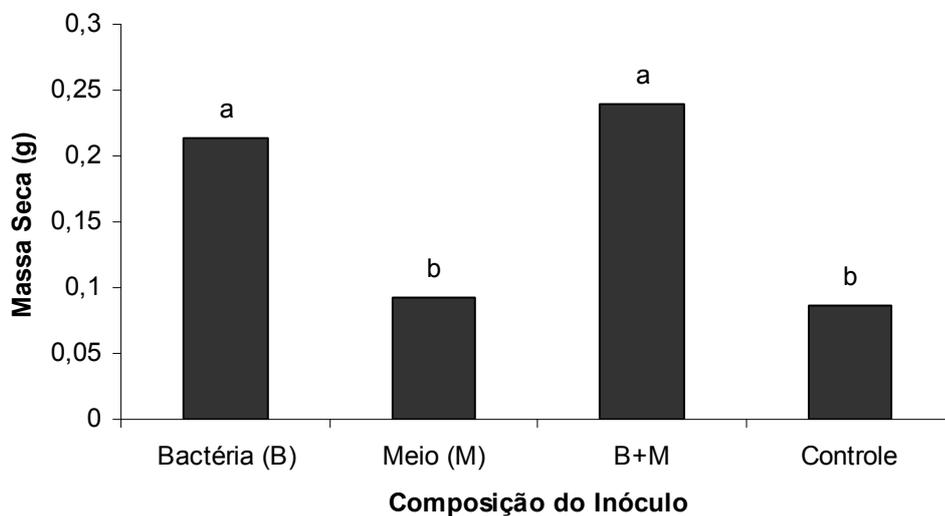
#### 3.1 - Efeito da Composição do Inóculo Bacteriano Sobre a Promoção do Crescimento de Plantas de Cana-de-Açúcar

Houve efeito da inoculação da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), sob diferentes composições de inóculo sobre a promoção do crescimento plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. As avaliações realizadas aos 15 dias após a inoculação mostraram que as plantas que receberam como inóculo células bacterianas suspensas em solução salina (B) e células bacterianas adicionadas do meio de crescimento (B+M) obtiveram um maior crescimento. Isto foi observado através das variáveis analisadas como acúmulo de massa fresca total das plantas (Figura 21), massa seca de parte aérea (Figura 22) e formação de sítios mitóticos (Figura 23). Não foram observadas diferenças no comprimento radicular das plantas inoculadas sob diferentes composições do inóculo (Figura 24).

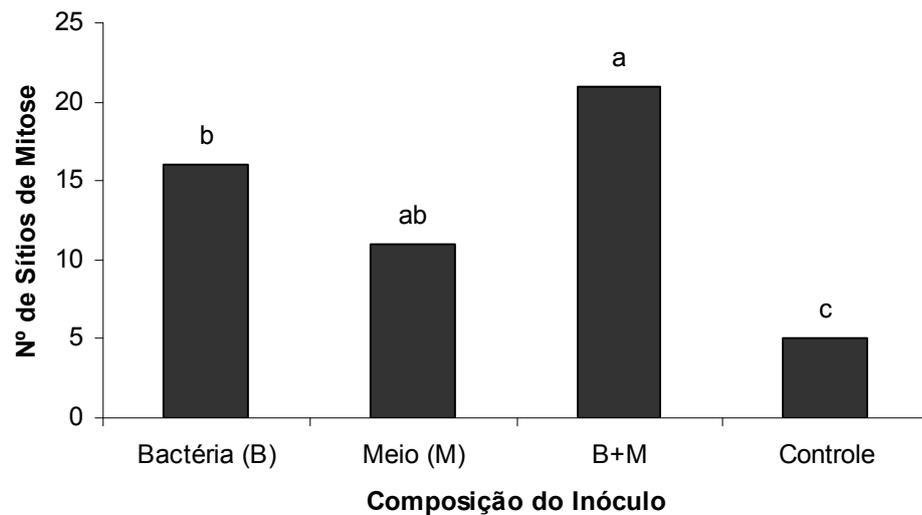
Estes dados mostram que as plantas inoculadas com a estirpe bacteriana HRC54 adicionada do meio de crescimento e ressuspensa em solução salina, apresentaram mudanças no padrão de fasciculação radicular. Este efeito resultou num maior comprimento de raízes totais, bem como incremento no número de sítios formadores de raízes laterais. Isto sugere que, tanto a presença da bactéria quanto as substâncias sintetizadas e liberadas por esta no meio líquido, durante seu crescimento, foram importantes na estimulação do crescimento da planta hospedeira.



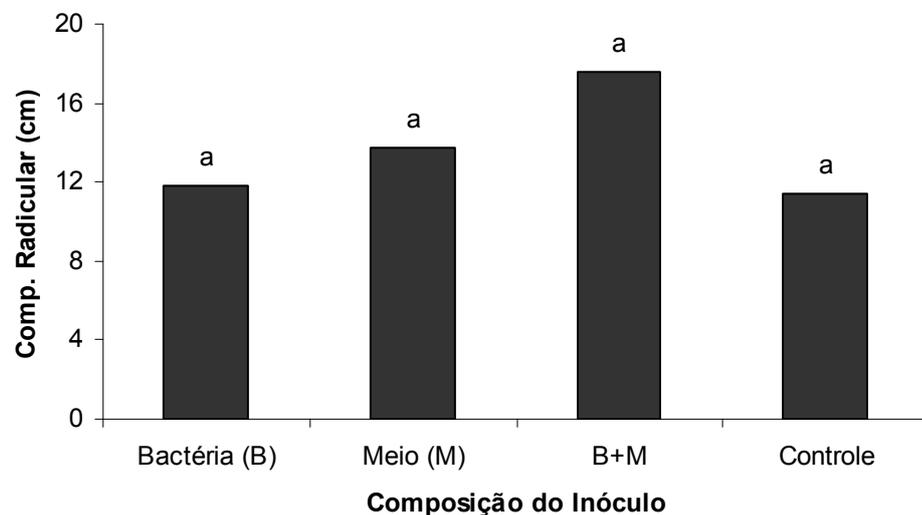
**Figura 21:** Massa fresca total de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) sob diferentes composições do inóculo. Coleta realizada aos 15 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 34,51%.



**Figura 22:** Massa seca de parte aérea de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) sob diferentes composições do inóculo. Coleta realizada aos 15 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 25,07%.



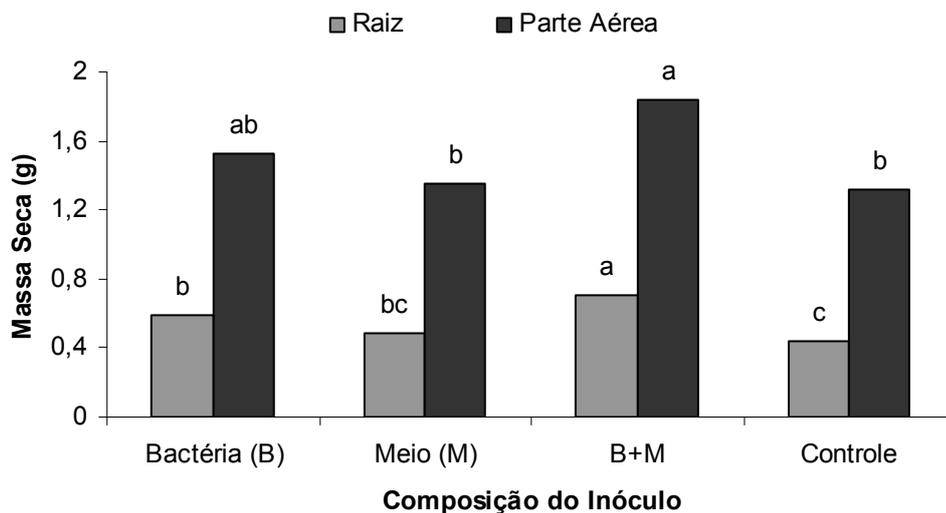
**Figura 23:** Número de sítios de mitose em raízes de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) sob diferentes composições do inóculo. Análises realizadas aos 15 dias após a inoculação. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 20,22%.



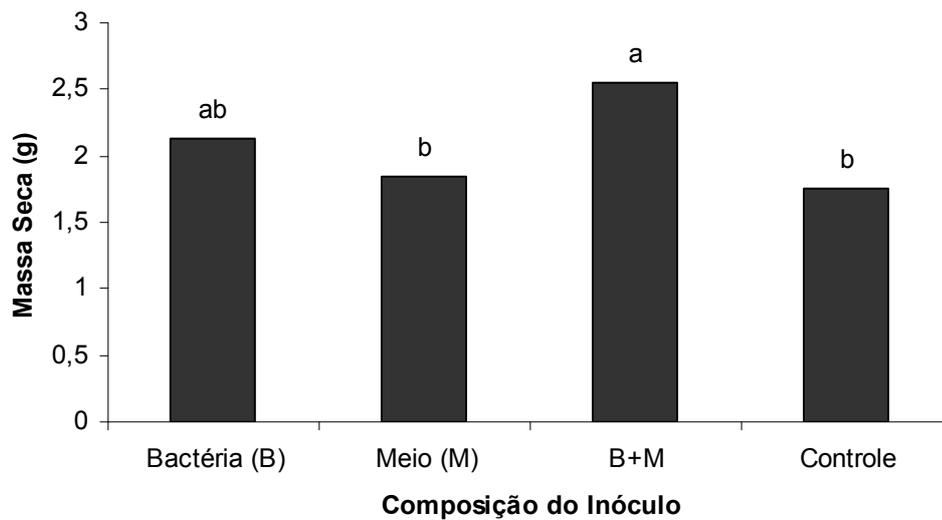
**Figura 24:** Comprimento radicular de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) sob diferentes composições do inóculo. Coleta realizada aos 15 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 43,17%.

Aos 60 dias após a inoculação, as plantas crescidas em casa de vegetação, foram coletadas e avaliadas em relação à produção de biomassa de raiz e parte aérea. As avaliações mostraram que as plantas micropropagadas de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), nas formas (B) e (B+M), tiveram uma maior produção de massa seca de raiz, comparadas aos tratamentos meio de cultura e controle não inoculado. Já em relação ao acúmulo de massa seca de parte aérea, o mesmo foi observado com a referida bactéria na forma de (B+M) (Figura 25). Para as características avaliadas como massa seca de raiz, parte aérea e planta total, as plantas que receberam como inóculo (B+M) apresentaram crescimento superior às que receberam outras fontes de inóculo (Figura 26).

Assim, estas avaliações realizadas com as plantas que permaneceram em casa de vegetação durante 45 dias mostraram que as plantas responderam à inoculação sob diferentes composições de inóculo de forma similar às observadas nas plantas em condições *in vitro*. Isto sugere que algumas substâncias secretadas por estas bactérias em meio líquido possam estar envolvidas num evento morfo-fisiológico que resulte na estimulação do crescimento da planta hospedeira.



**Figura 25:** Massa seca de raízes e parte aérea de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculadas com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) sob diferentes composições do inóculo. Coleta realizada aos 60 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 12,81% (raiz) e 15,57% (parte aérea).



**Figura 26:** Massa seca de planta total de cana-de-açúcar, variedade RB867515, inoculada com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) sob diferentes composições do inóculo. Coleta realizada aos 60 dias após a inoculação. Médias de 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v.: 13,40%.

### 3.2 - Produção de Compostos da Classe Indol por Bactérias Diazotróficas Endofíticas Através do Método Colorimétrico Salkowisk

Neste experimento todas as estirpes de bactérias analisadas apresentaram a capacidade para síntese destes compostos, em menor ou maior intensidade, quando o triptofano foi utilizado como precursor da síntese dos mesmos. Nas condições estudadas neste experimento, os valores obtidos de produção de compostos indóis estão diretamente relacionados com a dose de triptofano presente no meio de cultura. As maiores taxas de produção foram observadas nos meios de cultura acrescidos de  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de triptofano. A exceção foi observada nas estirpes HCC100, HRC80, Z67 e CBAmC, quando crescidas em meio de cultura com a concentração de triptofano equivalente a  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , que apresentaram maior produção de compostos indóis (Tabela 12). Da mesma forma, as maiores concentrações dos compostos obtidos estiveram associadas às estirpes de bactérias da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus*, tanto em meio de cultura líquido quanto em meio semi-sólido.

Das estirpes analisadas, foram destacados quatro representantes para cada grupo considerado como de maior, médio e menor potencial de produção de substâncias reguladoras de crescimento. Quando estas análises foram realizadas utilizando as bactérias crescidas em meio líquido, foi observada maior produção destas substâncias pelas estirpes 3R-2, CHR, 4R-2 e PSP17. Valores intermediários foram obtidos com as estirpes PRJ55, HRC54, PAL5 e 34R-2, enquanto as menores produções destas substâncias foram observadas em meio de cultura com as estirpes BR3407, M130, Cd e CBAmC (Tabela 12). Estes valores são referentes aos tratamentos com dose de triptofano equivalente a  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

As avaliações realizadas com as bactérias crescidas em meio semi-sólido mostraram que as maiores produções de substâncias reguladoras de crescimento foram obtidas pelas estirpes bacterianas 3R-2, AF32, 20F-2 e 4R-2. Valores intermediários foram obtidos com as estirpes PRJ50, 5R-2, M130 e PRJ2. Já as menores produções destas substâncias foram obtidas com as estirpes HRC53, HRC50, 198 e Z94 (Tabela 12). Estes valores são referentes à dose de triptofano equivalente a  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Neste estudo, a produção de AIA pelas estirpes bacterianas avaliadas, dentro de cada gênero, em meio de cultura líquido e semi-sólido, respectivamente, apresentou a seguinte variação: 1) de 32,9 a 440,7 e 597 a 1421,4  $\mu\text{M}$  de AIA para as estirpes de *Gluconacetoabcter*; 2) de 49,2 a 289,6 e 375,5 a 427  $\mu\text{M}$  de AIA para as estirpes de bactérias do gênero *Herbaspirillum*; 3) de 20,3 a 126,2 e 388,4 a 427  $\mu\text{M}$  de AIA para as estirpes de bactérias do gênero *Azospirillum*; 4) de 16,6 a 32,1 e 375,5 a 629,2  $\mu\text{M}$  de AIA por estirpes de bactérias do gênero *Burkholderia*. Todos estes valores são referentes às avaliações a partir das culturas crescidas em meio de cultura adicionado de triptofano na concentração de  $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

As duas formas de meio de cultura (líquido e semi-sólido) utilizadas para crescimento das culturas bacterianas conferem a estas, condições metabólicas diferenciadas. Desta forma, as altas concentrações de indóis totais obtidas pelos isolados crescidos em meio de cultura semi-sólido, comparadas às obtidas pelos mesmos isolados crescidos em meio líquido, podem ter sido favorecidas pelos fatores estresse por falta de carbono, oxigenação e entrada das culturas bacterianas na fase estacionária de crescimento.

Análises de produção de fitormônio por bactérias endofíticas através de métodos colorimétricos têm sido realizadas com frequência. Porém, freqüentes

adaptações do método Salkowisk têm sido realizadas de acordo com as possibilidades e objetivos das avaliações. Desta forma, há a necessidade de atenção ao comparar resultados obtidos em diferentes experimentações.

Os resultados, aqui apresentados, estão de acordo com os disponíveis na literatura para algumas bactérias endofíticas. Um exemplo disto são os dados apresentados por REIS JR. (2002) em relação à produção de AIA por estirpes da espécie *Azospirillum amazonense*. Este autor observou produções de AIA, variando de 35 a 110  $\mu\text{M}$ , por estirpes da espécie *Azospirillum amazonense*.

Avaliações similares realizadas por CROZIER et al. (1998) mostraram que estirpes da bactéria *A. lipoferum* produziram AIA variando de 0,0  $\mu\text{M}$  a 85,9  $\mu\text{M}$ . Estes mesmos autores verificaram produção de AIA por estirpes de *A. brasilense* variando de 8,0 a 149  $\mu\text{M}$ . Variações na produção de AIA por espécies de *Azospirillum* na ordem de 20 a 432  $\mu\text{M}$  foram apresentadas por MASCARUA-ESPARZA et al. (1998), citado por REIS JR. (2002). PERIN (2007), utilizando esta mesma metodologia, avaliou diferentes isolados da espécie *Burkholderia silvatlantica* e estirpes padrões das espécies *B. tropica*, *B. brasilensis*, *B. kururiensis* e *B. unamae*. A autora observou que apenas a estirpe TVV75, de *B. vietnamiensis* produziu compostos da classe indol.

Avaliações realizadas com 34 isolados de cianobactérias de vida livre e simbióticas quanto à habilidade de síntese de auxinas foram realizadas por SERGEEVA et al. (2002). Estes autores observaram que dos isolados de vida livre analisados, apenas 38% produziram estes compostos, enquanto 83% dos isolados simbióticos apresentaram a mesma habilidade. Segundo os autores, isto ocorreu devido à presença de fatores como precursores da biosíntese de AIA nos hospedeiros destas cianobactérias.

ROESCH et al. (2007) avaliaram 224 isolados de bactéria *Azospirillum* spp. quanto à capacidade de síntese AIA. Estes autores observaram que dos isolados analisados, 121 apresentaram a habilidade na produção deste hormônio. Os 30 isolados mais promissores produziram de 3,51 a 246,69  $\mu\text{g}$  de AIA. $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

Apesar de o método Salkowisk ser pouco sensível nestas avaliações, ele apresenta as vantagens de fácil e rápida operação, sendo ideal para avaliação de elevado número de estirpes. Este método é menos sensível do que os métodos cromatográficos, pois estirpes negativas ao reagente Salkowski podem responder

positivamente aos métodos de ELISA utilizando anticorpos anti-AIA e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, enquanto o inverso ainda não foi observado (SERGEEVA et al., 2002). CROZIER et al. (1988), observaram diferenças entre os métodos colorimétrico Salkowisk e cromatografia gasosa em relação à avaliação de substâncias secretadas pelas bactérias para o meio de cultura. Estes autores observaram, para as mesmas condições de cultura da bactéria *A. brasilense*, uma produção de  $0.5 \mu\text{g AIA.mL}^{-1}$  de meio obtida pelo método de cromatografia HPLC e  $26.1 \mu\text{g AIA.mL}^{-1}$  de meio de cultura pelo método Salkowski. Isto sugere que as análises de produção de fitormônio pelo método colorimétrico devem receber atenção na apresentação dos resultados.

Em relação ao aminoácido triptofano como precursor das reações de síntese de compostos indóis, SERGEEVA et al. (2002) apontam a possibilidade de este aminoácido ser consumido como fonte de nitrogênio no estágio inicial de crescimento da cultura, aumentando assim, as concentrações de AIA nesta fase. Isto ocorre, segundo estes autores, pelo fato do triptofano não estar disponível na fase estacionária da cultura. Por outro lado, altas doses de triptofano em meio de cultura com a bactéria *A. brasilense* (SP7) causaram efeitos tóxicos, inibindo o crescimento da bactéria e promovendo mudanças na coloração, síntese e transcrição de proteínas (PATTEN e GLICK 1996).

BARAZANI e FRIEDMAN (2000) estudando o efeito do triptofano na atividade aleloquímica de PGPR, em condições axênicas, observaram que *Comamonas acidovorans* 26, *Agrobacterium* sp. e *Alcaligenes piechaudii* promoveram o alongamento de raiz de plântulas de alface em 15, 30 e 44%, respectivamente. Quando 10 mM de triptofano foi adicionado, as PGPR *Agrobacterium* sp. e *A. piechaudii* inibiram o alongamento radicular em 57,6 e 63,5%, respectivamente. No entanto, na mesma concentração de triptofano, *C. acidovorans* 26 promoveu o crescimento radicular dessas plantas. Isto sugere, segundo os autores, que o triptofano reverteu a promoção do crescimento radicular aumentando a produção de ácido indol acético pela bactéria *C. acidovorans* 26.

Neste experimento foi observado que todas as bactérias avaliadas apresentaram a habilidade de síntese de fitormônios e seus conjugados. Estes resultados confirmam a possibilidade dessas bactérias, em associação com plantas de cana-de-açúcar, promover o crescimento destas plantas por efeitos sinérgico ao já conhecido potencial de FBN por estes isolados em plantas de cana-de-açúcar.

**Tabela 12:** Produção de compostos indóis por estirpes das bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* sp e *Burkholderia* sp em meio de cultura líquido (DYGS) e semi-sólido, sendo: LGI-P (*G. diazotrophicus*), JNFB (*Herbaspirillum* sp) e JMV (*Burkholderia* sp). Valores em médias de 3 repetições.

Gênero/Estirpe de Bactéria Analisados	Compostos da Classe Indol – $\mu\text{M}$ (AIA) em Função das Doses de Triptofano (0, 100 e 200 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )					
	Meio Líquido			Meio Semi-Sólido		
	0	100	200	0	100	200
<i>Gluconacetobacter</i>						
PPe4	23,4	136,6	240,0	0	571,4	936,2
PRJ2	64,1	133,3	199,2	0	632,2	637,7
CHCA	72,6	145,5	206,6	0	492,2	924,4
26R-2	10,3	43,3	99,6	0	928,8	1077,4
PRJ56	30,7	81,1	114,0	8,5	662,9	1095,9
20F-2	59,2	118,8	280,7	0	971,1	1218,1
AF32	78,1	170,7	240,0	54,4	979,2	1361,1
PAL5	68,1	188,8	225,9	0	514,0	932,9
PRJ55	62,2	157,8	221,1	0	517,7	788,5
PAL3	48,1	116,1	258,8	0	889,2	974,4
PSP17	38,8	144,4	373,3	0	590,3	951,8
BR11329	0	152,2	368,5	0	536,2	1010,7
3R-2	0	243,3	440,7	23,3	881,4	1421,4
4R-2	0	217,0	431,4	22,5	694,4	1126,6
5R-2	26,1	148,3	321,1	0,7	296,6	604,8
PRJ50	0	15,9	32,9	0	374,8	597,0
34R-2	49,5	228,8	230,7	44,4	744,7	1120,1
CHR	23,7	146,2	438,5	0	643,7	1083,9
PRJ14	22,5	94,4	135,5	22,1	411,1	811,1
<i>Herbaspirillum</i> sp						
HRC54	135,9	212,9	221,4	55,5	77,0	113,3
HCC100	80,0	225,1	145,1	21,8	49,6	131,4
Z67	46,6	69,6	49,2	16,9	59,6	80,7
HRC80	39,2	182,6	131,8	21,0	49,6	1101,4
198	97,0	253,7	244,0	0	11,8	50,0
HCC101	81,1	244,0	284,4	34,5	64,0	92,2

M4	91,4	156,2	230,7	0	42,2	79,4
M5	22,9	133,3	147,0	0	70,0	132,2
HRC53	65,9	177,0	238,9	6,2	28,5	39,6
HCC103	67,3	201,8	289,6	5,5	66,2	97,7
HRC51	39,2	157,7	169,2	0	14,0	79,2
Z94	10,0	148,5	198,5	0	51,4	79,2
HRC50	0	173,3	249,6	3,0	16,2	45,2
<i>Burkholderia</i> sp						
M130	8,5	10,3	20,3	79,6	446,2	629,2
BR3407	2,9	8,8	16,6	Na	Na	Na
PPe8	11,1	32,9	32,1	149,2	390,7	395,1
PPe6	0	21,8	30,3	25,1	272,2	375,5
<i>Azospirillum</i> sp						
AZ6	17,0	124,8	126,2	318,5	390,7	388,4
Cd	0	17,4	20,7	81,2	382,1	396,3
CBAmC	27,0	39,6	27,4	28,2	273,5	391,2
5SP	0	35,5	60,7	172,9	304,0	427,0

Na = Não analisado

### 3.3 – Análise de Compostos em Meio de Cultura Bacteriano por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises cromatográficas e espectrométricas de substâncias secretadas pelas bactérias *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) em diferentes meios líquidos de cultura demonstraram a produção do hormônio vegetal AIA e alguns de seus conjugados. Os espectros de massas para cada pico e o padrão de fragmentação destes compostos foram comparados com aqueles constantes da biblioteca de espectro de massas, presente no equipamento – NIST-Library (National Institute of Standards and Technology).

A avaliação por CG/EM de substâncias secretadas pela bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) em meio de cultura DYGS apresentou diversos sinais destacando-se: i) sinal em tempo de retenção 8,11 minutos com íon molécula de m/z 145, cujo espectro de massas mostra similaridade de 93% com o

composto ácido indol-3-carboxialdeído (Figura 27); ii) sinal em tempo de retenção 8,64 minutos com íon molécula de  $m/z$  175, cujo espectro de massas mostra similaridade de 95% com o composto ácido indol acético (Figura 28); iii) sinal em tempo de retenção 10,11 minutos com íon molécula de  $m/z$  175, cujo espectro de massas mostra similaridade de 83% com o composto ácido indol-3-carboxílico metil éster (Figura 29).

Em meio de cultura líquido LGI-P, a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) foi avaliada em duas extrações, diferenciando o volume de meio de cultura utilizado. A extração a partir de 500 mL do respectivo meio apresentou um composto em tempo de retenção 8,60 minutos com íon molécula de  $m/z$  175 e 96% de similaridade com o ácido indol acético (Figura 30). Na avaliação da extração realizada utilizando maior volume de meio de cultura (1000 mL), foram observados os sinais: i) sinal em tempo de retenção 7,47 minutos com íon molécula de  $m/z$  189, cujo espectro de massas mostra similaridade de 93% com o composto ácido indol-3-acético metil éster, conforme biblioteca de dados (Figura 31); ii) sinal em tempo de retenção 8,17 minutos com íon molécula de  $m/z$  145, cujo espectro de massas mostra similaridade de 87% com o composto indol-5-aldeído, conforme biblioteca (Figura 32); iii) sinal em tempo de retenção 8,2 minutos com íon molécula de  $m/z$  189, cujo espectro de massas mostra similaridade de 95% com o composto ácido indol-3-acético metil éster, conforme biblioteca de dados (Figura 33).

As avaliações através de CG/EM de substâncias secretadas pela bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) em meio DYGS demonstraram a presença de diferentes sinais no cromatograma. Os dois principais sinais foram: i) sinal em tempo de retenção 10,1 minutos com íon molécula de  $m/z$  203, cujo espectro de massas mostra similaridade de 87% com o composto indol-3-carboxialdeído (Figura 34); ii) sinal em tempo de retenção 8,08 minutos com íon molécula de  $m/z$  145, cujo espectro de massas mostra similaridade de 91% com o composto indol-5-aldeído, conforme biblioteca (Figura 35). Entretanto, as avaliações de substâncias secretadas por esta mesma bactéria em meio líquido de cultura JNFB mostraram sinais nos tempos de retenção: 8,15 minutos com íon molécula de  $m/z$  145, cujo espectro de massa apresenta similaridade de 91% com o composto indol-3-carboxialdeído (Figura 36) e 10,13 minutos com íon molécula de  $m/z$  175, cujo espectro de massa

apresenta similaridade de 86% com o composto indol-3-carboxílico, conforme banco de dados (Figura 37).

Há uma vasta literatura sobre a produção de hormônios da classe auxina por bactérias diazotróficas em condições *in vitro*. O principal deles é o hormônio AIA, que segundo WOODWARD e BARTEL (2005), 90% do total de AIA presente nas plantas, durante o crescimento vegetativo, encontram-se na forma de conjugados com açúcares, aminoácidos e pequenos peptídeos. Estes conjugados podem estar envolvidos no transporte e estoque do AIA, para seu subsequente uso no controle homeostático do excesso de hormônio livre e primeiras etapas da via metabólica de biosíntese (OSTI et al., 1998; NORMANLY, 1997).

Porém, como a maioria das análises de produção destes compostos por bactérias diazotróficas tem sido feita utilizando métodos indiretos, há pouco conhecimento sobre a natureza destes conjugados.

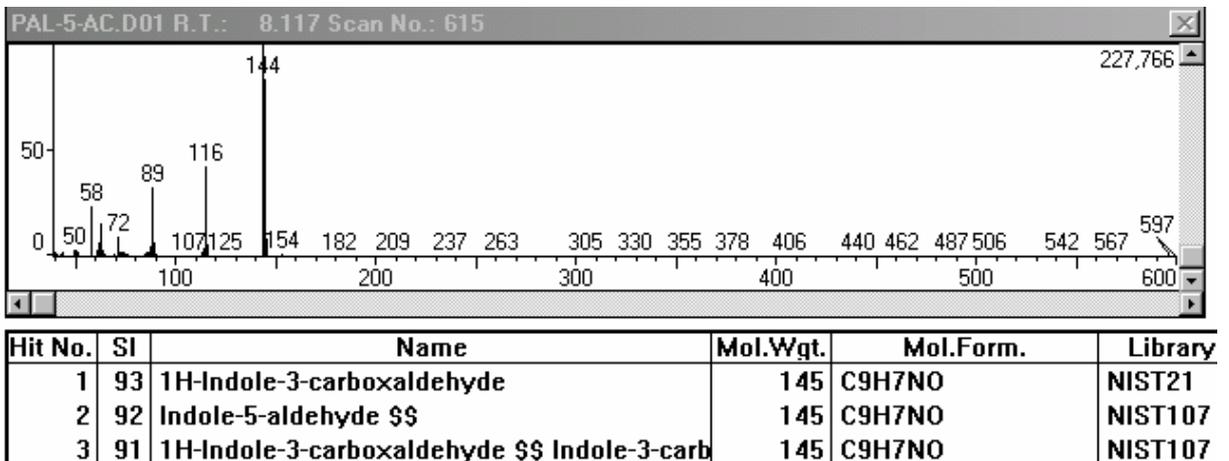
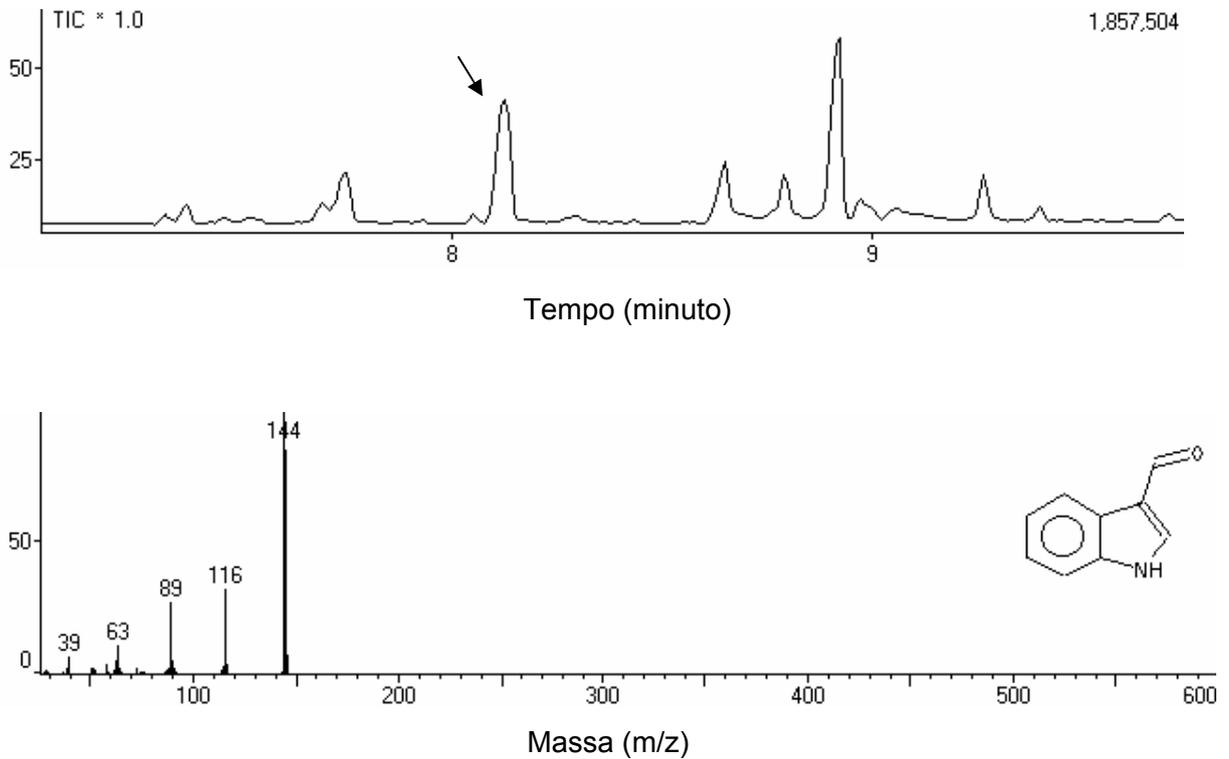
CROZIER et al. (1988), analisando substâncias secretadas pela bactéria *A. brasilense* em meio de cultura, através dos métodos de cromatografia HPLC e GC/EM, verificaram a produção de  $0.5 \mu\text{g AIA.mL}^{-1}$  de meio. Estes mesmos autores observaram ainda a presença dos conjugados de indol: indol-3-etanol, indol-3-metanol e ácido indol láctico ao analisarem os extratos obtidos desta mesma bactéria. O composto de ação antimicrobiana, ácido fenilacético (PAA), também foi observado em análises de extratos a partir de sobrenadante da bactéria *Azospirillum brasilense* (SOMERS, et al., 2005).

BASTIÁN et al. (1998), utilizando as mesmas técnicas, observaram que a bactéria *H. seropedica* produziu  $12,5 \text{ ng de giberelina GA}_3.\text{mL}^{-1}$  de cultura em meio NFb. Enquanto a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* produziu  $1,6 \text{ ng de GA}_1.\text{mL}^{-1}$  de cultura e  $11,9 \text{ ng de GA}_3.\text{mL}^{-1}$  de cultura em meio LGI-P, com 10% de sacarose. Os mesmos autores observaram ainda que as bactérias *G. diazotrophicus* e *H. seropedicae* produziram o ácido indol acético nas concentrações de  $7 \text{ ng de AIA.mL}^{-1}$  e  $32 \text{ ng de AIA.mL}^{-1}$  de cultura, respectivamente. A presença de alguns conjugados do ácido indol acético secretados pelas bactérias analisadas também foi relatada por BASTIÁN et al. (1998), porém estes autores não descreveram estes compostos.

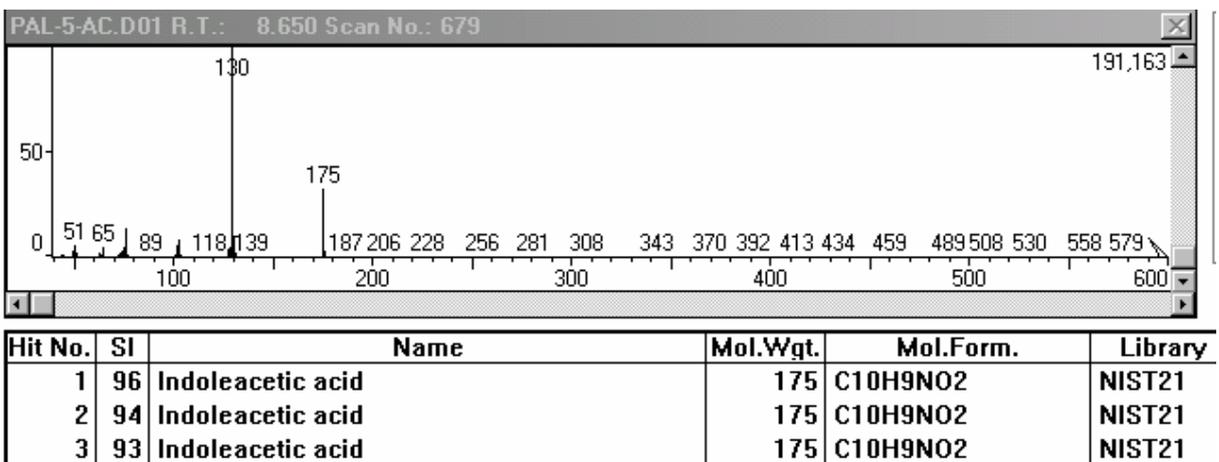
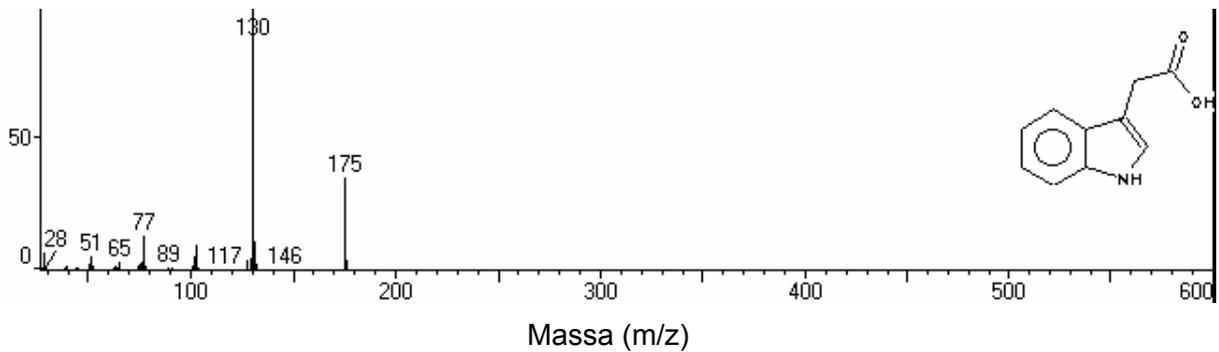
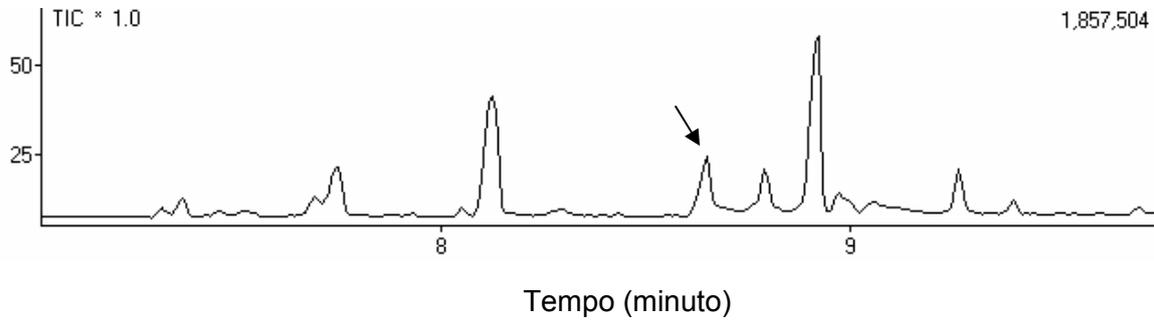
Em estudos similares, MARTÍNEZ-MORALES et al. (2003) analisaram o sobrenadante da bactéria *Azospirillum brasilense* crescida em meio mínimo

acrescido de triptofano. Estes autores observaram uma produção de 59  $\mu\text{g}$  de AIA. $\text{mL}^{-1}$  enquanto as bactérias *G. diazotrophicus* e *H. seropedicae* apresentaram, respectivamente, uma produções de 32 e 7 ng de AIA. $\text{mL}^{-1}$ .

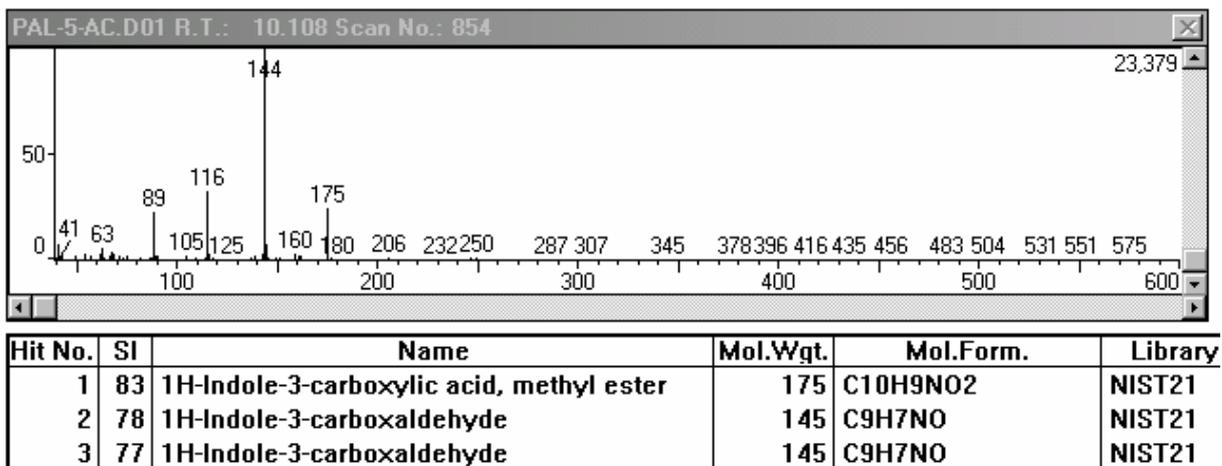
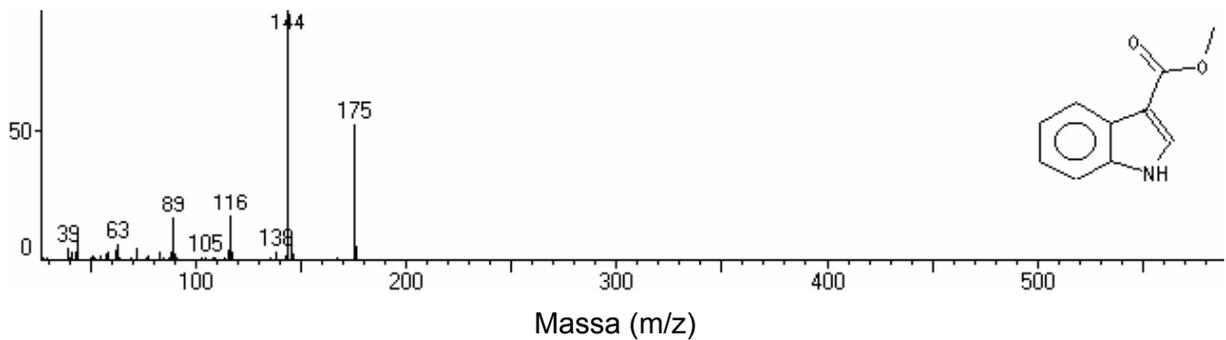
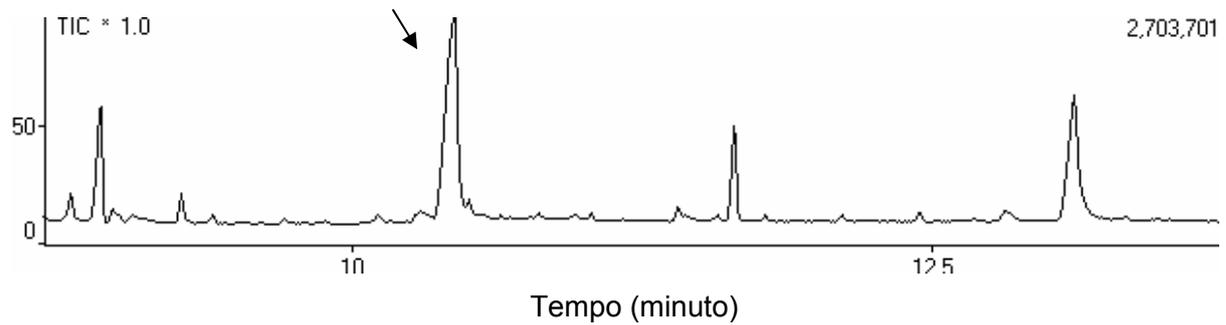
Segundo ONA et al. (2005), a biosíntese de AIA em *Azospirillum brasilense* é ativada pela ação conjunta de fatores como condições de estresse de falta de carbono e oxigênio e entrada da cultura na fase estacionária de crescimento. Segundo estes autores, em condições aeróbicas, nem a eliminação de fonte de carbono, nem a redução da taxa de crescimento, podem ativar a biosíntese de AIA. Porém, DOBBELAERE et al. (2002) acreditam que esta incapacidade da bactéria *Azospirillum* produzir AIA quando fonte de carbono está acessível, pode ser uma explicação para os insucessos de promoção de crescimento de plantas inoculadas com esta bactéria em solos de alta fertilidade.



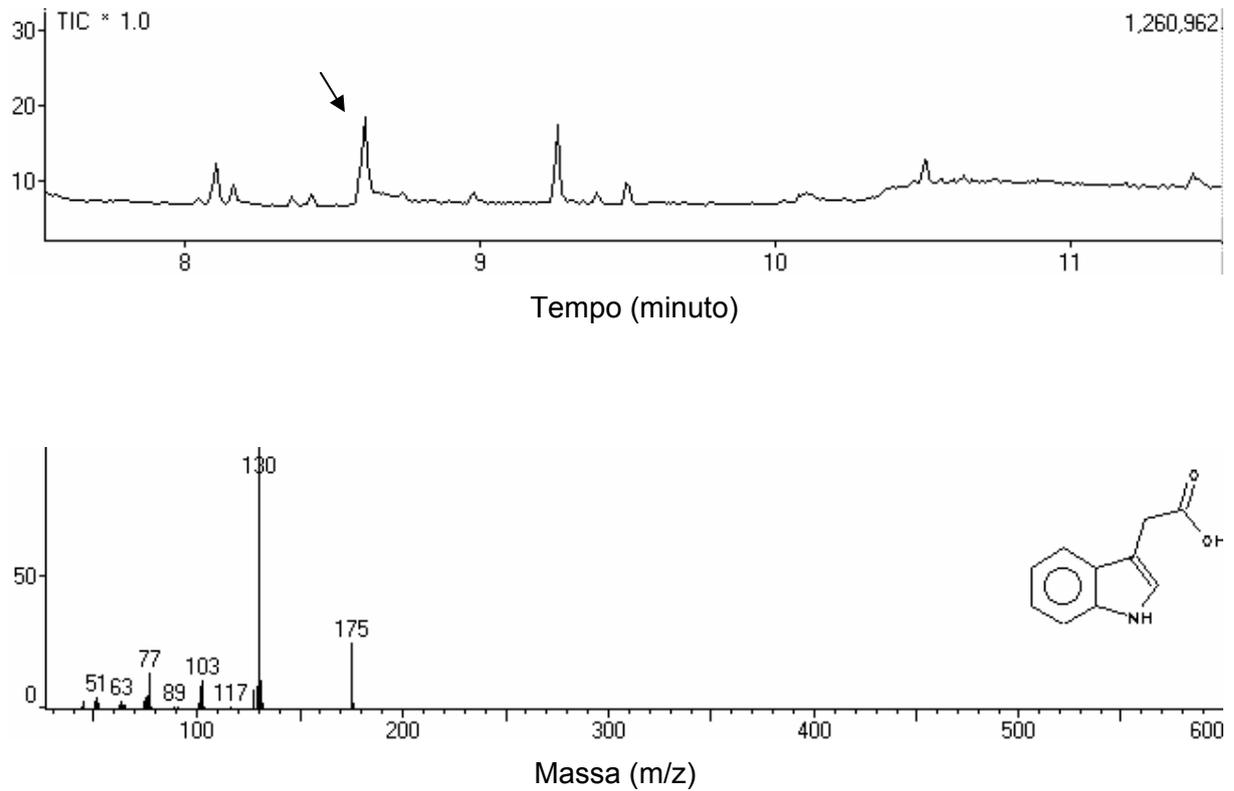
**Figura 27:** Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) em meio de cultura líquido DYGS, região de 7 a 10 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,11 minutos.



**Figura 28:** Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) em meio de cultura líquido DYGS, região de 7 a 10 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,64 minutos.



**Figura 29:** Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) em meio de cultura líquido DYGS, região de 9 a 13 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 10,11 minutos.

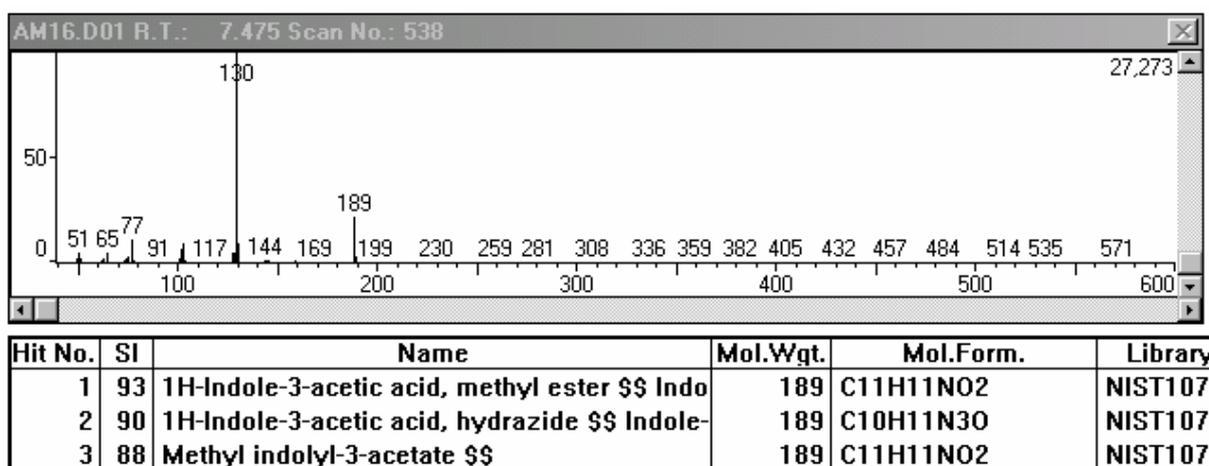
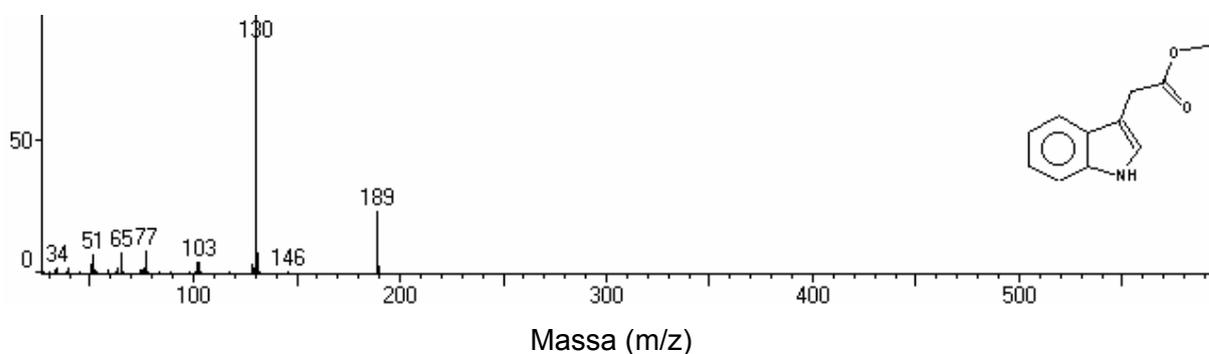
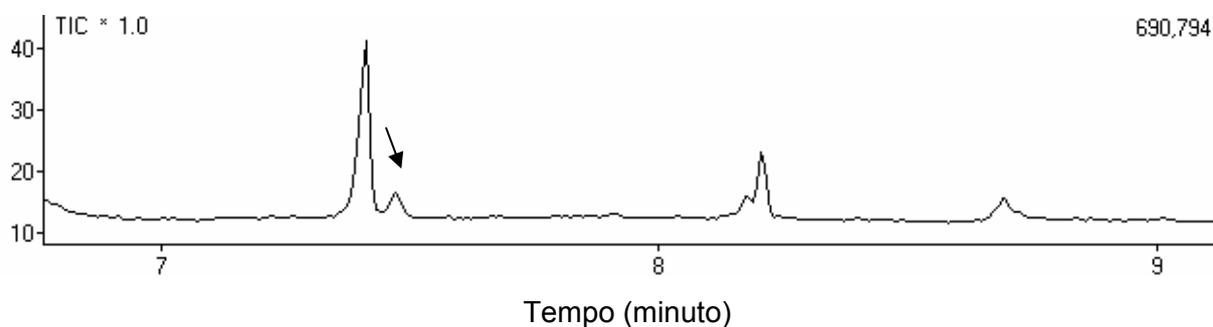


PAL5ALGP.D01 R.T.: 8.608 Scan No.: 674

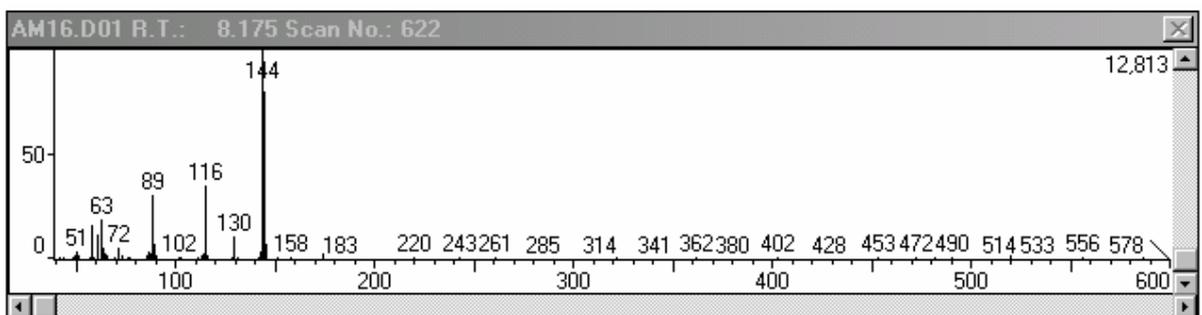
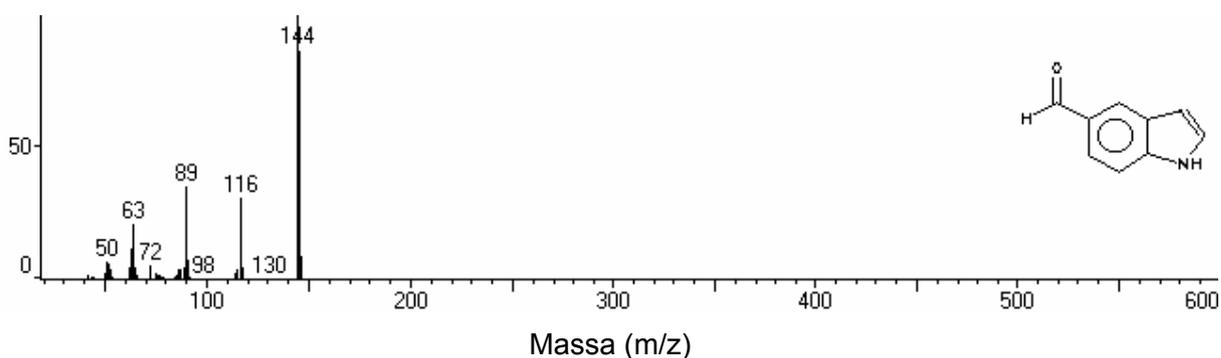
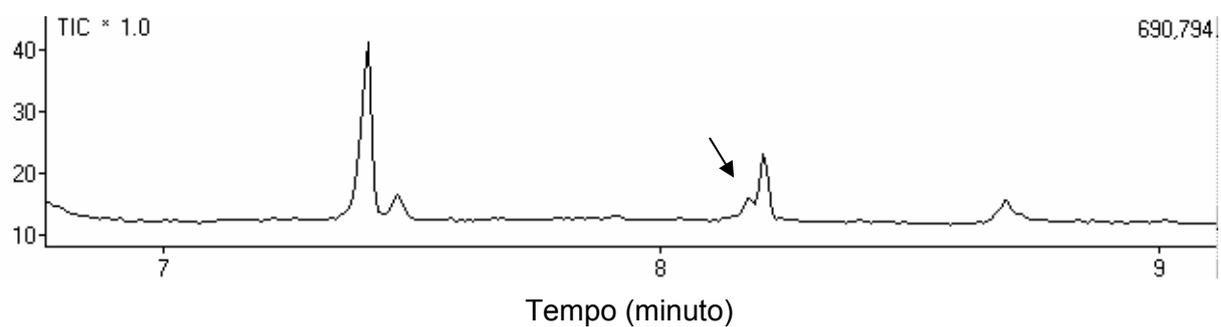
The mass spectrum shows relative intensity versus m/z. The base peak is at m/z 130. Other labeled peaks include m/z 51, 65, 77, 89, 117, 147, 175, 185, 218, 247, 276, 297, 324, 347, 372, 393, 410, 443, 464, 487, 505, 535, 568, and 596.

Hit No.	SI	Name	Mol.Wgt.	Mol.Form.	Library
1	96	Indoleacetic acid	175	C10H9NO2	NIST21
2	94	Indoleacetic acid	175	C10H9NO2	NIST21
3	93	Indoleacetic acid	175	C10H9NO2	NIST21

**Figura 30:** Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) em meio de cultura líquido LGI-P (500mL), região de 7 a 11 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,60 minutos.

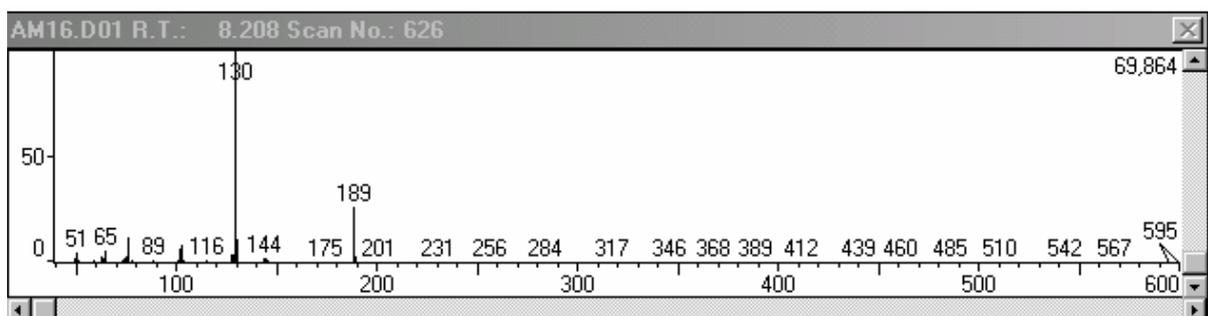
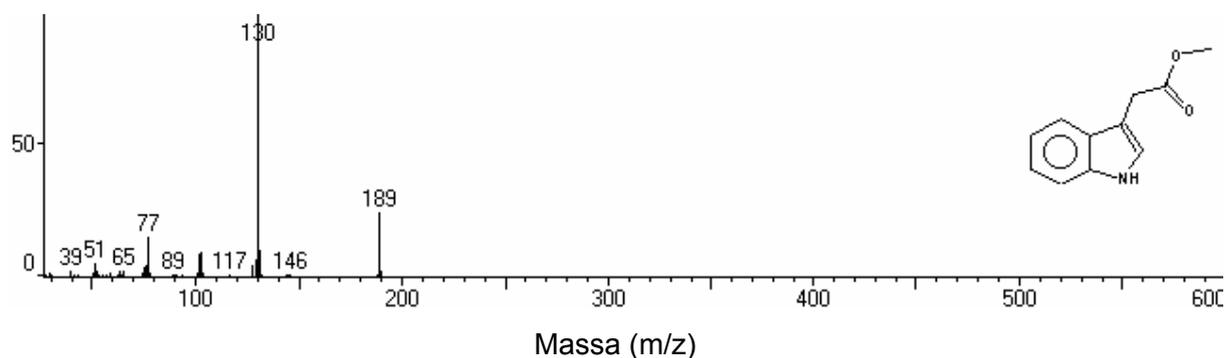
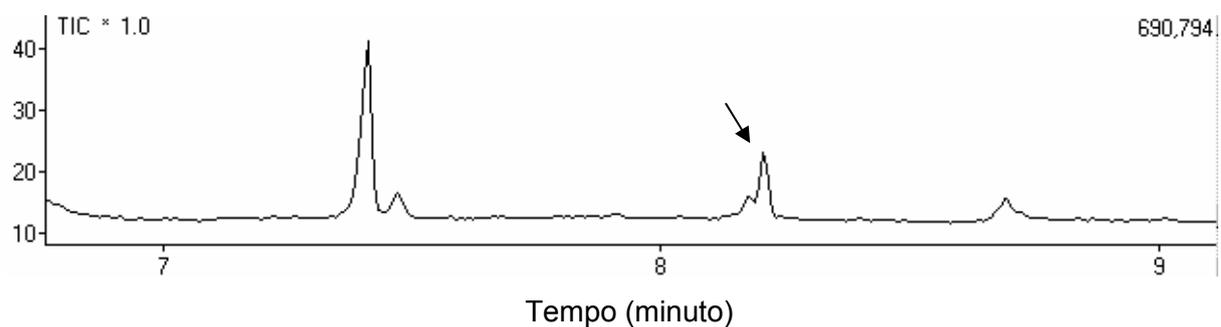


**Figura 31:** Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) em meio de cultura líquido LGI-P (1000mL), região de 7 a 9 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 7,47 minutos.



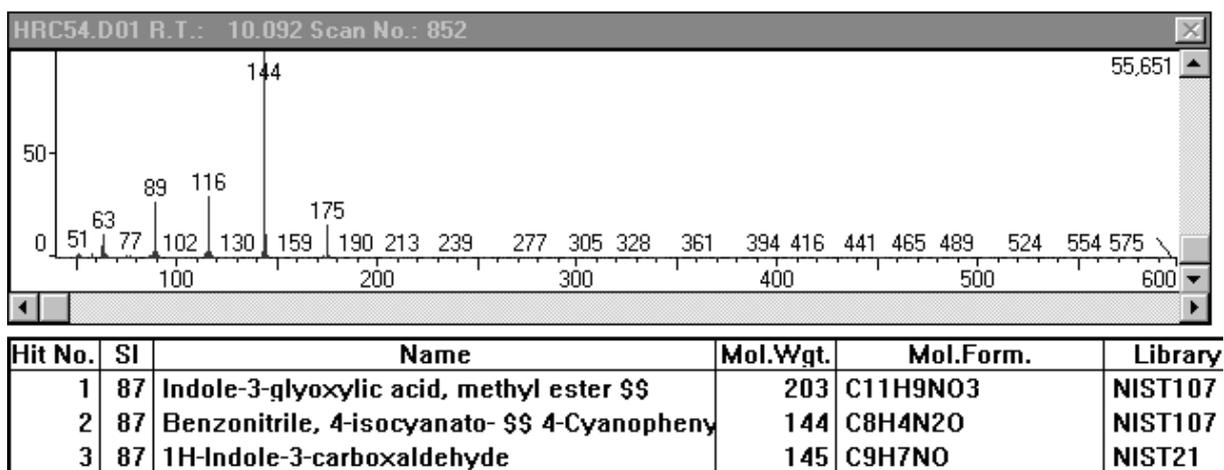
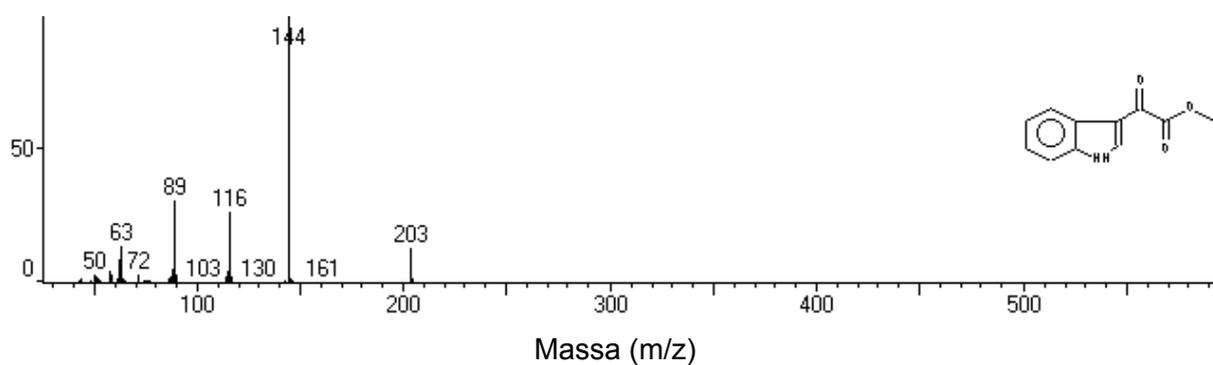
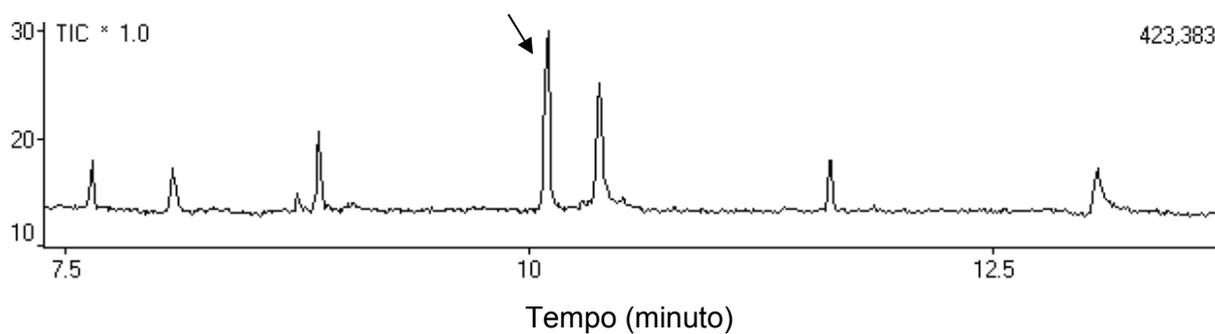
Hit No.	SI	Name	Mol.Wgt.	Mol.Form.	Library
1	87	Indole-5-aldehyde \$\$	145	C9H7NO	NIST107
2	86	1H-Indole-3-carboxaldehyde \$\$ Indole-3-carb	145	C9H7NO	NIST107
3	82	1H-Indole, 1,2-dimethyl- \$\$ Indole, 1,2-dimet	145	C10H11N	NIST107

**Figura 32:** Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) em meio de cultura líquido LGI-P (1000mL), região de 7 a 9 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,17 minutos.

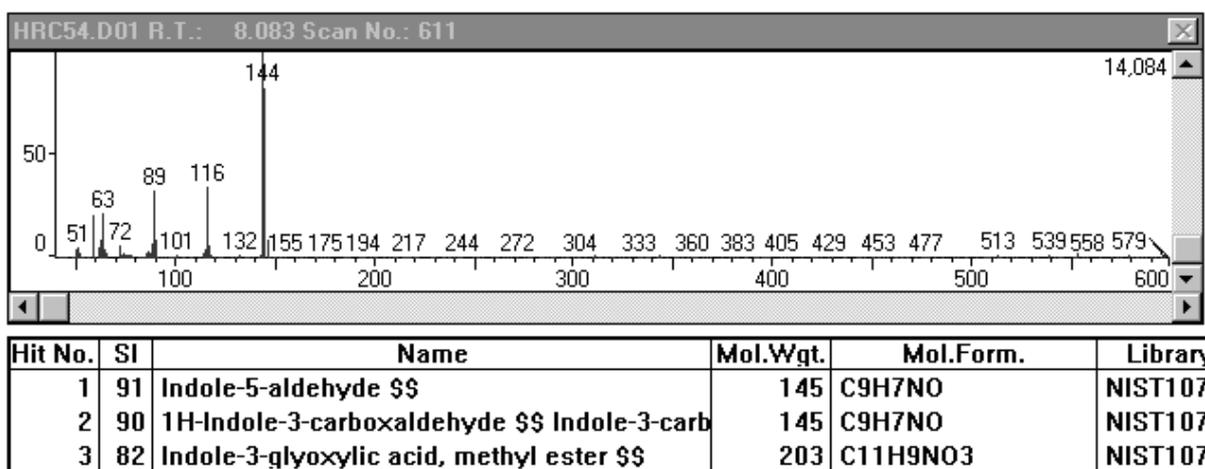
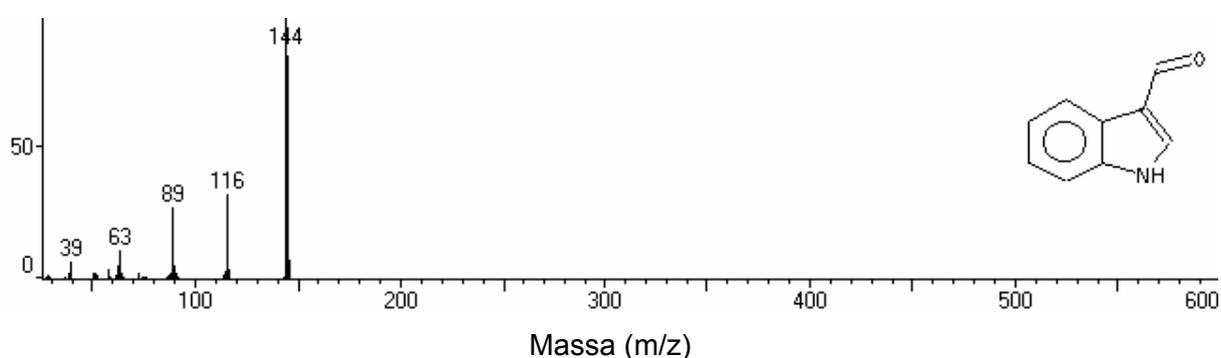
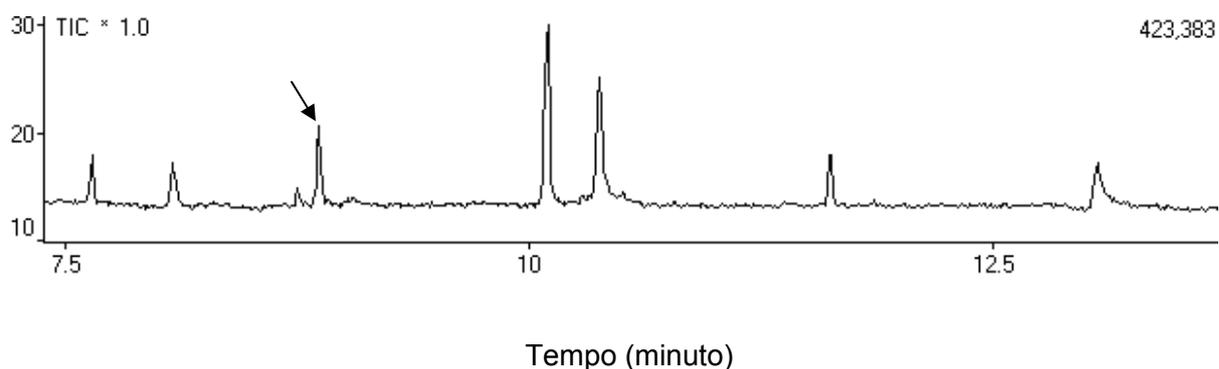


Hit No.	SI	Name	Mol.Wgt.	Mol.Form.	Library
1	95	1H-Indole-3-acetic acid, methyl ester	189	C11H11NO2	NIST21
2	94	1H-Indole-3-acetic acid, methyl ester	189	C11H11NO2	NIST21
3	91	1H-Indole-3-acetic acid, hydrazide	189	C10H11N3O	NIST21

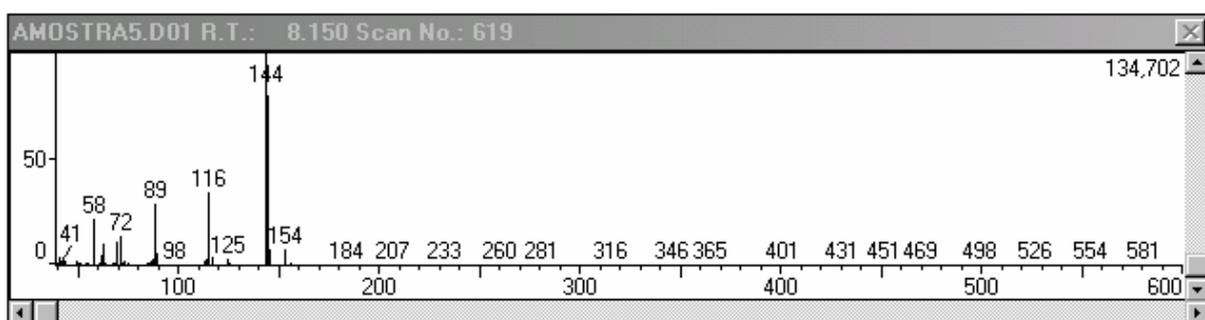
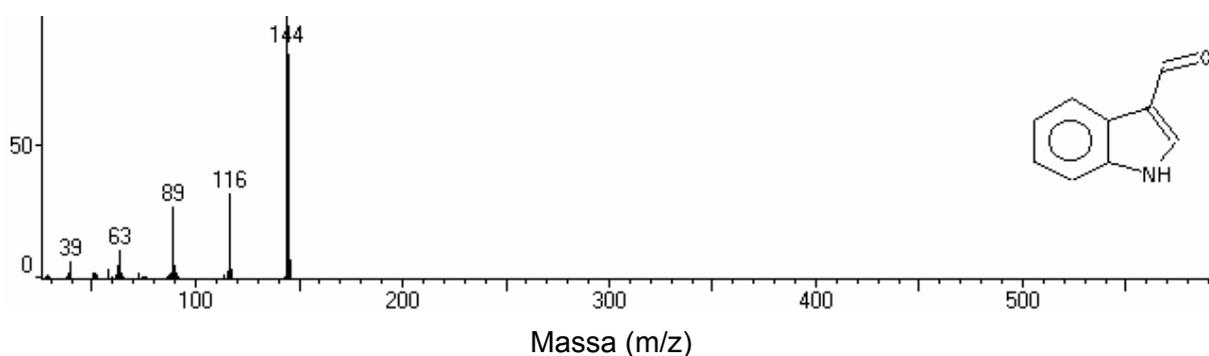
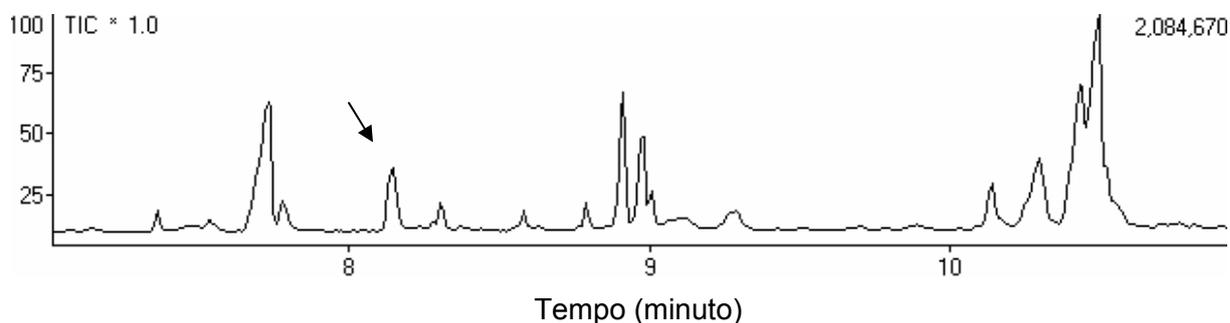
**Figura 33:** Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) em meio de cultura líquido LGI-P (1000mL), região de 7 a 9 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,20 minutos.



**Figura 34:** Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) em meio de cultura líquido DYGS, região 7,5 a 12,5 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 10,10 minutos.

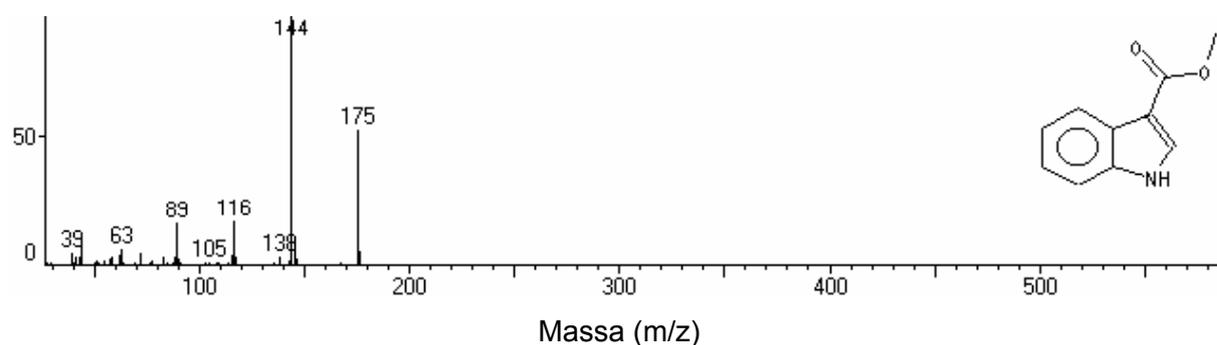
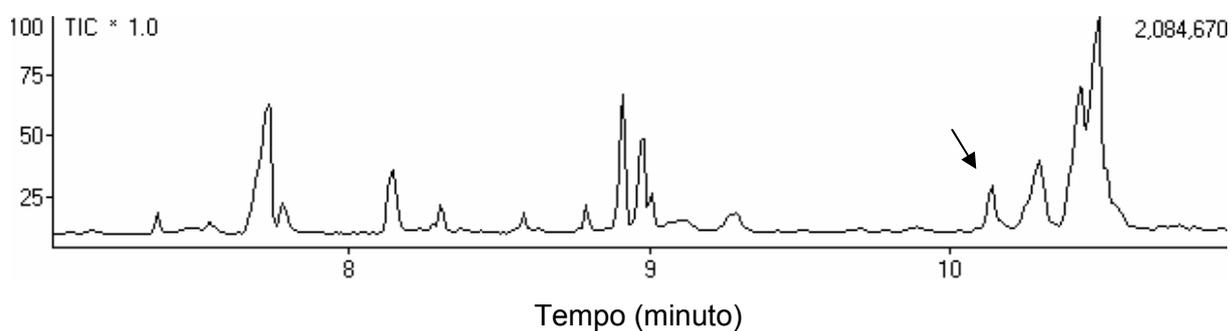


**Figura 35:** Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) em meio de cultura líquido DYGS, região 7,5 a 12,5 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,08 minutos.



Hit No.	SI	Name	Mol.Wgt.	Mol.Form.	Library
1	91	1H-Indole-3-carboxaldehyde	145	C9H7NO	NIST21
2	89	1H-Indole-3-carboxaldehyde	145	C9H7NO	NIST21
3	89	1H-Indole-3-carboxaldehyde \$\$ Indole-3-carb	145	C9H7NO	NIST107

**Figura 36:** Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) em meio de cultura líquido JNFB, região de 7 a 11 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 8,15 minutos.



AMDSTRA5.D01 R.T.: 10.142 Scan No.: 858

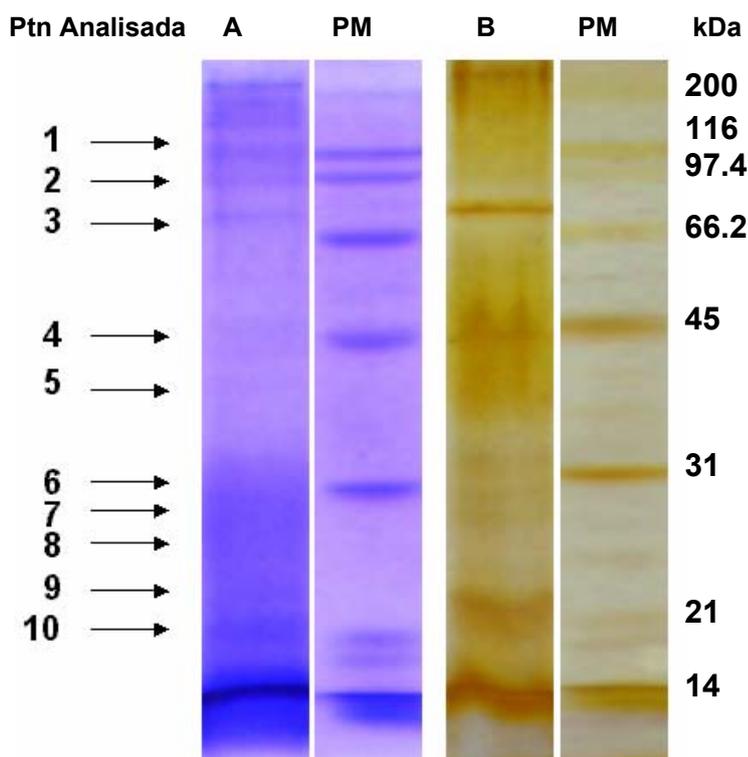
Hit No.	SI	Name	Mol.Wgt.	Mol.Form.	Library
1	86	1H-Indole-3-carboxylic acid, methyl ester	175	C10H9NO2	NIST21
2	86	1H-Indole-3-carboxaldehyde	145	C9H7NO	NIST21
3	84	1H-Indole-3-carboxaldehyde \$\$ Indole-3-carb	145	C9H7NO	NIST107

**Figura 37:** Ampliação do cromatograma de substâncias extraídas a partir da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) em meio de cultura líquido JNFB, região de 7 a 11 minutos, e, espectro de massas para o pico de tempo de retenção 10,14 minutos.

### **3.4 - Identificação de Proteínas Secretadas por *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) em Meio Líquido DYGS**

Com base na análise do extrato protéico verificou-se a presença de 15 a 18 proteínas com massa molecular entre 20 e 210 kDa. Destas proteínas, 10 foram selecionadas para análise mais detalhada por espectrometria de massa. As proteínas analisadas estão marcadas na Figura 38.

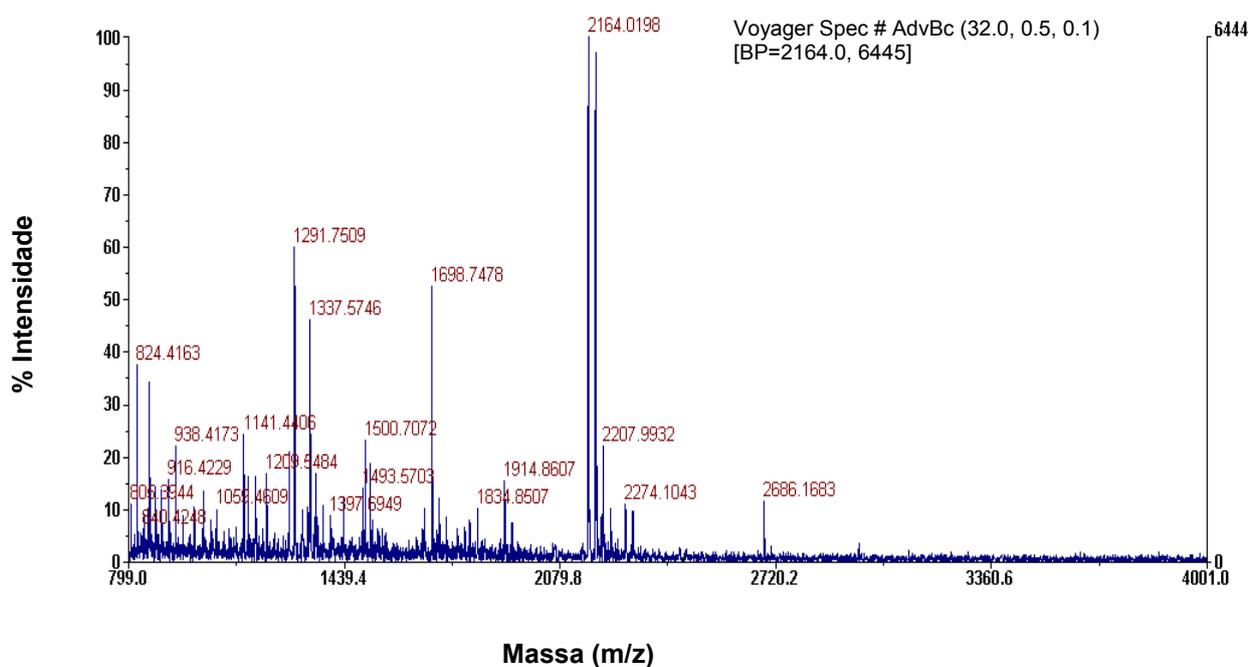
A análise por espectrometria de massa revelou a presença de várias proteínas (Tabela 13), dentre elas: uma proteína de massa 68 kDa que corresponde a DNA primase de *E.coli* (Figura 39); outra de massa 27 kDa que corresponde a uma proteína M (Figura 40) de *Streptococcus pyogenes*. A partir destes resultados preliminares pode-se sugerir que estas proteínas foram secretadas pela bactéria e que, possivelmente, desempenham alguma função na interação bactéria/plantas de cana-de-açúcar. Entretanto, para uma melhor caracterização são necessários estudos mais detalhados destas proteínas.



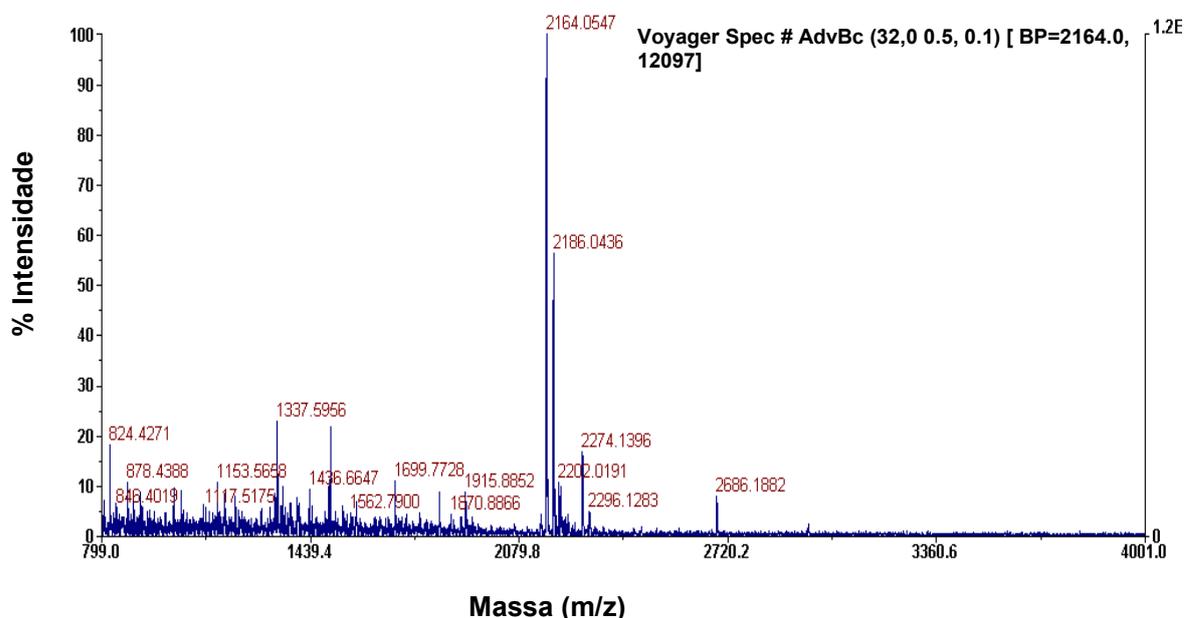
**Figura 38:** Gel SDS-PAGE 12% das proteínas secretadas pela bactéria *H. seropedicae* (HRC54) crescida em meio líquido DYGS, durante 48 horas. A: Gel corado com azul de Comassie; B: Gel corado com Prata e PM: peso molecular.

**Tabela 13:** Peso molecular das proteínas secretadas pela bactéria *H. seropedicae* (HRC54) crescida em meio líquido DYGS, durante 48 horas.

Proteína Secretada	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Peso Molecular (kDa)	115	95	75	45	39	31	29	27	22	21



**Figura 39:** Espectro MALDI TOF da proteína DNA primase, DNAG [*Clostridium acetobutylicum*] secretada pela bactéria *H. seropedicae* (HRC54), crescida em meio de cultura líquido DYGS, durante 48 horas.



**Figura 40:** Espectro MALDI TOF da proteína M de *Streptococcus pyogenes* secretada pela bactéria *H. seropedicae* (HRC54), crescida em meio de cultura líquido DYGS, durante 48 horas.

### 3.5 – Bactérias Endofíticas na Solubilização de Fosfato

Das 30 estirpes analisados neste estudo, apenas três não apresentaram a habilidade de solubilização de fósforo. Estas estirpes foram BR11329 (gênero *Gluconacetobacter*), 5SP e CBAmC (gênero *Azospirillum*). Nesta avaliação não foi determinado o diâmetro dos halos formados, porém foi observado que a grande maioria das estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* apresentou maior diâmetro comparado às estirpes de outras espécies bacterianas analisadas.

O fósforo é um nutriente limitante em solos tropicais, sendo os microrganismos solubilizadores de fósforo um grupo microbiano de grande relevância, pois apresentam capacidade de mineralizar fósforo orgânico e solubilizar formas inorgânicas de fósforo, disponibilizando-os para as plantas (SILVA FILHO,

1998). Entre os gêneros de bactérias com esta habilidade estão *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia*. Alguns inoculantes à base de bactérias e fungos com a capacidade de solubilização de nutrientes têm sido utilizados para aumentar a produção de culturas cultivadas em vários países (RODRÍGUEZ E FRAGA, 1999).

### **3.6 – Efeito da Inoculação de Bactérias Endofíticas no Crescimento de Plantas de Cana-de-Açúcar Oriundas de Sementes**

As avaliações realizadas no primeiro ensaio deste experimento demonstraram que todas as plantas inoculadas apresentaram maior crescimento, com conseqüente maior produção de biomassa seca total comparada às plantas não inoculadas. Entretanto, uma maior promoção de crescimento destas plantas foi observada quando inoculadas pelas estirpes dos gêneros *Burkholderia* (M130 e PPe6), *Azospirillum* (5SP) e *Herbaspirillum* (198) (Figura 41).

No segundo ensaio, de forma semelhante ao anterior, todas as plantas inoculadas apresentaram um maior acúmulo de massa seca total em comparação às plantas não inoculadas. Maiores contribuições na promoção do crescimento destas plantas foram observadas na inoculação com as bactérias do gênero *Herbaspirillum* (HCC101, HRC54 e HRC50) e *Gluconacetobacter* (PAL3, 4R-2 e 3R-2) (Figura 42).

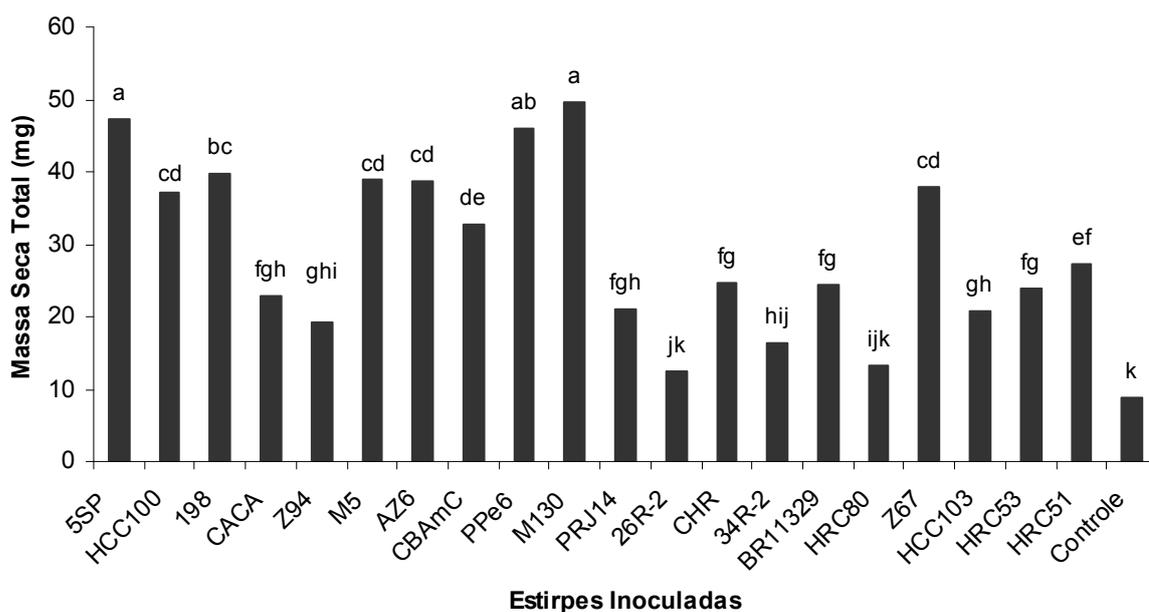
Todas as estirpes das bactérias analisadas nestes dois ensaios foram avaliadas quanto à habilidade de síntese de hormônios vegetais, demonstrando respostas positivas para a produção dos mesmos. Desta forma, os resultados positivos, aqui apresentados para acúmulo de biomassa de plantas inoculadas e crescidas *in vitro*, podem ser resultado de efeitos sinérgicos da ação hormonal e fixação biológica de nitrogênio na promoção do crescimento destas plantas.

Esta interação benéfica foi observada nas primeiras inoculações de bactérias endofíticas em sementes desta cultura, o que possibilitou a colonização da rizosfera e células do córtex de raiz, na base do colmo (SILVA et al., 1999) e promoveu aumento significativo no desenvolvimento radicular destas plantas (Goi et al., 1998).

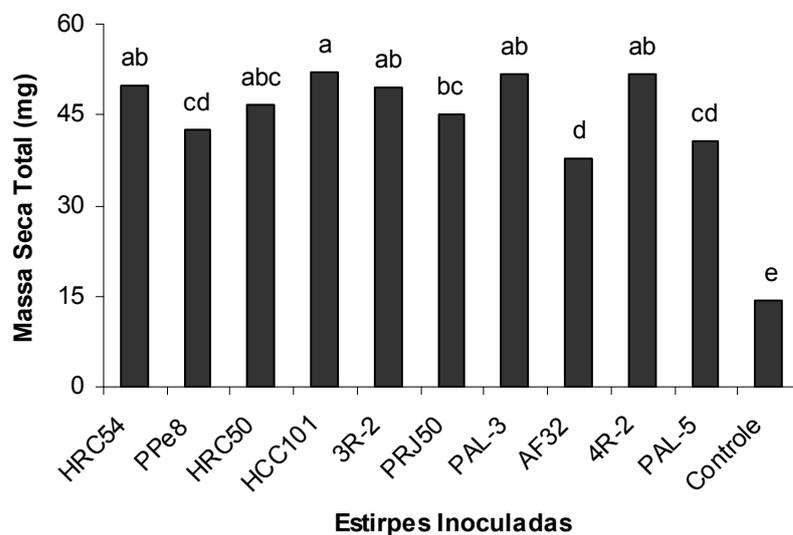
Estas bactérias também foram avaliadas quanto ao potencial de promoção de crescimento de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, onde as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpes PAL3 e PAL5), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) e *Azospirillum amazonense* (CBAmC) foram as que

apresentaram maior efeito no crescimento das plantas analisadas (CANUTO et al., 2003a).

Algumas considerações podem ser feitas em relação às estirpes de bactérias aqui analisadas quanto à promoção de crescimento destas plantas em condições *in vitro*, comparada à avaliação de síntese de substâncias hormonais por estas mesmas bactérias. Assim, nestas avaliações destacaram-se as estirpes 3R-2 e 4R-2 da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* que apresentaram maior produção de compostos indóis e maior promoção do crescimento das plantas inoculadas. Já em relação à estirpe Z94 da espécie *Herbaspirillum seropedicae*, foi a que apresentou a menor produção destes compostos e menor promoção de crescimento das plantas em condições *in vitro*. Por outro lado, as estirpes M130 da espécie *Burkholderia brasilense*, HRC50 e 198 da espécie *Herbaspirillum seropedicae* apresentaram as menores produções de compostos indóis, porém estiveram associadas à maior promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes e crescidas em condições *in vitro*.



**Figura 41:** Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas no acúmulo de massa seca total de plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes, cruzamento Co421 x SP70-1143, aos 70 dias após a inoculação. Dados referentes a 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v: 16,53%. 1º ENSAIO.



**Figura 42:** Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas no acúmulo de massa seca total de plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes, cruzamento Co421 x SP70-1143, aos 70 dias após a inoculação. Dados referentes a 6 repetições. Teste LSD com nível de significância de 5%. c.v: 17,08%. 2º ENSAIO.

#### 4 – CONCLUSÕES

- A bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), quando inoculada na forma suspensão em solução salina ou esta bactéria adicionada do meio de crescimento, promoveu uma maior produção de massa seca de raiz de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.
- Todas as estirpes bacterianas analisadas produziram compostos indóis, numa concentração proporcional às doses de triptofano presente no meio de cultura. As maiores concentrações desses compostos foram obtidas em estirpes da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus*, tanto em meio de cultura líquido quanto semi-sólido.
- Em relação aos gêneros das bactérias analisadas quanto à síntese de compostos indóis em meio de cultura líquido DYGS, as estirpes que se destacaram foram: 198, HCC101 e HCC103 do gênero *Herbaspirillum*; CHR, 3R-2 e 4R-2 do gênero *Gluconacetobacter*; AZ6 do gênero *Azospirillum* e PPe8 do gênero *Burkholderia*. Já em meio semi-sólido, as estirpes com maiores produções foram: HCC100, M5 e HRC54 do gênero *Herbaspirillum*; AF32, 3R-2 e 20F-2 do gênero *Gluconacetobacter*; 5SP do gênero *Azospirillum* e M130 do gênero *Burkholderia*.
- Foram identificados os compostos: ácido indol-3-carboxialdeído, ácido indol-3-acético e ácido indol-3-carboxílico metil éster a partir da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), crescida em meio líquido DYGS e analisada em CG/EM. Esta mesma bactéria, em meio líquido LGI-P, produziu os compostos: ácido indol acético, indol-3-etanamina, indol-5-aldeído e ácido indol acético metil éster.
- Foram identificados os compostos indol-3-carboxialdeído e indol-5-aldeído a partir da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) em meio líquido

DYGS. Esta mesma bactéria produziu o composto ácido indol-3-carboxialdeído em meio líquido JNFB.

- Foram identificadas 18 proteínas com massa molecular entre 20 e 210 kDa, a partir da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54) crescida em meio líquido DYGS. A identidade de duas destas proteínas, revelou similaridade com as proteínas DNA primase de *E. coli* (68 kDa) e proteína M de *Streptococcus pyogenes* (27 kDa).
- Todas as estirpes bacterianas analisadas apresentaram a habilidade de solubilização de fosfato, exceto as estirpes BR11329, 5SP e CBAmC. Estirpes da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* apresentaram maior halo em torno de suas colônias bacterianas em placa de Petri.
- Todas as estirpes bacterianas inoculadas em plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes promoveram um maior crescimento das referidas plantas. Maior destaque foi observado nas plantas inoculadas com as estirpes M130, 5SP, PPe6, 198, HCC101, HRC54, PAL3 e 4R-2.
- As estirpes 3R-2 e 4R-2 apresentaram maior concentração de compostos indóis e maior promoção no crescimento das plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes e crescidas em condições *in vitro*. Respostas inversas foram obtidas com a inoculação da estirpe Z94 nas referidas plantas.
- As estirpes M130, HRC50 e 198 apresentaram as menores produções de compostos indóis. Porém, promoveram um maior crescimento das plantas de cana-de-açúcar oriundas de sementes e crescidas em condições *in vitro*.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**. v. 163, p. 173 – 181.
- ANDRADE, J. C. (1985). Esborço histórico de antigas variedades de cana-de-açúcar. **ASPLANA**, Maceio, Alagoas. 285 pp.
- BACCHI, O. O. S. (1983). Botânica da cana-de-açúcar. In: ORLANDO FILHO, J. **Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil**. Instituto do Alcool e do Açúcar/Planalsucar. Piracicaba. p. 25-37.
- BADENOCH-JONES, J.; SUMMONS, R. E.; DJORDJEVIC, M. A. (1982). Mass spectrometric quantification of índole-3-acetic acid in *Rhizobium* culture supernatants: relation to root hair curling and nodule initiation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 44, n. 2, p. 275 – 280.
- BALDANI, J. I. (1984). **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz**. Itaguaí-RJ, UFRRJ, Tese de Mestrado. 110 pp.
- BALDANI, J. I. e BALDANI, V. L. D. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in gramineaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 77, n. 3, p. 549 – 579.
- BALDANI, J. I.; OLIVEIRA, A. L. M.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D. (2000). Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: The role of endophytic diazotrophs. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, M. G. & NEWTON, W. E., eds. Nitrogen Fixation: from molecules to crop productivity; Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress on Nitrogen Fixation. Foz do Iguaçu. Dordrecht: Kluwer. p. 397 - 400 (Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, 38).
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. (1986). Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 36, p. 86 - 93.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. (1997). Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 29, p. 911 - 922.
- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F.L.; HORSTE, B.; KERSTERE, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M. & DOBEREINER, J. (1996). Inclusion of "*Pseudomonas*" *rubrisulbalbicans*, a mild plant pathogen within the genus *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 46, p. 802 - 810.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. (2002). A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**. v. 29, p. 417 - 423.

BALDANI, V. L. D, OLIVEIRA, E., BALOTA, E. BALDANI, J. I., KIRCHHOF, G., DÖBEREINER J. (1997a). *Burkholderia brasilensis* sp. nov., uma espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 69, p. 116.

BALDANI, V. L. D; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. (1992). Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**. v. 13, p. 65 – 73.

BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. (1980). Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 12, p. 434 – 439.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. (1983). Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 29, p. 869 - 881.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. (1987). Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in **Brazilian Biology and Fertility of Soils**. v. 4, p. 37 - 40.

BALOTA, E. L. (1994). **Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca (*Manihot sculenta* Crantz)**. Itaguaí-RJ, UFRRJ. Tese de Doutorado, 281 pp.

BAR-NESS, E.; HADAR, Y.; SHANZER, A.; LIBMAN, J. (1992). Iron uptake by plants from microbial siderophores. A study with 7-nitrobenz-2 oxa-1,3-diazole-desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. **Plant Physiology**. v. 99, p. 1329 – 1335.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. (2000). Effect of exogenously applied l-trptofano on allelochemical activity of plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Journal of Chemical Ecology**. v. 26, n. 2, p. 343 – 349.

BASHAN, Y. (1996). Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.18, p. 297 - 301.

BASHAN, YOAV. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**. v. 16, n. 4, p. 729 – 770.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. (1998). Production of indole-3-butyric acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**. v. 24, p. 7 – 11.

BATISTA, Q. R.; SOUZA-FILHO, G. A.; OLIVEIRA, M. A.; OLIVARES, F. L. (2002). Efeito da composição do inóculo bacteriano sobre a promoção do crescimento de plantas de cana-de-açúcar. In: FERTIBIO 2002, Rio de Janeiro. Agricultura: Bases

ecológicas para o desenvolvimento social e econômico sustentado.

BELLONE, C. H.; BELLONE, D. V. C.; PEDRAZA, R. O.; MONZON, M. A. (1997). Cell colonization and infection thread formation in sugar cane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 29, n. 56, p. 965 - 967.

BODDEY R. M.; DÖBEREINER J. (1984). Nitrogen fixation associated with grasses and cereals. In: Current Developments. ed Biological Nitrogen Fixation. p. 277 - 313.

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

BODDEY, L. H.; DART, P.; GOI, S. R. & BALDANI, J. I. (1998). Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas no cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 23. Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 7. Simposio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 5., Reunião Brasileira de Biologia do Solo, 2., Caxambu. p. 809.

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

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

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M. PEARCE, D.; PHARIS, R. P. (1989). Identification of gibberellins A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub> and iso A<sub>3</sub> in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**. v. 90, p. 45 – 47.

BRASIL, M. DA S. (2005). **Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz**. Tese de Doutorado - Instituto de Agronomia, UFRRJ, Seropédica, 137p.

BRESSAN, W.; BORGES, M. T. (2004). Delivery methods for introducing entophytic bacteria into maize. **Biocontrol**. v. 29, p. 315 – 322.

BULL, C. T.; WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. (1991). Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopathology**. v. 81, p. 954 - 959.

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

CABALLERO-MELLADO, J.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M. A. (1992). Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis**. v.13, p. 243 - 253.

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

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

CACCIARI, I., LIPPI, D., PIETROSANTI, T. PIETROSANTI, W. (1989). Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic culture of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**. v. 115, p. 151 – 153.

CADERNOS TECNOLÓGICOS. (2004). Produtor de cana-de-açúcar. **Instituto Centro de Ensino Tecnológico**. Fortaleza, 2<sup>a</sup> ed., 64 p.

CANUTO, E. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. (2003). Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 34, suplementos 2, p. 62 - 64.

CANUTO, E. L.; OLIVEIRA, A. M.; BALDANI, J. I. (2000). Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. **Resumo**. Anais da X Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ. v. 10, p. 57 - 58.

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

CARNEIRO JR, J. de B. (2006). **Efeito do tratamento térmico e da inoculação de bactérias endofíticas no controle do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar**. Tese Doutorado. UENF – Campos dos Goytacazes, 92f.

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

CHAVES, A., PEDROSA, E. M. R., CAVALCANTE, J. F. D., ARAÚJO, C. F. S. (2002). Comportamento de variedades comerciais de cana-de-açúcar em relação ao raquitismo da soqueira (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) na região Nordeste do Brasil – Avaliações de cana-planta. VII Congresso Nacional da STAB. Resumo. **Anais do Congresso**, Recife. p. 27 – 34.

CHEN, C.; BAUSK, E. M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZKABANA, R.; KLOEPPER, J. (1995). Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of entophytic bacteria. **Biological Control**. v. 5, n. 1, p. 83 – 91.

CHOWDHURY, M. K. A.; MIAH, M. A. S.; HOSSAIN, M. A. (1997). Effect of salinity on germination, growth sodium and potassium accumulation in sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Indian Journal of Agricultural Science**. v. 68, p. 682 – 683.

CHRISTIANSEN-WENIGER, C. (1998). Entophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin-induced tumors of cereal crops. **Critical Reviews in Plant Science**. v. 17, p. 55 – 76.

Clements, H. F. (1980). **Sugarcane Crop Logging and Control: Principles and Practices**. Pitman Publishing LTDA. The University Press of Havai. 520p.

CONCEIÇÃO, P. M. (2007). **Recobrimento de sementes com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas**. Dissertação de Mestrado, UENF, Campos dos Goytacazes, 110 p.

COPERSUCAR. (2000). Adubação nitrogenada em cana-planta. **Agrícola Informa**. Centro de Tecnologia Copersucar. v. 115, p. 1 - 2.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. (1995). Accumulation of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviews of Microbiology**. n. 21, p. 1 – 18.

CROZIER, A.; ARRUDA, P.; JASMIM, J. M.; MONTEIRO, A. M.; SANDBERG, G. (1988). Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 54, n. 11, p. 2833 – 2837.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. (2001). 16S ribossomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacterial isolated from banana (*Musa* spp.) e abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 5, p. 2375 - 2379.

DEKHIL, S. B.; CAHILL, M.; STACKBRANDT, E.; SLY, L. I. (1997). Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum lagomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 20, p. 72 - 77.

DIAS, F. L. F. (1997). **Relação entre a produtividade, clima, solos, e variedades de cana-de-açúcar na Região Nordeste do Estado de São Paulo**. Dissertação de Mestrado. ESALQ - USP, Piracicaba, 64 p.

DIDONET, A. D.; DIDONET, C. C. G. M. (1998). Caracterização fisiológica, bioquímica e molecular de isolados de *Azospirillum* spp obtidos de raízes de cevada. **Fertbio98**. Interrelação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas:

Consolidando um Paradigma. Caxambu, 11 a 16 de Outubro de 1998. Resumo 056, p. 187.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; THYS, A.; PTACEK, D.; OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. (2002). Effect of inoculation with wild type *A. brasilense* and *A. irakense* strains on development and N-content of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**. v. 36, p. 284 – 297.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHES, A.; TRYS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**. v. 212, p.155 – 164.

DOBEREINER, J. (1992). History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants, **Symbiosis**. v. 13, p. 1 - 13.

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

DONG, Z.; CANNY, M. J.; MCCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. R.; CABADILLA. C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. (1994). A nitrogen-fixing endophytic of sugar cane stems: a new role for the apoplast. **Plant Physiology**. v. 105, p. 1139 - 1147.

ECKERT, B.; WEBER, O. B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITEER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C<sub>4</sub>-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 17-26.

ENYEDI, A. J.; YALPANI, N.; SILVERMAN, P.; RASKIN, I. (1992). Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. **The Cell**. v. 70, p. 879 – 886.

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

FAGES, J. (1990). An optimized process for manufacturing an *Azospirillum* inoculant for crop. **Applied Microbiological and Biotechnology**. v. 32, p. 437 – 478.

FAGES, J. (1992). An industrial view of *Azospirillum* inoculants: formulation and application technology. **Symbiosis**. v. 13, p. 15 – 26.

FAGES, J.; MULARD, D. (1988). Isolement de bactéries rhizosphériques et effect de leur inoculation and pots chez *Zea mays*. **Agronomie**. v. 8, p. 309 - 315.

FALLIK, J.; OKON, Y. (1996). The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology**. v. 2, p. 511 - 515.

FERREIRA, A. C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A. R. V.; DÖBEREINER, J. (1995). Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: International symposium on sustainable agriculture for the tropics – the role of biological nitrogen fixation, 1995, Angra dos Reis, R.J. **Abstracts**. Embrapa-cnnpab/UFRRJ/the brazilian academy of Sciences, 210.

FERREIRA, F. P. (2002). **Promoção de crescimento de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (Híbridos interespecíficos de *Saccharum*) por bactérias diazotróficas endofíticas**. Dissertação de Mestrado, UENF, Campos dos Goytacazes, 68 f.

FERREIRA, J. S.; SABINO, D. C. C.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. (2003). Seleção de veículos para o preparo de inoculante com bactérias diazotróficas para arroz inundado. **Agronomia**. v. 37, n. 2, p. 06 – 12.

FRANKE, I. H.; FEGAN, M.; HAYWARD, A. C.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L. I. (1999). Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugarcane and from the pink sugarcane mealy bug. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 49, p. 1681 - 1693.

FREY-KLETT, P.; CHURIN, J.; PIERRAT, J.; GARBAYE, J. (1999). Dose effect in the dual inoculation of an ectomycorrhizal fungus and a mycorrhiza helper bacterium in two forest nurseries. **Soil Biology and Biochemistry**. n. 31, p.1555 - 1562.

FUENTES-RAMÍRES, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J., SEPÚLVEDA, J. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. (1999). Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, p.117 - 128.

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

FUENTES-RAMIREZ, L. E.; JIMENES-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R. & CABALLEIRO-MELLADO, J. (1993). *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. **Plant and Soil**. v. 154, p. 145 - 150.

GILLIS, M.; DOBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. (1991). Taxonomic relationships between (*pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (ef group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*aquaspirillum*) *autrophicum*. **Abstract** In: nitrogen fixation (M, POLSINELLI, R; MATERASSI AND M. VICENZI, EDS), kluwer academic publishers. p. 292 - 294.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOET, D. B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S. & DOBEREINER, J. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp nov., a acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 39, p. 361 - 364.

GLICK, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 41, p. 109 – 117.

GLICK, B. R.; PATTEN, C. L.; HOLGUIM, G. PENROSE, D. M. (1999). **Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria**. Imperial College Press. Waterloo, Ontario, Canada, 267p.

GOI, S. R. SILVA, R. A. DA, BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. (1998). Influência da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas na formação de pêlos radiculares de cana-de-açúcar. **Resumo In: Fertbio 98. Interrelação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas: Consolidando um Paradigma**. Caxambu. p. 432.

GOLDSTEIN, A. H. (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate Solubilization by Gram negative bacteria. **Biological Agriculture & Horticulture**. v. 12, p. 185 – 193.

GORI, A.; FAVILLI, F. (1995). First results on individual and dual inoculation with *Azospirillum-Glomus* on wheat. In **Azospirillum VI and related microorganisms, genetics – physiology – ecology**, I. Fendrik, M. Del Gallo, J. Vanderleyden and M. Zamaroczy (eds). v. G37, p. 245 – 249.

GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. (2003). Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas em arroz de sequeiro. **Agronomia**. v. 37, n. 2, p. 25 – 30.

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

HOLGUIN, G.; BASHAN, Y. (1996). Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-inoculated with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.) **Soil Biology and Biochemistry**. v. 28, p. 1651 – 1660.

IBGE (2008). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Sistema IBGE de recuperação automática – **SIDRA**. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/default.asp?o=20&i=P>. Acesso em: 12/02/2008.

ISLAM, N., BORA, L. C. (1998). Biological management of bacterial leaf blight of rice (*Oryza sativa*) with plant growth promoting rhizobacteria. **Indian Journal of Agricultural Science**. v. 68, p. 798 – 800.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. (1998). Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 17. p. 77 - 119.

JAMES, E. K., REIS, V. M., OLIVARES, F. L., BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J. (1994). Infection of sugar cane by the nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**. v. 45, p. 757 – 766.

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

JANZEN, R. A., ROOD, S. B., DORMAAR, J. F., MCGILL, W. B. (1992). *Azospirillum brasilense* produces gibberellin in pure on chemically-defenid medium and in co-culture on straw. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 24, p. 1062 – 1064.

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

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

KIRCHHOF, G., SCHLOTTER, M., AßMUS, B. & HARTMANN, A. (1997). Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 29, p. 853 - 862.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. (2001). *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing a bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 157 - 168.

KLOEPPER, J. W.; QUAD-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; HALLMANN, J. (1997). Recent studies on the microbial ecology of bacteria endophytes in plants. In: Congresso Brasileiro de Ciência do solo, 26. Rio de Janeiro, 1997. **Resumos**. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo, CD-ROM.

KOZYROVSKA, N.; KOVTUNOVYCH, G.; GROMOSOVA, E.; KUHARCHUK, P.; KODYUM, V. (1996). Novel inoculants for an environmentally-friendly crop production. **Resources, Conservation and Recycling**. v. 18, p. 79 – 85.

LADHA, J. K.; BARRAQUIO, W. L.; WATANABE, I. (1983). Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter clocae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants **Canadian Journal of Microbiology**. v. 29, p. 1301 – 1308.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERELEYDEN, J. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 298 – 300.

LEE, S.; FLORES-ENCARNACIÓN, M.; CONTRERAS-ZENTELLA, M.; GARCIA-FLORES, L.; ESCAMILLA, J. E; KENNEDY, C. (2004). Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations

in cytochrome *c* biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**. v. 186, n. 16, p. 5384 – 5391.

LI, C. Y.; MASSICOTE, H. B.; MOORE, L. V. H. (1992). Nitrogen-fixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae. **Plant and Soil**. v. 140, p. 35 – 40.

LI, R. O.; MACRAE, I. C. (1991). Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 24, p. 413 - 419.

LINGLE, S. E.; WIEDENFELD, R. P.; IRVINE, J. E. (2000). Sugarcane response to saline irrigation water. **Journal of Plant Nutrition**. v. 23, p. 469 – 486.

LUCCHESI, A. A. (1987). Fatores da Produção Vegetal. In: Castro, P. R. C.; Ferreira, S. O.; Yamada, T. Ecofisiologia da Produção Agrícola. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato. p. 1 -11.

MACEDO, I. C.; KOLLER, H. W. (1997). Balanço de energia na produção de cana-de-açúcar e álcool nas usinas cooperadas em 1996. International Report, Centro de Tecnologia Coopersucar, Piracicaba – SP, 23p.

MAGALHÃES, F. M., BALDANI, J. I., SOUTO, S. M., KUYKENDALL, J. R.; DOBEREINER, J. (1983). A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Academia Brasileira de Ciências**. v. 55, p. 417 - 430.

MARTÍNEZ-MORALES, L. J.; SOTO-URZÚA, L.; BACA, B. E.; SÁNCHEZ-AHÉDO, J. A. (2003). Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 228, p. 167 – 173.

MARTÍNEZ-TOLEDO, M. V.; SALMERON, V.; GONZALEZ, J. (1988). Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococum*. **Plant and Soil**. v. 110, p. 149 -152.

MATTOS, A. R. (1942). Açúcar e Álcool no Brasil. Biblioteca Pedagógica Brasileira, série 4-A, vol. 5. **Companhia Editorial Nacional**. 221 pp. São Paulo.

MILES, A. A.; MISRA, A. A. (1938). The estimation of the bactericidal power of blood. **Journal Hygiene**. v. 38, p. 732 - 749.

MINAMISAWA, K.; OGAWA, K.; FUKUHARA, H.; KOGA, J. (1996). Indolepyruvate pathway for indole-3-acetic acid biosynthesis in *Bradyrhizobium elkanii*. **Plant Cell Physiology**. v. 37. n. 4, p. 449 – 453.

MIOCQUE, Y. J. (1993). **Origem e historia da cana-caiana. Álcool e Açúcar**. n. 65, p.18 - 24.

MORAES, V. A DE & TAUKE-TORNISIELO, S. M. (1997). Efeito da inoculação de *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) variedade SP 70-1143, a partir de cultura de meristemas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, Rio de Janeiro. **Resumos**. Rio de Janeiro, SBM. p. 215.

MORAES, V. A. (1995). **Efeito da inoculação da *Acetobacter diazotrophicus* na produtividade da cana-de-açúcar variedade SP 70-1143**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro-SP, 112p.

MORIS, R. O. (1986). Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 37, p. 509 – 538.

MÜLLER, A.; WEILER, E. W. (2000). IAA-synthase, an enzyme complex from *Arabidopsis thaliana* catalyzing the formation of indole-3-acetic acid from (S)-tryptophan. **Biology and Chemistry**. v. 381, p. 679 – 686.

MUÑOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. (2003). Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane and its effect on plant growth. **Microbial Ecology**, v. 46, p. 454-464, 2003.

MURASHIGE, T & SKOOG, F.A. (1962). Revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**. v. 15, p. 473 - 497.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. (1999). Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**. v. 29, p. 157 – 164.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LOGANATHAN, P. (2002). Effect of inorganic N on the population, *in vitro* colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (syn *Gluconacetobacter diazotrophicus*). **Plant and Soil**. v. 243, p. 91 – 102.

NEJAD, P.; JOHNSON, P. A. (2000). Entophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oil seed rape and tomato. **Biological Control**. v. 18, p. 208 – 215.

NORMANLY, J. (1997). Auxin metabolisms. **Plant Physiology**. v. 100, p. 431 – 442.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. (1994). Agronomic applications of *Azospirillum* – an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 26, p. 1591 - 1601.

OKON, YACOV & ITZIGSOHN, ROBIN. (1995). The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. **Biotechnology Advances**. v. 13, n. 3, p. 415 – 424.

OLIVARES, F. L. (1997). **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. Tese de Doutorado - Ciência do Solo – UFRRJ. 328 p.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D., REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots,

stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**. v. 21, p. 197 - 200.

OLIVARES, F. L.; FERREIRA, F. P.; SILVA, L. G.; FAÇANHA, A. R.; RAMOS, A. C.; NETTO, A. T.; CAMPOSTRINI, E.; REIS, V. M.; MIGUENS, F. C. (2002). Physiological changes induced on the host plant during the endophytic interaction between sugar cane and diazotrophic bacteria. **Abstract** In: 9<sup>th</sup> International Symposium on Nitrogen Fixation with non-legumes.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. (2003). Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 34, p. 59 – 61.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; SILVA, E. E.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. (2004). Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 35, p. 295 – 299.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. (2006). Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n.1-2, p.23 - 32.

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

OLIVEIRA, E. (1992). **Estudo de associação entre bactérias diazotróficas e arroz**. Dissertação de Mestrado, UFRRJ, Itaguaí-RJ, 96p.

ONA, O.; IMPE, J. V.; PRISEN, E.; VANDERLEYDEN, J. (2005). Growth and incole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEEMS Microbiology Letters**. v. 246, p. 125 – 132.

ORLANDO-FILHO, J., HAG, H. P., ZAMBELLO, E. JR. (1980). Crescimento e absorção de macro nutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função de idade em solo do Estado de São Paulo. **Bol. Técnico nº 2**, 128p., Planalsucar, SP.

ORTEGA, E.; RODÉS, R.; FUENTE, E.; FERNÁNDEZ, L. (2001). Does the routine treatment of sugarcane stem pieces for xylem pathogen control affect the nitrogenase activity of na N<sub>2</sub>-fixing endophyte in the cane. **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 28, p. 907 – 912.

OSTIN, A. KOWALCZYK, M., BHALERAO, R. P., SANDBERG, G. (1998). Metabolismo f índole-3acetic acid in Arabidopsis. **Plant Physiol**. v. 118, p. 285 – 296.

PAREDES-CARDONA, E.; CARCANO-MONTIEL, M.; MASCARUA-ESPARZA, M.; CABALLERO-MELLADO, J. (1988). Respuesta del maiz a la inoculacion com *Azospirillum brasilense*. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**. v.30, p. 351 - 355.

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

PAUL, E.; FAGES, J.; BLANC, P.; GOMA, G.; PAREILLEUX, A. (1993). Survival of alginate-entrapped cells of *Azospirillum lipoferum* during dehydration and storage in relation to water properties. **Applied Microbiological and Biotechnology**. v. 40, p. 34 – 39.

PEDRAZA, R. O.; RAMÍREZ-MATA, A.; XIQUEU, M. L.; BACA, B. E. (2004). Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEEMS Microbiology Letters**. v. 233, p. 15 – 21.

PERIN, L. (2003). **Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)** Dissertação de Mestrado - Ciências do Solo – UFRRJ. Seropédica, 68 f.

PERIN, L. (2007). **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. Tese de Doutorado – Ciência do Solo – UFRRJ. Seropédica, 103 p.

PIMENTEL GOMES, F.; LIMA, U. A. (1964). A cana-de-açúcar no mundo. In: **Cultura e Adubação da Cana-de-Açúcar**, Instituto Brasileiro de Potassa (Ed.). São Paulo: Editora Peri Ltda. p. 11 - 26.

PIÑÓN, D.; CASA, M.; BLANCH, M.; FONTANIELLA, B.; BLANCO, Y.; VICENTE, C.; SOLAS, M. T.; LEGAZ, M. E. (2002). *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugarcane endosymbiont produces bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugarcane pathogen. **Research in Microbiology**. v. 153, p. 345 – 351.

PINTO, E. DE S. L. (1965). **Cana-de-açúcar**. Estudos Brasileiros n. 22. Serviço de Informação Agrícola-Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, p. 50.

POCHON, J, e TARDIEUX, P. (1962). **Techniques D'Analyse en Microbiologie du Soil**. St. Mandé (Sein): Editions de la Tourelle, 105 p.

POLIDORO, J. C. (2001). **O molibdênio na nutrição nitrogenada e na contribuição da fixação biológica do nitrogênio associada à cultura da cana-de-açúcar**. Seropédica-RJ, UFRRJ, 185 pp. Tese de Doutorado.

PRINSEN, E.; COSTACURTA, A.; MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; VAN ONCKELEN, H. (1993). *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Molecular Plant Microbial Interactions**. v. 6, p. 609 – 615.

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. (1997). Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 43, p. 577 – 582.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. (2002). Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbasprillum* spp. **Symbiosis**. v. 32, p. 39 – 54.

REBAH, F. B.; PRÉVOST, D.; YEZZA, A.; TYAGI, R. D. (2007). Agro-industrial waste materials and wastewater sludge for rhizobial inoculant production: a review. **Bioresource Technology**. v. 98, p. 3535 – 3546.

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

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. (1998). Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 17, n. 1, p. 29 - 54.

REIS JR., F. B. (2002). **Ecologia e diversidade de bactérias do gênero *Azospirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria* spp.** Tese de Doutorado - UFRRJ, Seropédica, 98 p.

REIS JR., F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. (2000). Ocorrência de bactérias em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 35, p. 985 – 994.

REIS, V. DOBEREINER, J. (1998). Effect of high sugar concentration on nitrogenase activity of *Acetobacter diazotrophicus*. **Archives of Microbiology**. v. 171, p. 13 - 18.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. (2000). Biological Dinitrogen Fixation in Gramineae and Palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**. v.19, p. 227 - 247.

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

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DOBEREINER, J. (1994). Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 10, p. 101 – 104.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; OLIVEIRA, A. L. M. (1999). Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. **Plant and soil**. v. 206, p. 205 – 211.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. (2006). Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: Nutrição

Mineral de Plantas. Fernandes, M. S. (Ed.). **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa-MG, cap. VI, p. 153 – 174.

RODRIGUES, L. da S. (2004). **Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado**. Tese de Doutorado - Ciência do Solo, UFRRJ, 94 f.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**. v. 17, p. 319 – 339.

ROESCH, L. F. W.; QUADROS, P. D.; CAMARGO, F. A. O.; TRIPLET, E. W. (2007). Screening of diazotrophic bacteria *Azospirillum* spp. for nitrogen fixation and auxin production in multiple fields sites in southern Brasil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 23, p. 1377 - 1383.

SAMPAIO, E. V. S. B., SALCEDO I. H., BETTANY, J. (1984). Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I – Eficiência na utilização de uréia ( $^{15}\text{N}$ ) em aplicação única ou parcelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.19, p. 943 – 949.

SANTOS, C. C. R. DOS; PERIN, L.; BALDANI, J. I. E REIS, V. M. (2006). Isolamento de *Gluconacetobacter* spp. em diferentes tipos de solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 4, n. 1, p. 85 – 92.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. (2007). Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere**. v. 66, p. 1794 – 1798.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. (1995). Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**. v. 20, p. 282 – 285.

SCHLOTTER, M.; HARTMANN. (1998). Entophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain specific monoclonal antibodies. **Symbiosis**. v. 5, p. 159 – 179.

SERGEEVA, E.; LIAIMER, A.; BERGMAN, B. (2002). Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. **Planta**. v. 215, p. 229 – 238.

SEVILLA, M.; KENNEDY, C. (2000). Colonization of rice and other cereals by *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. In: **The Quest for Nitrogen Fixation in Rice**. J. k. Ladha and P. M. Reddy, Eds. International Rice Research Institute, The Philippines.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. (2001). Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $^{15}\text{N}$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif*-minus mutant strains. **Molecular Plant Microbe Interaction**. v. 14, n. 3, p. 358 – 366.

SHEARER, G.; KOHL, D. H. (1986).  $\text{N}_2$  fixation in field settings: estimations based on natural  $^{15}\text{N}$  abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**. v. 13, p. 699 - 756.

SIEVERS, M.; SCHLEGEL, H.; CABALLERO-MELLADO, J.; DOBEREINER, J. (1998). Phylogenetic identification of two mayor nitrogen-fixing bacteria associated with sugarcane. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 21, p. 505 – 508.

SILVA FILHO, G. N. (1998). **Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo**. Tese de Doutorado, UFRGS, Porto Alegre, 140 p.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. (2002). Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 37, n. 6, p. 847 - 854.

SILVA, L.G. (1999). **Estudos de colonização em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) por *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* utilizando técnicas imunológicas**. Dissertação de Mestrado, UFRJ, Seropédica, 144 f.

SILVA, L.G. (2005). **Aspectos estruturais da interação de bactérias diazotróficas endofíticas e cana-de-açúcar (*Saccharum* *hyb.*)**. Tese de Doutorado, UENF, Campos dos Goytacazes, 192p.

SILVA, R. A. DA; BRASIL, M. S.; GUIMARÃES, S. L.; GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D. (1999). Infecção e colonização de plântulas de cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas endofíticas em vasos de Leonard. **Resumo** In: XX Congresso de Microbiologia. BA, p. 296.

SILVA, R. A. DA; GUIMARÃES, S. L. (1998). Desenvolvimento de plântulas de cana-de-açúcar proveniente de sementes botânicas “*in vitro*” e infecção e colonização de suas raízes por bactérias diazotróficas endofíticas. **Resumo** In: VIII Jornada científica na UFRRJ – RJ.

SINGH, M. S., DEVI, R. K. T., SINHG, N. I. (1999). Evaluation of methods for Azotobacter application on the yield of rice. **Indian Journal of Hill Farming**. v. 12, p. 22 – 24.

SMITH, R. S. (1992). Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 485 – 492.

SMITH, R. S. (1995). Inoculant formulations and applications to meet changing needs. In: **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. I. A. TIKHONOVICH, N. A. PROVOROV, V. I. ROMANOV and W. E. NEWTON (eds), Kluwer Academic Plubishers, p. 653 – 657.

SOMERS, E.; PTACEK, D.; GYSEGOM, P.; SRINIVASAN, M.; VANDERLEYDEN, J. (2005). *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n. 4, p. 1803 – 1810.

SUNDARA, B. (1985). Effect of levels of phosphorus and potassium and their late application on sugarcane. **Indian Journal Agronomy**. v. 30, p. 124 – 127.

SUNDARA, B.; NATARAJAN, V.; HARI, K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. **Field Crops Research**. v. 77, p. 43 – 49.

TARRANT, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 24, 967 - 980.

TEJERA, N.; ORTEGA, E.; RODES, R.; LLUCH, C. (2006). Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: Some implications in the association with endophytes. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 80 - 85.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**. v. 37, p. 1016 – 1024.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; EGGENBERG, P.; BIRO, B. (2000). Synergistic and antagonistic effects of Arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfalfa, probed by the polyphasic chlorophyll a fluorescent transient O-J-I-P. **Applied Soil Ecology**. v. 15, p. 169 – 182.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. (1992). Contribution of nitrogen-fixation to sugarcane: nitrogen 15 and nitrogen balance estimate. **Soil Science Society of American Journal**. v. 56, p. 105 - 114.

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

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

VEGA-HERNÁNDEZ, M. C., LÉON-BARRIOS, M., PÉREZ-GALDONA, R. (2002). Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium*. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 34, p. 665 – 668.

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

VESSEY, J. K. (2003). Plant growth promotion rhizobacteria as biofertilizer. **Plant and Soil**. v. 255, p. 571 – 586.

WHITE, F. F.; NESTER, E. W. (1980). Hairy root: plasmids encode virulence traits in *Agrobacterium rhizogenes*. **Journal Bacteriological**. v. 141, p. 1134 – 1141.

WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. (2005). Auxin: regulation, action and interaction. **Annals of Botany**. v. 95, p. 707 – 735.

XAVIER, R. P. (2002). **Adubação verde em cana-de-açúcar: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita**. Dissertação de Mestrado, UFRRJ, Seropédica, 98 f.

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

YAMADA, Y.; HOSHINO, K. I.; ISHIKAWA, T. (1997). The phylogeny of acetic acid based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 8, p. 1244 -1251.

ZAKHAROVA, E. A., SHCHERBAKOV, A. A., BRUDNIK, V. V. (1999). Biosynthesis of indole-3acetic acid in *Azospirillum brasilense* insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**. v. 259, p. 572 – 576.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)