

**JADSON EMANUEL LOPES ANTUNES**

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM CANA DE AÇÚCAR:  
ESTRATÉGIA PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL**

**RECIFE-PE  
2016**

**JADSON EMANUEL LOPES ANTUNES**

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM CANA DE AÇÚCAR:  
ESTRATÉGIA PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo - Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências do Solo.

Orientadora: Márcia do Vale Barreto Figueiredo, D.Sc.  
Co-orientadores: Ana Dolores Santiago de Freitas, D.Sc.  
Ademir Sérgio Ferreira de Araújo, D.Sc.

**RECIFE-PE  
2016**

Tese ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor Ciências do Solo.

Tese aprovada em 25/02/2016

---

Jadson Emanuel Lopes Antunes

---

Márcia do Vale Barreto Figueiredo, D.Sc.  
Orientadora  
Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA/SEAGRI

**Banca examinadora**

---

Ademir Sérgio Ferreira de Araújo, D.Sc.  
Universidade Federal do Piauí – UFPI/Departamento de Engenharia  
Agrícola e Solos

---

Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra, D.Sc.  
Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA

---

Giselle Gomes Monteiro Fracetto, D.Sc.  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE/Departamento  
de Agronomia

---

Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva, D.Sc.  
Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA

**Ofereço,**

A meus Pais **José de Ribamar Antunes Ribeiro** e **Maria do Desterro Lopes Antunes**, aos meus irmãos **Jayro Antunes** e **Janderson Antunes**, as sobrinhas **Maria Júlia e Maria Alice** pela vida, carinho, amizade, ajuda, conselhos, energia, compreensão, dedicação e muito amor.

A minha base familiar, que tenho muito orgulho aos Lopes & Antunes.

**Dedico,**

A minha Amada **Louise Oliveira**,

Começamos enamorados, noivos e agora casados, com fé em Deus eternamente seremos. Não há palavras que expresse o meu amor e agradecimento a você, muito obrigado pelo amor dedicado, pela confiança e principalmente pela paciência e compreensão que teve comigo durante esses quatro anos de curso, e acima de tudo em acreditar em mim, até mesmo mais que eu mesmo, meu muito obrigado, com você esta batalha tornou-se menos árdua, te amo. Tu és responsável pelo meu maior presente, por meu maior sonho nesta vida, o de ser Pai, que nossa Ana Clara venha cheia de saúde e com muita luz para nosso convívio.

Amo-as

### **Agradecimento Especial,**

Não poderia de deixar meu agradecimento em especial a minha Professora, ou melhor, a minha “Mestra” Dra. **Márcia do Vale Barreto Figueiredo**, que poderia ser uma simples professora, mas não, preferiu atuar como mestre para transferir-nos seus conhecimentos e experiências, foi amiga, soube cobrar, conselheira, psicóloga, sensata em suas decisões, em sua amizade foi compreensiva e nos incentivou a seguir o nosso caminho, e nunca, mas nunca mesmo desistir de nossos sonhos. Aqui expresso meu imenso agradecimento e profundo respeito, que serão poucos diante de tudo que já fizeste por seus discípulos, ou melhor, orientandos e/ou amigos.

Muita Luz para a senhora e que o Divino Espirito Santo sempre lhe guarde e proteja.

O senhor é o meu Pastor  
E nada me faltará  
Deitar me faz em verdes pastos  
Guia-me as águas tranquilas  
Refrigera a minha alma  
Guia-me pelas veredas da justiça por amor do seu nome

Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte  
Não temeria mal algum  
Porque estás comigo

Tua vara e o teu cajado me consolam  
Preparas-me uma mesa na presença dos meus inimigos

Unge minha cabeça com óleo  
E o meu cálice transborda  
Certamente que a bondade e a misericórdia  
Me seguirão por todos os dias da minha vida

E habitarei na casa do Senhor para todo sempre  
Amém!

**Salmo 23**

## AGRADECIMENTOS

São muitos e muitos a agradecer!

Começarei pela mola mestra que me faz pulsar, meu Deus meu muito obrigado pela existência, pelo fortalecimento diante dos inúmeros obstáculos a serem alcançados, pela fé e confiança, e principalmente pela bela família que puseste em minha vida.

À minha orientadora Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo pela confiança plena, pelos ensinamentos repassados, pela luz que transfere a seus orientandos, lembrarei sempre dessa frase: - “Muitos são professores, poucos são mestres...” aprendi com ações e exemplo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de Doutorado pleno nacional e Doutorado Sanduíche (processo 7284/2014-04).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro para a realização dos experimentos.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas, pela disposição em ajudar, não medindo esforço para a realização dessa Tese, pelos ensinamentos, orientações e análises de <sup>15</sup>N.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo, pelo incentivo, amizade e por intermediar contato com outros pesquisadores.

A Pesquisadora Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra do IPA, pela amizade, conselhos, ajuda e principalmente pelos ensinamentos repassados e pela ponte com a Universidade de Sevilla.

Ao Pesquisador Dr. José de Paula Oliveira, por não mediu esforços para realização desse trabalho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo (PPGCS), pela oportunidade de realização desse curso de Doutorado.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), pela utilização dos Laboratórios de Biologia do Solo e Genômica.

A Estação Experimental de Itapirema, do IPA, por proporcionar a instalação dos experimentos de campo.

Ao pesquisador Manoel Américo de Carvalho Fonseca, chefe de Estação Experimental Itapirema, do IPA em Goiana-PE, por sempre está disposto a ajudar.

Ao Técnico Agrícola Miguel pelo acompanhamento do experimento em campo e pelos conhecimentos repassados.

A usina Santa Teresa pelas análises industriais da cana-de-açúcar.

Aos Docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, em especial: Prof. Dr. Brivaldo Almeida, Profa. Dra. Carolina Etienne, Profa. Dra. Caroline Biondi, Prof. Dr. Clistenes Williams, Prof. Dr. Emidio Cantídeo, Profa. Dra. Maria Betânia Freire, Prof. Dr. Newton Stamford e Profa. Dra. Julia Kuklinsky Sobral.

A todos os colegas da Pós-Graduação em Ciências do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial Adiel Silva, Thiago Lira e Renisson Neponuceno pelas noites em claro estudando e pela mão de obra barata e qualificada nos experimento de campo.

Ao amigo, irmão Prof. Dr. Douglas Barbosa, pelo convívio durante os primeiros anos de curso, pela amizade e pela sempre disposição em ajudar nos esclarecimentos estatísticos e com dicas valiosas nas análises.

As amigas Dra. Esmeralda Lopes e Dra. Marta Amâncio pela amizade e ajuda mútua.

A Universidade de Sevilla pela oportunidade de realização do Doutorado Sanduíche.

Ao meu supervisor de estágio sanduíche Prof. Dr. Francisco Javier Ollero Márquez, Catedrático Diretor do Departamento de Microbiologia da Universidade de Sevilla-Espanha,

pela oportunidade de repassar seus conhecimentos não medindo esforços para a continuidade dessa Tese.

Aos colegas da Universidade de Sevilla, em especial a Esaú Megias Saavedra e José Jesús Gallego Parrilla durante o estagio Sanduiche, pelas valiosas ajudas nas análises moleculares e, sobretudo pelos momentos de distração e convívio social.

A Isamar Moyano Bravo, pela ajuda nas análises bioquímicas realizadas na Universidade de Sevilla.

Aos alunos de iniciação científica, da graduação em Engenharia Agrônômica da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Fábio e Augustos Cesar pela ajuda indispensável na condução do experimento em campo.

Ao colega Engenheiro Agrônomo Leonam Silva, pelos esclarecimentos dos processos que englobam a produção de cana-de-açúcar e suas qualidade tecnológicas.

Aos funcionários da UFRPE Maria do Socorro e Josué, pelo respeito e dedicação para com nós alunos.

Aos amigos do Laboratório de Genômica do IPA, Dra. Adália Mergulhão e Dra. Maria Luiza Bastos pelo incentivo e colaboração na realização dos trabalhos dessa Tese.

A Marilene Pimentel e Sandra Mendes, do Laboratório de Análise de Planta, Ração e Água (LAPRA) do IPA pela colaboração nas análises de nitrogênio.

Aos amigos do Laboratório de Biologia do Solo do IPA: Maria Vanilda Santana (Bahiana, uma Mãe que tive durante todos esses anos longe do seio familiar), Rogério Portela, Carolina Kropniczk, Alexandra Andrade, Josemir Ferreira e Mário Leandro, pelo convívio, ajuda, colaboração, conversas, distrações entre as análises laboratoriais.

A minha querida amiga de bancada, Maria do Carmo Barreto (Carminha), meu muito obrigado pelo incentivo e confiança a mim dedicados.

Ao Pesquisador Dr. Venézio Felipe dos Santos do IPA, pelos esclarecimentos estatísticos.

Ao Sr. Eduardo Ferreira, colega de viagem, que esteve sempre pronto para conduzir-nos entre Recife e Goiana-PE, para avaliação de experimentos no campo.

Aos meus pais Antunes e Desterro, pelo exemplo de vida, dedicação e honestidade a ser seguido e a compreensão pelas minhas ausências; minha gratidão pela oportunidade que me deram de buscar o conhecimento, como forma de conquistar meus sonhos e tornar-me um homem melhor a cada dia.

Aos meus irmãos Jayro Antunes e Janderson Antunes, que sempre me apoiaram nos meus estudos.

As minhas cunhadas Kerlanne Antunes e Glaucia Bethânia pelo apoio incondicional.

As minhas princesas, minhas sobrinhas Maria Júlia e Maria Alice que no final dessa fase vieram me visitar e oxigenar minhas ideias, vocês são luz sempre em meu caminho, amoras.

Aos meus Sogra e Sogra: Carlos Haroldo e Eliane Oliveira, pelo incentivo, confiança e amizade construída.

A todos que estiveram envolvidos indiretamente neste trabalho, para que houvesse êxito.

Meu muito obrigado!



## SUMÁRIO

Lista de tabelas e Quadro.....	xi
Lista de figuras .....	xiii
Lista de Apêndices.....	xv
RESUMO GERAL .....	xvii
GENERAL ABSTRACT.....	xix
1 Introdução Geral .....	21
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	24
2.1 A cana-de-açúcar ( <i>Saccharum</i> spp.).....	24
2.2 Fixação Biológica do Nitrogênio.....	26
2.3 Bactérias promotoras de crescimento de plantas.....	28
2.4 Identificação de Bactérias Diazotróficas .....	31
2.5 Quantificação da contribuição da fixação biológica de nitrogênio .....	34
3. REFERÊNCIAS .....	37
Parte I.....	52
CARACTERIZAÇÕES MORFOFISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM CANA-DE-AÇÚCAR.....	52
1 INTRODUÇÃO.....	54
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
2.1 Coleta do material vegetal e isolamento de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar... 56	
2.2 Caracterizações morfológica e fisiológica das colônias.....	57
2.3 Caracterização bioquímica .....	57
2.4 Caracterização genética .....	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	61
3.1 Obtenção dos isolados bacterianos .....	61
3.2 Caracterizações morfofisiológica e bioquímica dos isolados endofíticos .....	62
3.3 Coloração de Gram.....	65
3.4 Avaliação da qualidade da extração do DNA genômico dos isolados bacterianos .....	66
3.5 Caracterização da diversidade genotípica pela amplificação do elemento BOX.....	66
3.6 Caracterizações fisiológica e bioquímica das bactérias endofíticas selecionadas por BOX-PCR.....	70

3.7 Avaliação da capacidade de solubilização do fosfato .....	77
3.8 Avaliação da produção de ácido-indol-3-acético (AIA) e atividade de redução do acetino (ARA) .....	79
3.9 Sequenciamento .....	83
3.9.2 Comparação das sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA ribossomal dos isolados sequenciados .....	83
4 CONCLUSÕES .....	93
5 REFERÊNCIAS .....	94
Parte II .....	112
INOCULAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS .....	112
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	115
2.1 Local do experimento e caracterização do solo .....	115
2.2 Correção e adubação do solo para cana-planta .....	117
2.3 Delineamento experimental .....	117
2.4 Descrição dos tratamentos e preparo dos inoculantes .....	117
2.5 Variedade de cana-de-açúcar utilizada no experimento .....	119
2.6 Processo de inoculação e plantio dos toletes no campo .....	119
2.7 Adubação e reinoculação da soqueira .....	119
2.8 Colheita e avaliações .....	120
2.9 Estimativa das quantidades de N fixado pela cana-de-açúcar .....	120
2.10 Análise dos dados .....	121
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	121
5 REFERÊNCIAS .....	139

## Lista de tabelas e Quadro

### Parte I

<b>Tabela 1</b>	Meios de cultivo (semissólido e sólido) sem adição de nitrogênio utilizados para o isolamento, purificação e armazenamento de bactérias diazotróficas endofíticas.....	57
<b>Table 2</b>	Caracterizações morfológicas dos isolados de colmo e folha de cana-de-açúcar: forma, cor, borda, superfície, transparência e tamanho da colônia.....	63
<b>Tabela 3</b>	Caracterizações fisiológicas dos isolados de colmo e folha de cana-de-açúcar: tempo de crescimento, formação ácido/álcali, produção de muco, volume de muco.....	64
<b>Tabela 4</b>	Coloração de Gram dos isolados endofíticos de colmo e folha de cana-de-açúcar, oriundos da cultivar RB92579.....	65
<b>Tabela 5</b>	Produção de urease (URE); protease (PRO); amilase (AMI); lipase (LIP); quitinase (QUI); solubilização de fosfato (NBRIP); sideróforo (SID); ACC deaminase (ACC); N-acil-homoserina lactona (AHL); catalase (CAT) e gelatinase (GEL) de isolados bacterianos de cana-de-açúcar.....	76
<b>Tabela 6</b>	Índice e tempo de solubilização de fosfato para os isolados endofíticos de cana-de-açúcar.....	78
<b>Tabela 7</b>	Análises quantitativas da produção de ácido-indol-3-acético (AIA) e atividade da nitrogenase pela redução do acetino (ARA) de bactérias diazotróficas endofíticas de cana-de-açúcar .....	81
<b>Tabela 8</b>	Identidade dos isolados endofíticos de colmo e folhas de cana-de-açúcar, com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rRNA ribossomal realizada pelo programa Blast no GenBank.....	85
<b>Quadro 1</b>	Posição taxonômica das batérias isoladas de colmo e folha de cana-de-açúcar.....	86

### Parte II

<b>Tabela 1</b>	Características químicas do solo Espodosolo Cárbico, coletado na Estação Experimental de Itapirema do IPA, Goiana-PE.....	116
<b>Tabela 2</b>	Características físicas do solo Espodossolo Cárbico, coletado na Estação Experimental de Itapirema do IPA, Goiana-PE.....	116

<b>Tabela 3</b>	Altura e diâmetro do colmo de plantas de cana-de-açúcar, cultivar RB92579, inoculadas (individualmente e em mistura) ou não com bactéria diazotróficas endofíticas, em três anos consecutivos de cultivo na Estação Experimental do IPA-Itapirema (Goiana-PE).....	124
<b>Tabela 4</b>	Massa seca da parte aérea (MSPA) (folhas secas + folhas verdes + colmos), nitrogênio acumulado nas folhas verde e produtividade do colmo fresco de cana-de-açúcar, cultivar RB92579, inoculadas individualmente e em mistura, ou não com bactéria diazotróficas endofíticas, em três anos consecutivo de cultivo na Estação Experimental do IPA-Itapirema(Goiana-PE).....	126
<b>Tabela 5</b>	Tonelada de pol por hectare/ produtividade de açúcar (TPH), sólidos solúveis totais (°Brix) e teores médios de fibra (Fibra) de cana-de-açúcar, cultivar RB92579, inoculadas (individualmente e em mistura) ou não com bactéria diazotróficas endofítica, em três anos consecutivos de cultivo na Estação Experimental do IPA-Itapirema ( Goiana-PE).....	133
<b>Tabela 6</b>	Açúcar total recuperável (ATR) de cana-de-açúcar, cultivar RB92579, inoculadas individualmente e em mistura, ou não com bactéria diazotróficas endofítica, em três anos consecutivos de cultivo na Estação Experimental do IPA-Itapirema( Goiana-PE).....	135
<b>Tabela 7</b>	Valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de folhas +3 de cana-de-açúcar, cultivar RB92579, e de plantas não fixadoras de N e estimativas da proporção de N derivado da atmosfera (%Ndda) em cana-de-açúcar inoculada ou não com bactérias diazotróficas endofíticas cultivada na Estação Experimental do IPA-Itapirema Goiana-PE), aos 11 meses após o plantio durante o ciclo da cana-planta.....	136

## Lista de figuras

### Parte I

- Figura 1** Avaliação da qualidade da extração do DNA total de alguns isolados utilizados no estudo através da eletroforese em gel de agarose a 1,0%, por 30min a 80 v, foi utilizado em cada poço 2,0 $\mu$ L do DNA de cada isolado. Legenda: 1A – IPA-CC1A; 1B – IPA-CC1B; 3A – IPA-CC3A; 3B – IPA-CC3B; 4 – IPA-CC4; 21 – IPA-CF21; 6 – IPA-CC6; 7 – IPA-CC7; 8 – IPA-CC8; 9 – IPA-CC9; 10 – IPA-CC10; 11 – IPA-CC11; 13A – IPA-CF13A; 14 – IPA-CF14; 16 – IPA-CF16; 18 – IPACF18; 19 – IPA – CF19; 20 – IPA-CF20..... 66
- Figura 2** Padrão de bandas dos produtos de amplificação do elemento BOX-A1R de alguns isolados de cana-de-açúcar, em gel de agarose 1,2%. Legenda: 1kb – Marcador 1Kb da Bioline; 1A – IPA-CC1A; 1B – IPA-CC1B; 3A – IPA-CC3A; 3B – IPA-CC3B; 4 – IPA-CC4; 21 – IPA-CF21; 6 – IPA-CC6; 7 – IPA-CC7; 8 – IPA-CC8; 9 – IPA-CC9; 10 – IPA-CC10; 11 – IPA-CC11; 13A – IPA-CF13A; 16 – IPA-CF16; 18 – IPACF18; 19 – IPA – CF19; 20 – IPA-CF20; 21 – IPA-CF21; 22A – IPA-CC22A; 22B – IPA-CC22B; 23 – IPA-CC23; 24 – IPA-CC24; 25 – IPA-CC25; 26 – IPA-CC26; 27 – IPA-CC27; 28 – IPAC-CC28; 29 – IPA – CC29; 30C – IPA-CC30C; 31 – IPA-CC31 e 32 – IPA-CC32..... 66
- Figure 3** Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average) a partir da matriz de similaridade genética usando o oligonucleotídeo BOX-AIR de 56 isolados bacterianos associados a cana-de-açúcar. O coeficiente de Simple Matching foi utilizado para a construção da matriz de similaridade com bootstrap de 1000 repetições..... 68
- Figura 4** Eletroforese em gel de agarose (1,2%) do produto da amplificação do gene 16S Rrna ribossomal de alguns isolados de colmo e folha de cana-de-açúcar . Legenda: 1Kb – Marcador 1Kb (BioLine); 1B – IPA-CC1B; 3A – IPA-CC3A; 6 – IPA-CC6; 8 – IPA-CC8; 9 – IPA-CC9; 10 – IPA-CC10; 11 – IPA-CC11; 13A – IPA-CF13A; 14 – IPA-CF14; 16 – IPA-CF16; 18 – IPACF18; 19 – IPA – CF19; 20 – IPA-CF20; 22A – IPA-CC22A; 23 – IPA-CC23; 25 – IPA-CC25; 27 – IPA-CC27; 28 – IPAC-CC28; 29 – IPA – CC29; 30B – IPA-CC30B ; 30C – IPA-CC30C; 33 – IPA-CC33; 35 – IPA-CC35; 36 – IPA-CC36; 37 – IPA-CC37; 39 – IPA-CF39; 42 – IPA-CF42; 44 – IPA-CF44; 45A – IPA-CF45A; 47 – IPA-CF47; 48 – IPA-CF48; 49 – IPA-CC49 e 62 – IPA-CF62..... 83

- Figura 5** Árvore filogenética construída a partir de sequências do gene 16S rRNA de isolados de cana-de-açúcar, em relação às sequências já depositadas em banco de dados, utilizando-se o método de Neighbor-Joining, com distâncias calculadas pelo método de Jukes-Cantor. Os valores de cada rama representam as porcentagens de 1000 réplicas bootstrap. Ramas com valores de bootstrap abaixo de 55% são como não resolvidas..... 88

## Parte II

- Figura 1** Precipitação mensal registrada no local do estudo durante a permanência do experimento em campo..... 116

## Lista de Apêndices

<b>Apêndice A</b>	Local de isolamento, meio de cultura utilizado no isolamento, meio de purificação e tempo de crescimento dos isolados bacterianos de cana-de-açúcar.....	145
<b>Apêndice B</b>	Teste de Urease – Presença de halo róseo ao redor da colônia, indica a positividade do teste.....	147
<b>Apêndice C</b>	Teste de Protease – Presença de halo transparente ao redor da colônia indica a positividade do teste.....	147
<b>Apêndice D</b>	Teste de Amilase – Presença de halo transparente ao redor da colônia, após revelação com lugol, indica teste positivo.....	147
<b>Apêndice E</b>	Teste de Lipase – Presença de halo transparente ao redor da colônia, indica teste positivo.....	147
<b>Apêndice F</b>	Teste de degradação da Quitina – Presença de halo transparente ao redor da colônia, indica teste positivo.....	147
<b>Apêndice G</b>	Teste de solubilização do fosfato - Presença de halo transparente ao redor das colônias indica teste positivo.....	147
<b>Apêndice H</b>	Teste de sideróforos - Presença de halo amarelo ao redor da colônia indica teste positivo.....	148
<b>Apêndice I</b>	Teste de AHL - Presença de halo azul ao redor do poço contendo o isolado, indica teste positivo.....	148
<b>Apêndice J</b>	Teste de catalase, a formação de bolhas no detalhe da foto indica teste positivo.....	148
<b>Apêndice K</b>	Teste de gelatinase. Para os dois primeiros tubos, teste negativo, para o último tubo no inferior da figura, teste positivo.....	148
<b>Apêndice L</b>	Vista do local do experimento de campo. Estação Experimental de Itapirema do Instituto Agrônomo de Pernambuco, Goiana-PE. Fonte Google Earth.....	149
<b>Apêndice M</b>	Croqui do experimento, mostrando os blocos e os dez tratamentos, totalizando 40 parcelas.....	149

<b>Apêndice N</b>	– Área a ser implantada o experimento(a); marcação dos tratamentos(b); toletes sementes com 3 a 5 gemas para serem plantados(c); aplicação do inoculante turfoso na água para inocular a cana-de-açúcar(d)(e); toletes em sacos de ráfias mergulhados nos oitos tratamentos contendo inoculantes, cada tratamento em um reservatório(f).....	150
<b>Apêndice O</b>	Distribuição dos toletes de cana-de-açúcar inoculada nos tratamentos (a); toletes de cana-de-açúcar sendo cobertos após o semeio (b); vista do experimento aos 31 dias após o plantio (DAP)(c); vista do experimento aos 90 DAP(d); vista do experimento aos 150 DAP(e); vista do experimento aos 240 DAP(f).....	151
<b>Apêndice P</b>	Visão do experimento aos 8 meses. A – cana-planta; B-cana-soca; C – cana-ressoca.....	152
<b>Apêndice Q</b>	Visão lateral do bloco 4 aos 10 meses para cana planta.....	152
<b>Apêndice R</b>	Coleta de cana-planta aos 11 meses após o plantio (a); peso das folhas verdes/ponteiro (b); corte dos colmos (c); pesagem dos colmos (d); inoculante líquido (e); reinoculação da soqueira, com inoculante líquido, com ajuda de um pulverizador manual com jato direcionado no corte do colmo (f) .....	153



## RESUMO GERAL

Antunes; Jadson Emanuel Lopes DSc. em Agronomia (Ciências do Solo); Universidade Federal Rural de Pernambuco; Fevereiro/2016. **BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM CANA DE AÇÚCAR: ESTRATÉGIA PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL.** Márcia do Vale Barreto Figueiredo (Orientadora); Ana Dolores Santiago de Freitas; Ademir Sérgio Ferreira de Araújo (co-orientadores).

Alguns estados brasileiros, especialmente da região Nordeste, têm sua economia baseada na cultura da cana-de-açúcar, que depende do êxito dessa atividade para o consequente desempenho de sua economia. Nesse contexto, é prioritário realizar trabalhos de prospecção de bactérias diazotróficas e de pesquisas que avaliem a potencialidade da fixação biológica do nitrogênio (FBN) na cana-de-açúcar, sob condição regional, aplicando tecnologias que permitam a produção sustentável desta cultura. Com isso, objetivou-se isolar e efetuar caracterizações morfofisiológica, bioquímica e molecular de bactérias diazotróficas endofíticas de colmos e folhas de três cultivares de cana-de-açúcar (RB1011, RB92579 e RB867515), assim como avaliar a resposta da cana-de-açúcar quanto ao potencial de FBN, a eficiência da inoculação destas bactérias quanto à produtividade de colmos e qualidades tecnológicas de cana-de-açúcar nos ciclos da cana-planta, cana-soca e cana-ressoca como suporte a uma produção sustentável da cultura. Foram obtidos 56 isolados endofíticos, sendo 62,5% do colmo e 37,5% da folha. Utilizou-se a técnica molecular de BOX-PCR que permitiu diferenciar os isolados em 34 perfis de bandas, pela formação de cinco agrupamentos distintos, que foram selecionadas para os testes bioquímicos e/ou fisiológicos. Desses isolados, 66 % apresentaram capacidade de solubilizar fosfato inorgânico; 26 % de produzirem urease, 34 % de produzirem proteases; 17 % de produzirem amilase; 68 % de produzirem lipase; 14 % de produzirem quitinase; 17 % de produzirem sideróforo; 71 % de produzirem ACC deaminase; 54 % de produzirem N-acil-homoserina lactona (AHL); 51 % de produzirem catalase e 23 % apresentaram capacidade hidrolítica de degradarem a gelatina; 97 % reduziram acetileno (ARA) com valores entre 4,14 e 7,84 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/hora. Para o sequenciamento do gene 16S rRNA ribossomal, foi verificada a presença de sete diferentes gêneros, 46% de identidade com o gênero *Bacillus*, 20% com *Paenibacillus*, 14% com *Burkholderia*, 6 % com *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* e *Methylobacterium* e 3% com *Brevibacillus*. A caracterização bioquímica e molecular dos isolados endofíticos de colmo e folha de cana-de-açúcar revelou uma diversidade de bactérias colonizando esta planta, com potencial biotecnológico para serem usadas como biofertilizantes. Foram selecionados três isolados pela atividade da nitrogenase e em conjunto com as respostas dos testes bioquímicos para compor o inoculante microbiano que foi avaliado em campo durante três anos compreendendo os ciclos da cana planta, soca e ressoca na variedade de cana-de-açúcar RB 92579. Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, em esquema fatorial 10x3, constituído de dez tratamentos (IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropedicae*), IPA-CC33(*Pseudomonas* sp.), IPA-CF65 (*Bacillus Megaterium*), IPA-CC9 + IPA-CC33, IPA-CC9 + IPA-CF65, IPA-CC33 + IPA-CF65, IPA-CC9 + IPA-CC33 + IPA-CF65, Mistura Embrapa (BR1140 (*Azospirillum amazonense*), BR11175 (*H. seropedicae*), BR11192 (*H. rubrisubalbicans*), BR11284 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e BR11364 (*Burkholderia tropica*), testemunha nitrogenada (TN) e testemunha absoluta (TA)), três ciclos de cultivo (cana-planta, cana-soca e cana-ressoca) com quatro repetições, totalizando 40 parcelas por cultivo. Foram avaliados os seguintes parâmetros: altura de plantas, diâmetro do colmo, massa seca da parte aérea, nitrogênio total das folhas +3, produtividade do colmo fresco,

rendimento de açúcar por hectare (TPH), teor de sólidos solúveis totais (°Brix), fibra, açúcar total recuperável (ATR) e estimativa da contribuição da FBN na nutrição da cana-de-açúcar pela técnica de abundância natural do isótopo  $^{15}\text{N}$ . A inoculação promoveu ganhos significativos em comparação a TA para o diâmetro do colmo e ATR, para o cultivo cana-ressoca. A contribuição da FBN nos tratamentos inoculados foi de até 57,31%. Constatou-se incrementos na produtividade do colmo fresco de até  $14 \text{ Mg.ha}^{-1}$  em comparação a TN, porém não diferenciando estatisticamente dos outros tratamentos. O comportamento semelhante dos tratamentos inoculados com a TN que recebeu  $60 \text{ kg.ha}^{-1}$  de N, infere em baixo custo econômico e ecológico, e ganha importância pela necessidade para o desenvolvimento de práticas agrícolas mais sustentáveis para melhorar a qualidade de vida da população.

**Palavras-chave:** Fixação biológica do nitrogênio, inoculantes microbianos,  $^{15}\text{N}$ , sequenciamento, BOX-PCR, *Saccharum* spp.

## GENERAL ABSTRACT

Antunes; Jadson Emanuel Lopes; PhD student in Agronomy (Soil Science); (Ciências do Solo); Universidade Federal Rural de Pernambuco; February/2015. **BACTERIA DIAZOTROPHIC ENDOPHYTIC IN SUGAR CANE: STRATEGY FOR SUSTAINABLE AGRICULTURE.** Márcia do Vale Barreto Figueiredo (Supervisor), Ana Dolores Santiago de Freitas; Ademir Sérgio Ferreira de Araújo (co-supervisores).

Some Brazilian states, especially the Northeast, has its economy based on the cultivation of sugarcane, which depends on the success of this activity for the subsequent performance of its economy. In this context, priority is performing prospecting work diazotrophs and research to evaluate the potential of biological nitrogen fixation (BNF) in sugarcane under regional condition, applying technologies that enable the sustainable production of this crop. With that aimed to isolate and make characterizations morphophysiological, biochemistry and molecular endophytic bacteria stems and leaves of three varieties of sugarcane (RB1011, RB92579 and RB867515) and to evaluate the response of the cane sugar and the potential of BNF, the efficiency of inoculation of these bacteria as the productivity of stalks and technological qualities of sugarcane in the cycles of plant cane, cane ratoon and cane ressoça as support for sustainable crop production. 56 isolates were endophytic, being 62.5% and 37.5% of the stem of the leaf. We used molecular BOX-PCR technique that allows to differentiate into isolated sections 34 bands, for the formation of five distinct clusters that were selected for biochemical and / or physiological tests. These isolates, 66% were able to solubilize inorganic phosphate; 26% to produce urease, proteases produce 34%; 17% amylase to produce; 68% to produce lipase; 14% to produce chitinase; 17% of producing siderophore; 71% of produce ACC deaminase; 54% to produce N-acyl homoserine lactone (AHL); 51% to produce catalase and 23% showed hydrolytic ability to degrade gelatin; 97% reduced acetylene (ARA) with values between 4.14 and 7.84 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> / hour. To sequence the 16S rRNA ribosomal the presence of seven different genres, 46% identity was observed with the genus *Bacillus*, 20% to *Paenibacillus*, 14% *Burkholderia*, 6% *Herbaspirillum*, *Pseudomonas* and *Methylobacterium* and 3% *Brevibacillus*. Biochemical and molecular characterization of endophytic isolates stem and leaf of sugarcane revealed a diversity of bacteria colonizing this plant, with biotechnological potential to be used as biofertilizers. Three isolated by the nitrogenase activity and together with the responses of biochemical tests were selected to compose the microbial inoculant that was tested in the field for three years comprising the cycles of sugar cane plant, soca and ressoça the variety of sugarcane RB 92579. We used the experimental randomized block design in a factorial 10x3, consisting of ten treatments (IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropedicae*), IPA-CC33 (*Pseudomonas* sp.), IPA-CF65 (*Bacillus Megaterium*), IPA-CC9 + IPA-CC33, IPA-CC9 + IPA-CF65, IPA-CC33 + IPA-CF65, IPA-CC9 + IPA-CC33 + IPA-CF65, mix Embrapa (BR1140 (*Azospirillum amazonense*) BR11175 (*H. seropedicae*) BR11192 (*H. rubrisubalbicans*) BR11284 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) and BR11364 (*Burkholderia tropica*), nitrogen witness (TN) and absolute control (TA)), three crop cycles (plant cane, cane and ratoon cane ressoça) with four replications totaling 40 plots for cultivation were evaluated the following parameters: plant height, stem diameter, shoot dry weight, total nitrogen leaves +3, fresh stalk yield, sugar yield per hectare (TPH) content solids (° Brix) soluble fiber, total recoverable sugar (ATR) and estimation of the contribution of BNF nutrition of sugarcane by the technique of natural abundance of <sup>15</sup>N isotope. Inoculation promoted significant gains compared to TA for the

diameter of the stem and ATR for the cane ressoca cultivation. The contribution of BNF in the inoculated treatments was up to 57.31%. It found increases in productivity fresh stalk of up to 14 Mg ha<sup>-1</sup> compared to TN, but not statistically differing from the other treatments. The similar behavior of the treatments inoculated with TN who received 60 kg ha<sup>-1</sup> N, infers in low economic and environmental cost, and gains importance by the need to develop more sustainable agricultural practices to improve the quality of life of the population.

**Keywords:** biological nitrogen fixation, microbial inoculants, <sup>15</sup>N, sequencing, BOX-PCR, *Saccharum* spp.

## 1 Introdução Geral

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) exerce um papel de grande importância na economia de diversos países localizados nos diferentes continentes, sendo o maior destaque nas economias da América Latina e do Caribe. Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial da cultura, com área plantada com cerca de 10,65 milhões de hectares e produtividade média em torno de 73 Mg.ha<sup>-1</sup> (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE-SIDRA, 2015). Da matriz energética brasileira, 42,5% é renovável e 17,4% é derivado da cana-de-açúcar, para o período de 2004 a 2014, o País aumentou em 75% a produção de energia elétrica oriunda do bagaço de cana (MISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA - MME, 2015).

A produção brasileira de cana-de-açúcar na safra 2014/2015 foi de 654,6 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO-CONAB, 2015). A produção nacional de açúcar para esta mesma safra foi de 35,5 milhões de toneladas e 28,6 bilhões de litros de etanol, sendo que a tendência para o consumo interno de etanol em 2020 é de 50 bilhões de litros (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2015).

Sendo a cana-de-açúcar uma cultura altamente extrativa em nitrogênio, a cana planta, com produtividade de 100 Mg.ha<sup>-1</sup> de colmos, acumula entre 150 e 200 kg.ha<sup>-1</sup> de N, e no caso da cana soca este valor é de 120 a 160 kg.ha<sup>-1</sup> de N (ORLANDO FILHO et al., 1980; SAMPAIO et al., 1984; RESENDE, 2000; XAVIER, 2002). Os estudos desenvolvidos por vários pesquisadores (URQUIAGA et al., 2003; REIS et al., 2000; BALDANI et al., 2002; BODDEY et al., 2003; XAVIER, 2006) relatam que a lavoura de cana não reduz o nível de N do solo, evidenciando que a cultura possui um sistema natural de reposição de N exportado do solo anualmente. No nível de conhecimento atual, este sistema de reposição pode ser através do processo da fixação biológica do nitrogênio (FBN). As evidências indicam que esta fonte de N pode contribuir significativamente com até 60% de todo N acumulado pelas plantas de cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2001; XAVIER, 2002; URQUIAGA et al., 2012).

Estudos têm demonstrado que a FBN contribui significativamente no nitrogênio total da cultura da cana-de-açúcar. Quando se avalia o benefício das bactérias diazotróficas endofíticas para a FBN, a cana-de-açúcar se destaca (REIS et al., 1999; URQUIAGA et al., 2012; TAULÉ et al., 2012).

No entanto, existem controversas em relação a FBN em cana-de-açúcar. Experimentos realizados na África do Sul e Austrália sugerem que a FBN não contribui

significativamente para a nutrição nitrogenada da cultura nesses países (URQUIAGA et al.,1992; HOEFSLOOT et al., 2005). A substituição de parte da adubação nitrogenada pela inoculação poderia representar uma importante economia para o setor, no entanto estudos realizados a campo não indicam essa possibilidade. Trabalhos realizados com a cultura têm apontado respostas positivas em algumas condições e principalmente é altamente dependente da variedade utilizada (URQUIAGA et al.,1992; PEREIRA et al., 2013; SCHULTZ et al., 2012, 2014). As respostas positivas que ocorrem não têm sido atribuídas a aumentos na FBN, mas a efeitos benéficos promotores de crescimento, que comprovadamente ocorrem pela ação de bactérias diazotróficas (DOBBELAERE et al., 2003; SARAVANAN et al., 2007; YADAV et al., 2009; TAULÉ et al., 2012; VIDEIRA et al., 2011; COSTA et al., 2013; RODRIGUES et al.,2013 CASTANHEIRA et al., 2014)

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP's) estimulam o crescimento da planta através de efeitos biofertilizantes e bioestimulantes, aumentam a resistência a doenças, melhoram a habilidade da planta de resistir aos estresses (STURZ & NOWAK, 2000), podendo ser isoladas de diversos ambientes (FIGUEIREDO et al., 2010a) possuindo a capacidade de colonizar a superfície de raízes, a rizosfera e a filosfera bem como os tecidos vegetais internos, modulando o metabolismo da planta e estimulando seu crescimento e produtividade por mecanismos diretos e/ou indiretos (KLOPPER et al., 1989; FIGUEIREDO et al., 2010b; RODRIGUES et al.,2013). Diversos trabalhos têm demonstrado a utilização dos micro-organismos, objetivando melhorar a disponibilidade de nutrientes para as plantas, na forma de inoculantes biológicos como uma tecnologia estratégica para a redução de dependência de insumos baseados em fontes energéticas não renováveis, poluentes e economicamente insustentáveis (BALDANI et al., 1997; GUIMARÃES et al., 2007; BASHAN et al., 2014. SCHULTZ et al., 2014; PEREG et al.,2016).

A utilização de micro-organismos, com o objetivo de melhorar a disponibilidade de nutrientes para as plantas é uma prática importante e necessária para a agricultura (BABALOLA 2010; FIGUEIREDO et al., 2010b; ARAUJO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013).

Entre as tecnologias disponíveis que visem ganhos de produtividade na cana-de-açúcar, tem-se o uso de micro-organismos benéficos, particularmente BPCP's. A presença destas bactérias, especialmente em cultura de cana-de-açúcar, tem sido estudada desde a década de 1950, quando as primeiras espécies foram isoladas.

A utilização dessas bactérias, visando aumento de produtividade agrícola, será provavelmente uma das táticas mais importantes para a atualidade no mundo. Isso se deve à

demanda emergente para a diminuição da dependência de fertilizantes químicos e à necessidade de desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Um fator importante a relatar é que, devido à heterogeneidade dos biomas brasileiros, é natural imaginar que a recomendação de estirpe deva ser feita a nível regional (RUMJANEK et al., 2006). Desta forma, é fundamental o isolamento de estirpes oriundas da região Nordeste visando à formulação de inoculantes microbianos para atender combinações com potencial biotecnológico que permitam uma produção sustentável.

Neste contexto, baseado no conhecimento que a BPCP's é uma ferramenta biotecnológica que exerce primordial importância na sobrevivência e desenvolvimento das plantas cultivadas, assim como na supressão de doenças, foi elaborada uma hipótese de que a inoculação efetuada com BPCP's selecionadas, visa otimizar o crescimento e o potencial da FBN das plantas de cana-de-açúcar. Esta hipótese foi testada para investigar o isolamento e efetuar caracterizações morfofisiológica, bioquímica e molecular de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de colmos e folhas de cana-de-açúcar cultivada; avaliar a resposta desta cultura quanto a estimativa da quantidade de N fixado e eficiência da inoculação, em relação a produtividade de colmos e qualidades tecnológicas nos ciclos da cana-planta, soca e ressoça, como suporte para uma produção sustentável da cultura. Diferentes BPCPs inoculadas isoladamente e em mistura, foram utilizadas para compor os inoculantes microbianos, e vários parâmetros biológicos foram analisados neste estudo.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)

A cana de açúcar (*Saccharum spp.*) é uma gramínea semiperene, da família Poaceae, cultivada em regiões tropicais e temperadas, que expressa um bom desenvolvimento em solos onde há boa aeração, boa drenagem, o que exige solos com profundidade superior a um metro (ANDO, 2010; REIS, et al., 2007). Atualmente, é tida como uma das culturas mais importantes no cenário socioeconômico brasileiro, principalmente por ser matéria prima utilizada pela indústria sucroalcooleira para a produção de açúcar e álcool (BENETT et al., 2011).

A cultura foi introduzida no Brasil em meados do século XVI pelo português Martin Afonso de Souza, sendo considerada uma das primeiras atividades econômica rentável do país, até então colônia de Portugal (ROSA, 2005).

Devido a grande importância que assumiu para a economia nacional através da produção de álcool etílico (Proálcool), a cultura de cana-de-açúcar expandiu-se por todos os Estados brasileiros, principalmente em São Paulo, Pernambuco, Paraíba e Alagoas e principalmente pelo crescimento na produção de 21,3% de biocombustível em comparação a 2014 (MME, 2015).

A previsão da produção de cana-de-açúcar para a safra de 2015/2016 no Brasil será de 658,7 milhões de toneladas, com um incremento estimado de 3,8% em relação à safra passada. O aumento não será maior em razão da produtividade nos canaviais Paulistas, maior estado produtor, que se recuperam de um impacto hídrico da safra passada, ao contrário dos canaviais do Nordeste, que foram novamente impactados pela restrição hídrica na região. A previsão nacional da área plantada deve ficar em torno dos 9.000 mil hectares, redução prevista de 0,1%, se comparada com a safra 2014/15. A produção de açúcar deve atingir 34,6 milhões de toneladas, 2,7% inferior à safra 2014/15. A produção de etanol total ultrapassa 29 bilhões de litros, aumento de 1,9%. A produção de etanol anidro deve ter redução de 6%, estimada em 11,03 bilhões de litros. Para a produção de etanol hidratado a estimativa é de 18,19 bilhões de litros, aumento de 7,4% ou 1,25 bilhões de litros (CONAB,2015).

De acordo com Simões Neto et al. (2012), a agroindústria da cana-de-açúcar em Pernambuco ocupa uma relativa área agrícola com relevante produção de açúcar e álcool,



gerando diretamente diversos empregos nas áreas rural e industrial proporcionando, assim, grande contribuição social para o Estado.

Os baixos rendimentos da cultura estão associados com a pobreza dos solos, especialmente os solos dos Tabuleiros Costeiros, e com a baixa e irregular distribuição das chuvas, especialmente no Nordeste. Em relação aos solos, um dos nutrientes mais limitantes é o nitrogênio, justamente o de maior custo econômico e que demanda a maior quantidade de energia fóssil por unidade de N-fertilizante produzido. Por isso, os estudos que procuram fontes alternativas ao N-fertilizante, como a FBN associada à cultura, a adubação verde e o uso de resíduos industriais, são essenciais na busca de uma agricultura sustentável para produção de cana-de-açúcar (DOBEREINER et al. 1995; URQUIAGA et al., 1992, 1999, 2003; BODDEY et al., 2001, 2003; BALDANI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2002; XAVIER et al. 2006).

A necessidade de expansão da cultura, seja pelo aumento de área ou pelo aumento em produtividade, necessitará de um aumento do consumo de fertilizantes. Essa situação já foi observada nos últimos anos, mesmo em alguns momentos onde a relação de troca tonelada do produto/kg do fertilizante era desfavorável ao crescimento da cultura (NEVES et al., 2010).

Entre os fatores que contribuem para o incremento da produtividade das culturas, a disponibilidade de N é um dos mais importantes, pois se trata de um nutriente absorvido em maiores quantidades pela maioria das culturas e o que exerce efeito mais pronunciado na produção. Apesar disso, o manejo da adubação nitrogenada é difícil, por ser o N um elemento que apresenta dinâmica complexa e em virtude do fato da adubação mineral não apresentar efeito residual (RAIJ, 1991).

O nitrogênio é particularmente importante no período de formação da cultura, isto é, no estado que se inicia imediatamente após a germinação e termina no fechamento do canavial, que normalmente ocorre em torno de 3 a 5 meses após o plantio. É nessa época que se dá a formação dos perfilhos, para tanto, é necessária certa disponibilidade de nitrogênio no solo. A partir do fechamento do canavial, a cultura entra num período de crescimento acelerado, desde que haja boas condições de temperatura e umidade. Sem uma quantidade mínima de nitrogênio no solo, durante o estado de formação da cultura tanto o número como o desenvolvimento de perfilhos das plantas são afetados (VITTI et al., 2008).

## 2.2 Fixação Biológica do Nitrogênio

O aproveitamento eficiente do nitrogênio atmosférico, é um dos pilares que sustentam a agricultura sustentável. No entanto, somente alguns micro-organismos procariontes tem habilidade em reduzir o nitrogênio atmosférico em amônia, estes são conhecidos como diazotróficos ou fixadores de nitrogênio (WEZEL et al.,2014). Esse processo de redução, realizado por intermédio da enzima nitrogenase, é conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN), que pode suprir, em algumas cultura, quase toda a demanda em nitrogênio nas fases de desenvolvimento das plantas, resultando em significativas produtividades agrícolas. (HOFFMAN et al.,2014).

Estudos têm demonstrado que a FBN contribui significativamente no nitrogênio total da cultura da cana-de-açúcar. Quando se avalia o benefício das bactérias diazotróficas para a FBN, a cana-de-açúcar se destaca (REIS et al. 1999). As bactérias diazotróficas endofíticas *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. parecem ser as principais responsáveis pelas significativas taxas de FBN observadas na cultura da cana-de-açúcar. Essas bactérias foram encontradas em muitas variedades de cana-de-açúcar em várias regiões do Brasil, assim como no México, Cuba e Austrália (BODDEY et al., 1995; SCHULTZ et al.,2014; RODRIGUEZ-ANDRADE et al., 2015 ).

O processo de FBN contribuiu de forma significativa para a nutrição nitrogenada das plantas de cana-de-açúcar, permitindo alcance de produtividades significativas de forma sustentável, mesmo quando a lavoura é cultivada em solos de baixa disponibilidade de N para as plantas (COELHO et al., 2003; SCHULTZ et al.,2014).

Desde a descoberta de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas à cana-de-açúcar por Dobereiner et al. (1995), foi demonstrado o enorme potencial de bactérias endofíticas em aumentar a biomassa de gramíneas na ausência de fertilizantes nitrogenados. Novas bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> vêm sendo isoladas e identificadas, incluindo espécies do gênero *Azospirillum* sp.; *Herbaspirillum* sp.; *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* sp.; *Burkholderia tropica*; *Paenibacillus azotofixans*; graças a elucidação dos mecanismos de funcionamento da nitrogenase. Essas bactérias não possuem mecanismos de proteção de oxigênio, demonstrando maior eficiência na utilização de fontes de carbono para fixação de N<sub>2</sub>, devido ao fato de serem endofíticas (ASH et al.,1993; DOBEREINER et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2003; RODRIGUES et al.,2015 ).

A FBN em cana-de-açúcar sempre despertou grande interesse entre os pesquisadores, sobretudo depois da descoberta de inúmeras bactérias diazotróficas (*Azospirillum lipoferum*,

*A. brasilense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrosulbicans* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*) (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; REINHOLD et al., 1987; CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; BODDEY et al., 1995; OLIVARES et al., 1996) colonizando tanto o interior das plantas quanto a filosfera e rizosfera da cana-de-açúcar. Utilizando a técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , Boddey et al. (2001) verificaram que de 25 a 60% do N assimilado pela planta de cana era proveniente da FBN. Por meio da mesma técnica, Polidoro et al. (2001) mostraram uma contribuição da FBN no total de N assimilado pela cana-de-açúcar variando entre zero a 70%. A inoculação pode ser realizada com uma bactéria ou consórcios bacteriano.

Diferentes estudos relacionados a quantificar a FBN associado às principais gramíneas cultivadas no Brasil, deu-se início em meados dos anos 70, através das conhecidas técnicas: redução do acetino (ARA), utilizada na cana-de-açúcar (DÖBEREINER et al., 1972), uso de  $^{15}\text{N}$  (RUSCHEL et al., 1981), diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  (FREITAS et al., 1984; URQUIAGA et al., 1992), balanço de N total (BODDEY & URQUIAGA, 1992) e abundância natural de  $^{15}\text{N}$  (YONEYAMA et al., 1997; RESENDE, 2000; BODDEY et al., 2001). Um dos pioneiros e relevantes trabalhos sobre a contribuição da FBN para gramíneas foi realizado por Urquiaga et al. (1992) em que os autores descobriram por meio de técnicas isotópicas de  $^{15}\text{N}$  que algumas variedades de cana-de-açúcar poderiam obter cerca de 60% do N necessário para seu desenvolvimento por meio da associação com bactérias endofíticas.

Oliveira et al. (2002) demonstraram que, mesmo com a inoculação de consórcios bacterianos não houve aumento maior que 30% na concentração de N, sugerindo que novos estudos deveriam ser realizados para que se pudesse melhor explorar o potencial das bactérias diazotróficas para culturas agrícolas (OLIVEIRA et al., 2002). Uma das possíveis causas dessa baixa eficiência foi reportada em estudos utilizando a técnica de hibridização fluorescente *in vitro* (FISH), em que foi observada a ocorrência de grupos específicos de bactérias diazotróficas colonizando a cana-de-açúcar, ocorrendo dessa forma uma competição entre as bactérias nativas e as inoculadas, levando a uma menor eficiência do processo de FBN (OLIVEIRA et al., 2009).

Possivelmente, a principal causa da baixa eficiência da FBN por micro-organismos endofíticos em gramíneas esteja relacionada com a baixa persistência de determinados grupos de micro-organismos no interior da planta. Lambais (2001) relatou que a presença das bactérias diazotróficas endofíticas *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou *Herbaspirillum rubrisulbicans* em cana-de-açúcar induziu a expressão de genes relacionados ao sistema de defesa vegetal. Essa indução pode ser observada por meio da super-expressão de genes que

codificam proteínas relacionadas à defesa como quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases, fenilalanina amônia liases (PAL), chalcona sintases, chalcona isomerases, isoflavona redutases, glicoproteínas, peroxidases, catalases, superóxido dismutases e proteínas envolvidas no controle da morte celular programada.

Segundo Baldani et al. (1997), embora várias características ecológicas e fisiológicas estejam sendo desvendadas, ainda falta conhecimento sobre o mecanismo envolvido na interação bactéria-planta e como ele contribui para o nitrogênio acumulado nas plantas. Apesar das diferentes formas de interação, estes diazotrofos, quando estão em associação com gramíneas, garantem incrementos de 5 a 30% na produção (OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994) e de até 35% na cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2006) e entre 7 a 32% em aumentos de produção de massa seca da planta (BODDEY et al., 2003).

### **2.3 Bactérias promotoras de crescimento de plantas**

A utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP's) irá depender do conhecimento sobre os mecanismos de interação bactéria-planta e da habilidade de manter, manipular e modificar populações benéficas sob condições de campo (KUKLINSKY-SOBRAL, 2005). A utilização dessas bactérias, para o aumento da produção agrícola, será provavelmente uma das táticas mais importantes para a atualidade no mundo. Isso se deve à demanda emergente para a diminuição da dependência de fertilizantes químicos e à necessidade de desenvolvimento da agricultura sustentável (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

As bactérias em habitats naturais podem colonizar o interior e exterior de órgãos de plantas e podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento (MARIANO et al., 2004). O papel dos micro-organismos endofíticos nas plantas tem sido muito discutido; e embora pouco entendido, uma associação simbiótica têm sido sugerida (CREWS et al., 2004). As BPCP's estimulam diretamente a fixação de nitrogênio (VERMA et al., 2001; HAN et al., 2005; ASHRAF et al., 2011). Além da estimulação da fixação do nitrogênio e contribuição na nutrição vegetal de várias espécies vegetais como milho, arroz, braquiária e cana-de-açúcar, a interação entre bactérias diazotróficas e plantas também exerce outros benefícios que auxiliam, direta ou indiretamente, o crescimento vegetal (MOREIRA et al., 2010; SARKAR & REINHOLD-HUREK, 2014), pela capacidade de solubilizar nutrientes (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999; SINGH et al., 2007; SHUKLA et al., 2008), produzir hormônios de crescimento através da presença de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)

deaminase (CORREA et al., 2004; ESQUIVEL-COTE et al., 2013); ácido indol acético (AIA) (CATTELAN, 1999; CASSÁN et al., 2009; RICHARDSON & SIMPSON, 2011; SANTOS et al., 2015) e indiretamente por antagonismo a fungos patogênicos a produção de sideróforos, quitinase,  $\beta$ -1,3-glucanase, antibióticos, pigmentos fluorescentes, solubilização de fosfato e cianetos (RENWICK et al., 1991; BURD et al., 1998; WENBO et al., 2001; STROBEL & DAISY, 2003; ESTRADA et al., 2013).

A grande vantagem das bactérias endofíticas em relação às epifíticas é o fato de colonizarem internamente as plantas, um habitat protegido onde exercem mecanismos diversos (PEIXOTO NETO et al., 2002). Mendes & Azevedo (2007) sugerem, dentro da definição de micro-organismos endofíticos, a divisão de endofíticos em dois tipos, os que produzem estruturas externas à planta, e os que não produzem.

A promoção do crescimento vegetal se dá principalmente pela produção de fitormônios como as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno pelas bactérias endofíticas. A produção desses fitormônios já foi relatada em bactérias como *Gluconoacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (LEE et al. 2004; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). O ácido indol acético é considerado uma auxina de ocorrência natural com efeitos fisiológicos nas plantas como a promoção do crescimento apical (LAMBRECHT et al., 2000).

Outros gêneros de  $\alpha$  e  $\beta$ -proteobactérias tem sido identificados como BPCP's, entre eles *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Amorphosporangium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Cellulomonas*, *Citrobacter*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* e *Xanthomonas* (DASH & GUPTA, 2001; SPAEPEN et al., 2009; SAHARAN & NEHRA, 2011).

Algumas dessas bactérias são capazes de apresentarem mais de um mecanismo de promoção de crescimento em plantas (AHMAD et al., 2008). O etileno é uma molécula que regula o crescimento vegetal estando em baixas concentrações, porém sua produção pode ser aumentada em condições de estresse. A enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) encontrada em muitos micro-organismos promotores de crescimento pode promover uma proteção significativa das plantas contra níveis elevados de etileno (GLICK, 2012; 2014).

Os principais grupos de BPCP's encontram-se nos filos Bacteroidetes, Cianobacterias, Actinobacterias, Firmicutes e Proteobacterias. O uso destes micro-organismos resulta em processos ecologicamente benéficos contribuindo para alcançar uma maior sustentabilidade

no setor agrícola (FIGUEIREDO et al., 2010b). A aplicação de misturas de BPCP's representa uma importante estratégia na promoção de crescimento, dependendo da combinação e compatibilidade dos isolados envolvidos tanto na promoção de crescimento quanto no biocontrole. O antagonismo entre bactérias aplicadas em mistura pode influenciar o desempenho das BPCP's (De BÔER et al., 1999). Por outro lado, o aumento da diversidade genética obtida pela mistura proporciona diferentes padrões de colonização, maior gama e interação dos mecanismos de ação, resultando em tratamentos contra múltiplos patógenos, que atuam sob uma faixa mais ampla de condições ambientais tais como pH, umidade e temperatura (DASHTI et al., 2000).

O uso de combinações de isolados com diferentes capacidades metabólicas (FBN, mobilização-P, produção de fitormônios e antibióticos) tem sido recomendado para aumentar a eficiência de biofertilizantes contendo BPCP's em plantas leguminosas (FIGUEIREDO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2012) e não leguminosas (OLIVEIRA et al., 2006; BASHAN et al., 2014), principalmente em solos que apresentam baixos teores de matéria orgânica e alta fixação de fósforo (P), o que os torna pouco eficientes em fornecer nitrogênio e fósforo para as plantas, limitando a produção.

A interação entre as BPCP's e as espécies vegetais pode resultar em efeitos benéficos que vão desde o aumento da taxa de germinação, do crescimento das raízes, colmos e/ou caules, do número de folhas e da área foliar, do crescimento de tubérculos, do número de flores até um aumento do rendimento da produtividade vegetal (COMPANT et al. 2010).

Pesquisas sobre aplicações práticas de BPCP's têm tido sucesso na medida em que já existem produtos comerciais à base dessas bactérias nos Estados Unidos, China, Austrália, País de Gales e Nova Zelândia (LUZ, 1996). Na China, as BPCP's são aplicadas extensivamente no campo, chegando a induzir aumentos médios de cerca de 21% em produtividade (FIGUEIREDO et al., 2010a).

Reis et al. (2000) relatam que o genótipo da planta é o fator chave para o sucesso e obtenção dos benefícios causados pelas BPCP's. Algumas bactérias endofíticas antagonistas têm sido testadas para o controle biológico de fungos fitopatogênicos (CHEN et al., 1995).

Lacava et al. (2008) relatam que os micro-organismos endofíticos são uma nova fonte para busca de moléculas bioativas de interesse em diversas áreas como as indústrias farmacêuticas e agrícolas.

Tem sido demonstrado que estirpes isoladas de uma espécie vegetal são mais aptas a se restabelecer nas raízes, quando inoculadas na mesma espécie vegetal, sendo denominadas estirpes homólogas (BALDANI & BALDANI, 2005). Além disso, admite-se ser o genótipo

da planta fator-chave para obtenção dos benefícios causados por bactérias diazotróficas endofíticas (REIS et al., 2000).

## 2.4 Identificação de Bactérias Diazotróficas

Segundo van Elsas & Boersma (2011), o estudo de populações microbianas que habitam o ambiente natural é fundamental na compreensão do funcionamento dos ecossistemas. Zilli et al. (2003), relatam que a diversidade de micro-organismos como indicador da qualidade do solo tem sido bastante estudado, especialmente na última década, com o advento de técnicas de biologia molecular que têm favorecido a avaliação dos micro-organismos em amostras ambientais (COUTINHO et al., 1999; TIEDJE et al., 2001).

No passado, o estudo da diversidade microbiana foi baseada em técnicas que eram dependentes de cultivo, proporcionando informações limitadas devido à falta de meios de cultura que reproduzem com precisão os diferentes nichos ecológicos em um ambiente externo ao laboratório (FIGUEIREDO et al., 2013). Portanto, apenas uma pequena fração da diversidade microbiana existente no ambiente pode ser cultivada *in vitro*, o que provoca uma subestimação da diversidade natural (TYSON & BANFIELD, 2005).

Saikia & Jain (2007), relatam que apesar dos avanços tecnológicos nos estudos genéticos, foi pouco o sucesso obtido na procura de uma interação mais específica entre as bactérias diazotróficas com as gramíneas.

Desde a década de 20, são utilizados testes bioquímicos e fisiológicos para ajudar na taxonomia bacteriana (BUSSE et al., 1996). Esses métodos usam, entre outras coisas, a capacidade de utilização de diferentes fontes de carboidrato e a presença de determinadas enzimas. Essas técnicas de identificação, gerava grande problema, pois organismos sem relação filogenética entre eles, podiam apresentar características semelhantes quando ocupassem o mesmo ambiente. Até que Kirchoff (1997), admitiu que a identificação de novos isolados é difícil se for baseada em critérios puramente fenotípicos e fisiológicos e, principalmente, se as características mostradas por um isolado em particular não são completamente idênticas às espécies já descritas. Por esse motivo, tem se recomendado uma abordagem polifásica para a identificação de bactérias. Isso inclui informação fenotípica, genotípica e filogenética (VANDAMME et al., 1996).

Segundo Andreote et al. (2009) e Roesch et al. (2010), a diversidade microbiana pode ser avaliada de forma mais ampla, pela utilização de técnicas mais modernas como a

biologia molecular, possibilitando o estudo dos micro-organismos tanto dependentes com independentes de cultivo, pela detecção de ácidos nucleicos.

O emprego dessas técnicas moleculares tornou-se possível a partir dos estudos pioneiros de Pace et al. (1986), em análises de estrutura de comunidades microbianas utilizando as informações da sequência de nucleotídeos do gene da subunidade 16S do rRNA ribossomal (16S rDNA). Este gene tem sido muito utilizado por estar presente em todas as bactérias, derivar de um ancestral comum, além de ser geneticamente estável e apresentar um tamanho suficiente para análises filogenéticas (CHENEBY et al., 2000, KHAMIS et al., 2005).

Para auxiliar nos estudos de filogenia, a técnica conhecida como PCR (Reação em cadeia da polimerase), permite a amplificação de sequências definidas do DNA, utilizando iniciadores específicos, assim como análises do gene 16S rRNA ribossomal de bactérias fixadoras de nitrogênio (CHUEIRE, et al., 2000).

Métodos variáveis e suas combinações, estão sendo utilizados para verificar a posição taxonômica das bactérias e, alguns, mostram boa correlação com o sequenciamento do gene 16S rRNA (JUNIOR et al., 2009).

O gene 16S rRNA tem sido largamente utilizado para estudos taxonômicos, pois permite a análise de sequências tanto estreitamente relacionadas quanto entre micro-organismo mais distantes (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994), assim como uma fonte promissora para descoberta de novos recursos biotecnológicos (BENEDUZZI et al., 2008; RATÓN et al., 2011; PEREIRA et al., 2011). Este gene é considerado mais adequado para estudos de ecologia e filogenia microbiana permitindo identificação mais segura a nível de gêneros. Além disso, o uso do gene 16S rRNA ainda permite a análise de correlação entre o genótipo e o nicho estudado (CHÉNEBY et al. 2000; GRIBALDO & BROCHIER 2009 ). Devido a conservação presente na sequência do gene 16S rRNA é possível uma estimativa da distância filogenética. Os amplicons obtidos através dessa região são sequenciados e analisados usando um banco de dado como o *National Center for Biotechnology Information* – NCBI, onde estão depositadas sequências do mesmo gene e, com softwares apropriados, permitem rápida identificação de bactérias com base na sequência rRNA (IGUAL et al., 2001).

Estudos de diversidade identificaram diferentes grupos de bactérias diazotróficas endofíticas: rizóbios ( $\alpha$ -proteobactérias); *Frankia* (em Actinobacteria); cianobactérias; bactérias que pertencem a vários gêneros de bactérias, tais como *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, e *Stenotrophomonas*, que colonizam a superfície tecidos vegetais, sem a formação de estruturas



diferenciadas; e endófitos (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004 ; FRANCHE et al., 2009 ; RIBEIRO et al., 2009, LINDSTROM et al., 2010; TRIPP et al., 2010 ; MONTEIRO et al., 2012; ZOHARA et al.2016 ).

Recomenda-se cuidado na escolha do fragmento de rDNA a ser amplificado e analisado. No caso da análise de diversidade de grupos de indivíduos com elevada afinidade genética, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico 16S-23S rDNA. Esta região intergênica apresenta maior variabilidade não só na sua composição de bases como também no seu tamanho ao serem comparadas às regiões gênicas 16S ou 23S (REIS JUNIOR et al., 2004; FOSTER et al., 2008; PINOT et al., 2011). Informações sobre esta região intergênica vêm sendo agregadas nos últimos anos, e o alinhamento de sequências disponíveis em banco de dados mostra que pode ocorrer variações inter e intra-específicas consideráveis tanto no tamanho assim como na sequência de bases (LAGUERRE et al., 1996).

Vários estudos têm sido realizados utilizando técnicas moleculares, com o intuito de identificar e avaliar a diversidade e a filogenia de micro-organismos presentes nos diferentes ambientes. Dentre as técnicas moleculares, destacam-se a análise de rep-PCR (PCR de sequências repetitivas de DNA) (GRANGE, 2004; STOCCO, et al., 2008), que permite a amplificação de sequências definidas da molécula de DNA. Estes elementos repetitivos parecem estar localizados em distintas posições intergênicas no genoma, em ambas as orientações. Existem três famílias principais desses elementos, incluindo as sequências REP (Repetitive Extragenic Palindromic) (35-40 pb) (STERN et al., 1984), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (124-127 pb) (HULTON et al., 1991) e BOX – subdivididas em Box A (54 pb), Box B (43 pb) e Box C (50 pb) (MARTIN et al., 1992).

Os oligonucleotídeos com essas sequências têm sido desenhados e utilizados para amplificar regiões entre estes elementos repetitivos por meio de PCR, gerando perfis específicos (*fingerprinting*) que podem ser utilizados para identificação de espécies bacterianas, sendo estas técnicas denominadas de REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR (GILLINGS & HOLLEY, 1997).

A técnica de BOX-PCR, utilizando o primer BOX A1R, é baseada nas sequências palindrômicas repetitivas, os elementos BOX. Essa técnica possui uma sequência específica quando amplificadas, permitindo a observação de padrões altamente característicos, robustos, com mais detalhes dos isolados, quando as amostras são submetidas a separação em gel de agarose (SELENSKA-POBELL,1995).

Nesta técnica, regiões repetitivas e altamente conservadas do genoma bacteriano são amplificadas, incluindo os elementos BOX, já descrito anteriormente, sendo o Box A o mais

comun. O iniciador BOX A1R permite uma caracterização mais detalhada dos isolados, e produz fragmentos de impressões digitais robustas com um padrão complexo. Portanto, o primer BOX A1R é geralmente usado para diferenciar cepas bacterianas (MARQUES et al., 2008; LEE & WONG 2009). BOX-PCR reúne várias vantagens, uma vez que é uma técnica rápida, de execução fácil e altamente discriminatória para espécies, produzindo resultados que representam bem as análises baseadas na homologia DNA-DNA (De BRUJIN, 1992).

Os primers utilizados pela técnica de rep-PCR, em especial ao BOX-PCR, não são específicos para gênero, espécie ou estirpe, porém a técnica permite que primers generalizados sejam utilizados para comparar diferenças entre bactérias numa mesma população. Considerada uma ferramenta universal, a técnica de BOX-PCR é utilizada em estudos de variações genômicas em organismos procariontes e reflete a variabilidade do genoma por inteiro (IGUAL et al., 2001).

Essa técnica tem sido aplicada para o estudo da diversidade microbiana associada a vegetais ou a diferentes solos (KUKLINSKY- SOBRAL et al., 2004), análise da diversidade genética de bactérias degradadoras de pesticidas (DESAINTE et al., 2000), em estudo genético de isolados de rizóbios em feijão-fava (ANTUNES, 2010), caracterização e identificação de bactérias diazotróficas (CRUZ et al., 2001; LIRA-CADETE et al., 2012; ANDREOLLI et al., 2016), em estudos taxonômicos e filogenéticos (RODAS et al., 2003; SAAVEDRA, 2013; LUCENA-PADROS & RUIZ-BARBA, 2016) entre outros.

Segundo Hungria et al., (2008) a análise por BOX-PCR resulta em perfis com maior amplicons e menor custo na análise, por requerer um único primer (palíndromo) . Além disso, a análise por BOX-PCR possui poder de discriminação e confiabilidade em diferenciar estirpes, além de ser um método que possui repetibilidade, sendo recomendando a obtenção de perfis a partir de BOX-PCR para a utilização no controle de qualidade de coleções de culturas de bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas (dA SILVA, 2013).

## **2.5 Quantificação da contribuição da fixação biológica de nitrogênio**

Segundo Baldani et al.(2009), as técnicas mais empregadas para a quantificação da FBN em plantas da família Poaceae, em casa-de-vegetação ou no campo, são: balanço de N total do sistema solo-planta, técnica de resposta de médio a longo prazo, e as técnicas isotópicas empregando o  $^{15}\text{N}$ , pela diluição isotópica utilizando o  $^{15}\text{N}$  ou pela abundância natural de  $^{15}\text{N}$ . Porém, para serem usadas em campo, ajustes importantes foram realizados envolvendo as culturas de cana-de-açúcar, arroz, milho (BODDEY et al., 2001).

A técnica de abundância natural vem sendo aplicada em algumas culturas como no arroz (BODDEY et al., 2001), milho (MONTAÑEZ et al., 2009), capim-elefante (DE MORAIS et al., 2012) e na cana-de-açúcar (BODDEY et al., 2000; URQUIAGA et al., 2012; SCHULTZ et al., 2014). Esta técnica parte do princípio da evidência de enriquecimento naturalmente do solo onde qualquer material existente na atmosfera que possua nitrogênio em sua constituição apresenta a seguinte composição isotópica: 99,6337 % de átomos de  $^{14}\text{N}$  e 0,3663 % de átomos de  $^{15}\text{N}$ , considerado estável (JUNK & SVEC, 1958). Como já descrito anteriormente, o N do solo é levemente enriquecido em  $^{15}\text{N}$  em comparação ao  $\text{N}_2$  do ar (SHEARER & KOHL, 1986). Existe uma diferença de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  entre as plantas que obtêm o nitrogênio do ar e as plantas que obtêm o N apenas do solo, estas são chamadas plantas de referências.

Como as diferenças entre o enriquecimento natural de  $^{15}\text{N}$  no solo e no ar são extremamente pequenas, foi proposto o uso da unidade delta, delta  $^{15}\text{N}$  ( $\delta^{15}\text{N}$ ). Uma unidade de  $\delta^{15}\text{N}$  representa uma diferença de um por mil (1‰) no enriquecimento de  $^{15}\text{N}$  entre o solo e o ar, sendo que por convenção que o último representa  $\delta^{15}\text{N} = \text{zero}$ . Sendo assim, o solo pode apresentar valores de 0 a 30 por mil a mais de  $^{15}\text{N}$  que o ar, variando, geralmente, de quase zero (em solos arenosos e pobres em matéria orgânica) até 10 deltas em solos altamente intemperizados, argilosos e com mais matéria orgânica (BALDANI et al., 2009).

Espécies capazes de obter da atmosfera a maior parte do N necessário para sua nutrição, apresentarão valores de  $\delta^{15}\text{N}$  bem próximos a zero, uma vez que a maior parte virá do  $\text{N}_2$  atmosférico que é o padrão da técnica, e possui 0,3663 % de  $^{15}\text{N}$ , ou seja, zero unidades de  $\delta^{15}\text{N}$  em excesso. Por outro lado, as espécies não fixadoras crescendo no mesmo solo, terão valores de  $\delta^{15}\text{N}$  mais elevados e próximos aos do solo, uma vez que todo ou a maior parte do N necessário para o seu desenvolvimento será derivado do N disponível no solo (SCHULTZ, 2012).

A utilização da técnica de abundância natural de  $^{15}\text{N}$ , tem sido amplamente utilizada nos últimos anos devido ao menor custo e a possibilidade de aplicação imediata em sistemas naturais ou agrícolas. Entretanto, a análise da abundância natural do  $^{15}\text{N}$  demanda equipamentos mais sofisticados e, dependendo do local de estudo, a variabilidade na marcação natural do solo e os processos de discriminação isotópica podem mascarar os resultados (BODDEY et al., 2001).

Existem relatos na literatura que a aplicação de inoculantes biológicos na cultura da cana-de-açúcar, pode atuar no desenvolvimento do sistema radicular, alterando sua morfologia, podendo comprometer o resultado da quantificação do N provindo da FBN

(ROESCH et al., 2005). Schultz et al. (2012), constataram fortes evidências de que o inoculante pode influenciar a marcha de absorção do N disponível no solo, provavelmente alterando a morfologia do sistema radicular, comprometendo assim a quantificação do N derivado do processo de FBN.

A seleção de variedades de poáceas com base na eficiência da FBN pode ser feita aplicando-se esta técnica. Na cana-de-açúcar, um levantamento realizado nas principais áreas produtoras do Brasil, foi constatado que a contribuição da FBN no primeiro ciclo de cultivo, quando a cultura geralmente não responde a adubação nitrogenada, teve alcance de até 71% das necessidades de N (BODDEY et al., 2001). Neste mesmo estudo foi constatado que a FBN em cana é fortemente dependente da variedade, do tipo de solo (disponibilidade de molibdênio) e das condições de umidade do solo. Xavier (2006), avaliando a FBN em sete variedades comerciais de cana e duas variedades selvagens em um solo com baixa fertilidade, baixos teores de N disponível (0,07% N<sub>total</sub>), sem fertilização nitrogenada e empregando milho e sorgo como referências, determinou que a contribuição da FBN nas variedades comerciais oscilou entre 24 a 43%.

Estes resultados ajudam explicar a baixa resposta da cultura à adubação nitrogenada, especialmente no primeiro ciclo, demonstra a importância da contribuição da FBN associada a esta cultura, não apenas para a economia de fertilizantes nitrogenados, mas também para a preservação do meio ambiente (BALDANI, et al., 2009).

Há necessidade de maior aprofundamento em estudos que determinem a real contribuição da FBN com o intuito de promover maior produtividade, assim como, contribuir para a preservação do meio ambiente. Apesar da constância com que as bactérias endofíticas são isoladas, ainda são pouco conhecidas suas potencialidades fisiológicas, que implicam diretamente nas possíveis trocas entre esses micro-organismos e plantas (MARTINS et al., 2008).

### 3. REFERÊNCIAS

- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, p.173-181, 2008.
- ANDO, S. Nitrogen fixation associated with endophytic bacteria. In: **Nitrogen Assimilation in Plants**, Ed. Ohyama, T. and Sueyoshi, K. (Research Signpost, Kerala, India), p. 215-231, 2010.
- ANDREOLLI, M.; LAMPIS, S.; ZAPPAROLI, G.; ANGELINI, E.; VALLINI, G. Diversity of bacterial endophytes in 3 and 15 year-old grapevines of *Vitis vinifera* cv. Corvina and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. **Microbiological Research**, v. 183, p. 42–52, 2016.
- ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40,p.417–432, 2009.
- ANTUNES, J. E. L. **Diversidade genética e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos em feijão-fava( *Phaseolus lunatos* L.)**. 2010. 108 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Piauí, Piauí. 2010.
- ARAUJO, F.F.; ARAÚJO, A.S.F.; FIGUEIREDO, M.V.B. **Role of Plant Growth-Promoting Bacteria in sustainable agriculture** In: Salazar A; Rios I (ed) Sustainable Agriculture: Technology, Planning and Management. Nova Science Publishers, New York, 2011.
- ASH, C.; PRIEST, F.G.; COLLINS, M. D.; Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Journal of Microbiology**, v. 64, p. 253-260, 1993.
- ASHRAF, M.A.; RASOOL, M.; MIRZA, M.S. Nitrogen fixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Advances in Biological Research**, v. 5, n.6, p.348-355,2011.
- BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, v.32, n.11, p.1559-1570, 2010.
- BALDANI J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5/6, p. 911-922, 1997.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane - reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v.29, n.4, p.417-423, 2002.

BALDANI, J.I.; TEIXEIRA, K.R.S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F.L.; HEMERLY, A.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; NOGUEIRA, E.M.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDOTTO, L.E. B.; SOARES, L.H.B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V.L.D.; CARVALHO, T.L.G.; ALVES, B.J.R.; JAMES, E.K.; JANTALIA, C.P.; FERREIRA, P.C.G.; VIDAL, M.S. & BODDEY, R.M. **Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família da Poaceae (antiga Gramineae)**. In: RIBEIRO, M.R.; NASCIMENTO, C.W.; RIBEIRO FILHO, M.R. & CANTALICE, J.R.B., eds. Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009. v.6, p.203-271.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E.; PRABHU, S.R.; HERNANDEZ, J.-P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 2014.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L.K.; BODANESE-ZANETTINI, M.H.; PASSAGLIA, L.M.P. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing Bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.39, p.311-320, 2008.

BENNETT, C. G. S.; BUZETTI, S.; SILVA, K. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; GARCIA, C. M. de P.; MAESTRELO, P. R. Produtividade e desenvolvimento da canaplanta e soca em função de doses e fontes de manganês. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.1661-1668, 2011.

BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 12, n. 4, 2011.

BODDEY, R.M., PEOPLES M.B., PALMER B. and DART P. J. Use of the <sup>15</sup>N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 57, n.3, p. 235-270, 2000.

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

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of the <sup>15</sup>N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, n.9, p.889-895, 2001.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Calculations and assumptions involved in the use of the A-value and <sup>15</sup>N isotope dilution techniques for the estimation of the contribution of plant-associated biological N<sub>2</sub> fixation. **Plant and Soil**, v. 145, p. 151- 155, 1992.

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

BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in Seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 3663-3668, 1998.

BUSSE, H. J., DENNER, E. B. M., LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. **Journal of Biotechnology**, v. 47, p. 3-38, 1996.

CASSAN, F., PERRIG, D., SGROY, V., MASCIARELLI, O., PENNAB, C., LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.28–35, 2009.

CASTANHEIRA, N.; CATARINA, A.; ISABEL, P., CORTÉS-PALLERO, A. M.; DELGADO-RODRÍGUEZ, A.; I.; PRAZERES, Â.; BORGES, N.; SÁNCHEZ, C.; TERESA, M. CRESPO, B.; FARELEIRA, P. Annual ryegrass-associated bacteria with potential for plant growth promotion. **Microbiological Research**, v. 169, p. 768–779, 2014.

CATTELAN, A.J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Embrapa Soja, Londrina, p.36. 1999.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v.108, p. 23-31, 1998.

CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZ-CABAÑA, R.; KLOEPFER, J. Biological control of *Fusarium* on cotton by use of endophytic bacteria. **Biol. Control.**, v.5, p.83-91, 1995

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

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; FERREIRA, M. C.; GRANGE, L.; CAMPO, R. J.; MOSTASSO, F. L.; ANDRADE, D. S.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, v. 4, n. 1, p. 80-95, 2000.

COELHO, C.H.M.; MEDEIROS, A.F.A.; POLIDORO, J.C.; XAVIER, R.P.; QUESADA, D.M.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Identificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto ao potencial de contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Agronomia**, v.37, n.2, p.37-40, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, v. 2 - Safra 2015/16, n. 3 - Terceiro levantamento, dezembro 2015.** Disponível em: [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_12\\_17\\_09\\_03\\_29\\_boletim\\_cana\\_p\\_ortugues\\_-\\_3o\\_lev\\_-\\_15-16.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_12_17_09_03_29_boletim_cana_p_ortugues_-_3o_lev_-_15-16.pdf)

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

CORREA, J.D.; BARRIOS, M.L.; GALDONA, R.P. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. **Plant Soil**, v.266, p.75-84, 2004.

COSTA, E. M. D.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. D.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. D. V. M.; MOREIRA, F. M. D.S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.48, n.9, p.1275-1284, 2013.

COUTINHO, H. L. da C.; OLIVEIRA., V. M. De; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 3, p. 491-503, 1999.

CREWS, T. E.; BROCKWELL, J.; PEOPLES, M. B. Host-rhizobia interaction for effective inoculation: evaluation of the potential use of the ureide assay to monitor the symbiotic performance of tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 1223-1228, 2004.

CRUZ, L. M.; MALTEMPI, S.E.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J.; OLIVEIRA, P.F. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p. 2375-2379, 2001.

DA SILVA, E. P. **Caracterização de Bactérias Endofíticas e Isolamento do Fitopatógeno *Exserohilum turcicum* de Milho Crioulo (*Zea mays* var. Rosado)**. MONOGRAFIA, GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRONOMICA. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, FLORIANOPOLIS, 2013, 53P

DASH, S.; GUPTA, N. Microbial bioinoculants and their role in plant growth and development. **International Journal Biotechnol Molecular Biology Research**, v. 2, p. 232–251, 2011.

DASHTI, N.; PRITHIVIRAJ, B.; HYNES, R.K.; SMITH, D.L.R. **Root and Rhizosphere Colonization of Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) by Plant-promoting Rhizobacteria at low root zone temperatures and under short season conditions.** v.185, p.1-15, 2000.

DE BÔER, M.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. Strains to enhance suppression of *Fusarium wilt* of radish. **European Journal of Plant Pathology**. v.105, p.201-210, 1999.

DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2180-2187, 1992.

DE MORAIS, R.F., QUESADA, D.M., REIS, V.M., URQUIAGA, S., ALVES, B.J.R., BODDEY, R.M. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant and Soil**, v. 356, p.23–34, 2012.

DESAINT, S. HARTMANN, A.; PAREKH, N.R.; FOURNIER, J.-C. Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Cumbria, v. 34, p.173-180, 2000.



- DÖBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107 – 149, 2003.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI,60p,1995.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M.; DART, P.J. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. **Plant and Soil**, v. 37,p.191–196, 1972.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. **Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison: Science Tech Publishers, 154p, 1987.
- ESQUIVEL-COTE, R.; GAVILANES-RUIZ, M.; CRUZ-ORTEGA, R.; HUANTE, P. Importancia agrobiotecnológica de la enzima acc desaminasa en rizobacterias, una revisión. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 36, n .3, p. 251–258, 2013.
- ESTRADA, G.A.; BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, D.M. de; URQUIAGA, S.; BALDANI, J.I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and Soil**, v.369, p.115-129, 2013.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; MERGULHÃO, SANTO, A. C. E. ; KUKLINSKY SOBRAL, J.; LIRA JUNIOR, M. DE A. ; ARAÚJO, A. S. F. **Biological nitrogen fixation: importance, associated diversity and estimates**. In: Naveen Krumar Arora. (Org.). Plant Microbe Symbiosis Fundamentals and Advances. 1ed.London: Springer New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London, v.1, p. 267-289, 2013.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; MARTINEZ, C.R.; CHANWAY, C.P. Alleviation of water stress effects in cammom bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation *Paenibacillus* x *Rhizobium tropici*. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 1, p. 182-188, 2008.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; SOBRAL, J.K.; STAMFORD, T.L.M.; ARAÚJO, J.M. Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.O.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P. **Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais**. Brasília: EMBRAPA Agrobiologia. Parte 4, cap.1, p.387-414, 2010a.
- FIGUEIREDO, M.V.B.; SELDIN, L.; ARAUJO, F.F. **Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications** In: MAHESHWARI, D.K. (Ed.) Plant growth and health promoting bacteria.1.ed. Berlin: Springer-Verlag. v.18, p.45-68, 2010b.
- FOSTER, N.F.; HARNETT, G.B.; RILEY, T.V.; CHANG, B.J. Cross-reaction of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Xanthomonas* species in a 23S rRNA genedirected PCR for detection of *S. maltophilia*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.4111-4113. 2008.
- FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v.321, n.1/2, p.35–59, 2009.

FREITAS, J. R.; VICTORIA, R. L.; RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B. Estimation of N<sub>2</sub> fixation by sugar cane, *Saccharum* sp. and soybean, *Glycine max*, grown in soil with <sup>15</sup>N labeled organic matter. **Plant and Soil**, v.82, p.257-261, 1984.

GILLINGS, M.; HOLLEY, M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. **Letters Applied Microbiology**, v. 25, p.17-21, 1997.

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

GLICK, B.R., Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p.1-15, 2012.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1389-1398, 2004.

GRIBALDO, S.; BROCHIER, C. Phylogeny of prokaryotes: does it exist and why should we care? **Research in Microbiology**, v.160, p.513-521, 2009.

GUIMARÃES, S.L.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; JACOB-NETO, J. Adição de molibdênio ao inoculante turfoso com bactérias diazotróficas usado em duas cultivares de arroz irrigado. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 42, n.3, p.393-398, 2007.

HAN, J.; SUN, L.; DONG, X.; CAI, Z.; SUN, X.; YANG, H.; WANG, Y. & SONG, W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. **Systematic and Applied Microbiology**, v.28, p.66-76, 2005.

HOEFSLOOT, G.; TERMORSHUIZEN, A.J.; WATT, D.A.; CRAMER, M.D. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. **Plant and Soil**, v.27, p.85-96, 2005.

HOFFMAN, B. M.; LUKOYANOV, D.; YANG, Z.-Y.; DEAN, D.R.; SEEFELDT, L. Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. **Chemical Reviews**, v.114, p.4041-4062, 2014.

HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5,n.4, p.825-834, 1991.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. **Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX-PCR**. Londrina: Embrapa Soja, 2008.12p. (Comunicado Técnico/Recomendações Técnicas).

IGUAL, J.M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁSQUEZ, E. Phosphatesolubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of update molecular techniques in their study. **Agronomie**, v.21, p.561-568, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. 2015. Levantamento sistemático da produção agrícola.-2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 25 jan de 2016.

JÚNIOR, A. F. C.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização genética de rizóbio isolados de solos no Amazonas baseada na técnica de PCR-RFLP. **Comunicações científicas. Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.4, p.841-846, 2009.

JUNK, G.; SVEC, H. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 14, n. 3, p. 234-243, 1958.

KHAMIS, A.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1934–1936, 2005.

KIRCHOFF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 5/6, p. 853-862, 1997.

KLOPPER J.W.; LIFSHITZ R.; ZABLOTOWICZ R.M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 39-44, 1989.

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

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, v.273, p.91-99, 2005.

LACAIVA, P.T.; ANDREOTE, F.D.; AZEVEDO, J.L. **Metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos**, Parte II - Microrganismos promotores de crescimento em plantas, p.211-232. In: Figueiredo, M. V. B.; Burity, H.A.; Stamford, N.P.; Santos, C.E.R.S. *Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura*. Guaíba-RS: Agrolivros, v.1, 565 p., 2008.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M. R.; CHARNAY, M. P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S. I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: 88 Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2029-2036, 1996.

LAMBAIS, M.R. In silico differential display of defense-related expressed tags from sugarcane tissues infected with diazotrophic endophytes. **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.103-11, 2001.

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

- LEE S. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**. 186, n. 16, p. 5384-91, 2004.
- LEE, A.; WONG, E. Optimization and the robustness of BOX A1R PCR for DNA fingerprinting using trout lake *E. coli* isolates. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, v.13, p.104–113, 2009.
- LINDSTROM, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research in Microbiology**, v.161, p.453–463, 2010.
- LIRA-CADETE, L., FARIAS, A. R. B.; RAMOS, A. P. de S.; COSTA, D. P.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas Associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de Solubilizar fosfato inorgânico. **Bioscience Journal**, v. 28, n.1, p. 122-129, 2012
- LUCENA-PADROS, H. & RUIZ-BARBA, J. L. Diversity and enumeration of halophilic and alkaliphilic bacteria in Spanish-style green table-olive fermentations. **Food Microbiology**, v. 53, p.53-62, 2016.
- LUZ, E. W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 1-49, 1996.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.
- MARQUES, ASA.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON, R. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* – *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p.106–115, 2008.
- MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZIE.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERY, J.P. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.3479–3483, 1992.
- MARTINEZ-ROMERO, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.11-20, 1994.
- MARTINS, R.C.R.; BORTOLUCI, J.P.; FLOH, E.I.S.; BARBOSA, H.R. **Associações *in vitro* entre bactérias endofíticas diazotróficas e calos de cana-de-açúcar**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE ECOFISIOLOGIA, MATURAÇÃO E MATURADORES EM CANA-DE-AÇÚCAR, v.1, Botucatu. Anais. Botucatu: UNESP, 2008.
- MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 5., 2007, Recife. **Anais**. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia, 2007. p. 129-140.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Boletim mensal de energia**, novembro de 2015, 2 p. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/documents/10584/1143612/01+-+Boletim+Mensal+de+Energia+%28Novembro+2015%29+%28PDF%29/342b3d97-96dc-4c80-95d8-b5ee4e96aea5?version=1.1>. Acesso em 14 de dezembro 2015.

MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by N-15 isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 3, p. 253-263, 2009.

MONTEIRO, R.A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A.M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C.; SCHMIDT, M.A.; TADRA-SFEIR, M.Z.; PANKIEVICZ, V.C.S.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E. M. *Herbaspirillum* -plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, p.175–196, 2012.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n. 2, p. 74 – 99, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora UFPA, 2ª edição, 729p., 2006.

NEVES, M. F.; TROBIN, V. G.; CONSOLI, M. O mapa sucroenergético do Brasil. In: SOUZA, E.L.L.; MACEDO, I. (Org.) **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética**. São Paulo: LUC Projetos de Comunicação (Editora), Cap. 2, p.14 – 43, 315 p. 2010.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field incubation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, n.12, p.1591-1601, 1994.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, 71 predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils, Berlin**, v.21, n.3, p. 197- 200, 1996.

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M. SCHMID, M. REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 106-113, 2009.

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

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

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

ORLANDO FILHO, J.; HAAG, H.P.; ZAMBELLO JR., E. **Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função de idade em solos do Estado de São Paulo**. Planalsucar, Bol. Téc. n.2, 128p, 1980.

PACE, N. R. et al. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, v. 9, p. 1-55, 1986.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 29, p. 62-76, 2002.

PEREG, L.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. **Plant and Soil**, v.399, p.389–414, 2016.

PEREIRA, P.; IBÁÑEZ, F.; ROSENBLUETH, M.; ETCHEVERRY, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Analysis of the bacterial diversity associated with the roots of maize (*Zea mays* L) through culture-dependent and culture-independent methods. **International Scholarly Reseach Network**, v.2011, p.1-10, 2011.

PEREIRA, W.; LEITE, J.M.; HIPÓLITO, G.S.; SANTOS, C.L.R.; REIS, V.M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, n.2, p.363-370, 2013.

PINOT, C.; DEREDJIAN, A.; NAZARET, S.; BROTHIER, E.; COURNOVER, B.; SEGONDS, C.; FAVRE-BONTE, S. Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from environmental and clinical samples: a rapid and efficient procedure. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p.1185-1193. 2011.

POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; QUESADA, D. M.; XAVIER, R. P.; COELHO, C. H. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. **Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana -de-açúcar no Brasil**. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2001. (Embrapa Agrobiologia. Documentos 144). 8p.

RAIJ, B.V. Fertilidade do solo e adubação. **Potafos**, Piracicaba, 343p, 1991.

RATÓN, T.M.O.; YANO, R.; GÁMEZ, O.R.; FLOH, E.I.S.; DÍAZ, M.J.S.; BARBOSA, H.R. Isolation and characterisation of aerobic endospore forming Bacilli from sugarcane rhizosphere for the selection of strains with agriculture potentialities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, n.4, p.593-603, 2011.

REINHOULD, B.; HURCK, T.; FENDRICK, I.; GILLIS, M.; DELEY, J. *Azospirillum halopraeferans* nov. a nitrogen fixing organisms associated with roots of Kallar grasses. **International Journal of Systematics Bacteriology**, v.37, p.43-51, 1987.

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

REIS, V., LEE, S., AND KENNEDY, C. Biological nitrogen fixation in sugarcane. p. 213-232. **In: Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial**

**Associations**, Ed. Emerich, C. and Newton W.E., Springer, Dordrecht, The Netherlands. p. 213-232, 2007.

REIS, V.M. Ocorrência de micorrizas arbusculares e da bactéria Diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, n.10, p.1933-1941, 1999.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palmtrees. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.3, p.227-247, 2000.

RENWICK, A.R.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Physiology**, v. 40, p.524-532, 1991.

RESENDE, A. S. **A fixação biológica de nitrogênio como suporte da produtividade e fertilidade nitrogenada dos solos na cultura de cana-de-açúcar: Uso de adubos verde**. 2000. 124 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

RIBEIRO, R.A.; BARCELLOS, F.G.; THOMPSON, F.L.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. **Research in Microbiology**, v.160, p.297–306, 2009.

RICHARDSON, A.E.; SIMPSON, R.J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 989-996, 2011.

RODAS, A. M.; FERRER, S. PARDO, I. 16S-ARDRA, a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 26, p. 412-422, 2003.

RODRIGUES, A.C.; ANTUNES, J. E. L.; COSTA, A.F.D., OLIVEIRA, J. D. P.; FIGUEIREDO, M. V. B. Interrelationship of *Bradyrhizobium sp.* and Plant Growth-Promoting Bacteria in Cowpea: Survival and Symbiotic Performance. **Journal of Microbiology**, v.51, n.1, p.49-55, 2013.

RODRIGUES, A.C.; ANTUNES, J.E.L.; MEDEIROS, V.V. de; BARROS, B.G. de F.; FIGUEIREDO, M. do V.B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium sp.* em caupi. **Bioscience Journal**, v. 28, n. p. 196-202, 2012.

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

RODRÍGUEZ-ANDRADE, OSVALDO; FUENTES-RAMÍREZ, LUIS E.; MORALES-GARCÍA, YOLANDA E.; MOLINA-ROMERO, DALIA; BUSTILLOS-CRISTALES, MARÍA R. et al. The decrease in the population of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane after nitrogen fertilization is related to plant physiology in split root experiments. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n.4, p. 335-343, 2015.

ROESCH, L.F.W.; FULTHORPE, R.R.; JACCQUES, R.J.S. Biogeography of diazotrophic bacteria in soils. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.1503–1508, 2010

ROESCH, L. F.; CAMARGO, F. O.; SELBACH, P. A, SÁ, E. S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural**, v.35, p.1201-1204, 2005.

ROSA, G. R. (coord.) **Anuário brasileiro da cana-de-açúcar 2005**. 1ª. ed. Santa Cruz do Sul: **Gazeta** Santa Cruz, 2005.136p.

RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; MORGADO, L.B. & NEVES, M.C.P. **Feijão-caupi tem uma nova estirpe de rizóbio, BR3267, recomendada como inoculante**. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2006. 16p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15).

RUSCHEL, A.P.; MATSUI, E.; SALATI, E.; VOSE, P.B. Potential N<sub>2</sub>- fixation by sugar cane (*Saccharum* sp.) in solution culture. II. **Effect of inoculation and dinitrogen fixation as directly measured by <sup>15</sup>N<sub>2</sub>**. In: Vose, P.B., Ruschel, A.P. (Eds.), Associative N<sub>2</sub>-Fixation, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL, p.127-132. 1981.

SAAVEDRA, M. E. M. **Estudio del caracter endofito de bacterias aisladas de plantas de arroz en las marismas del Guadalquivir**. (Tesis doctoral). Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 2013.

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

SAIKIA, P.; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma? **Current Science**, Bangalore, v. 92, n. 3, p.317-322, 2007.

SAMPAIO, E.V.S.B.; SALCEDO, I.H.; BETTANY, J. Dinâmica de nutrientes e cana-de-açúcar. I.Eficiência na utilização de uréia (<sup>15</sup>N) em aplicação única ou parcelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, p.943-949, 1984.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKYSOBRA, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, Supplement 1, p. 142-149, 2012.

SANTOS, J. DA S.; VIANA, T. DE O.; DE JESUS, C. M.; VERA LÚCIA DIVAN BALDANI, V. L. D.; FERREIRA, J. S. 2015. Inoculation and Isolation of Plant Growth-Promoting Bacteria in Maize Grown in Vitória Da Conquista, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n.1, p. 78–85, 2015.

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

SARKAR, A.; REINHOLD-HUREK, B. Transcriptional Profiling of Nitrogen Fixation and the Role of NifA in the Diazotrophic Endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. **Plos One**, v. 9, n. 2, p.1-12, 2014.



SCHULTZ, N. **Fixação Biológica de nitrogênio associada à cultura de cana de açúcar: eficiência e contribuição da inoculação com bactérias diazotróficas.** 2012. 119f. Tese (Doutorado em Agronomia Ciência do solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A. DA; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F. DA; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 407-414, 2014.

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

SELENSKA-POBELL, S. Direct and simultaneous extraction of DNA and RNA from soil. In: ACKERMANS, A. D. L.; Van ELSAS, J. D., De BRUIJN, F. D. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology Manual**, Kluwer Academic, Dordrech, p.1-17, 1995.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N<sub>2</sub> fixation in field settings: estimations based on natural <sup>15</sup>N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, p.699-756, 1986.

SHUKLA, S.K.; YADAV, R.L.; SUMAN, A.; SINGH, P.N. Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in udic ustochrept soil. **Soil and Tillage Research**, v.99, p.158-168, 2008.

SIMÕES NETO, D. E.; OLIVEIRA, A. C. de; ROCHA, A. T. da; FREIRE, F. J.; FREIRE, M. B. G. dos S.; NASCIMENTO, C. W. A. do. Características agroindustriais da cana-de-açúcar em função da adubação fosfatada, em solos de Pernambuco. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**. v.16, p.347–354, 2012.

SINGH, K.P.; SUMAN, A.; SINGH, P.N.; LAL, M. Yield and soil nutrient balance of sugarcane plant-ratoon system with conventional and organic nutrient management in subtropical India. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v.79, p.209-219, 2007.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, O. Plant growth-promoting actions of rizobacteria. **Advances in Botanical Research**, v.51, n.2, p.283-320, 2009.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNADNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, p. 846-849, 1994.

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

STOCCO, P. et al. Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiossantes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, n.3, p.1107-1120, 2008.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.4, p.491-502, 2003.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, v.15, p.183-190, 2000.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V.M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n.1, p.35-49, 2012.

TIEDJE, J. M.; CHO, J. C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; AHOU, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: REES, R. M.; BALL, B. C.; CAMPEBELL, C. D.; WATSON, C. A. (Org.). **Sustainable management of soil organic matter**. Wallingford: CAB International, 2001. p. 393-412.

TRIPP, H.J.; BENCH, S.R.; TURK, K.A.; FOSTER, R.A.; DESANY, B.A.; NIAZI, F. AFFOURTIT, J.P.; ZEHR, J.P. Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. **Nature**, v. 464, p.90-94, 2010.

TYSON, G. W.; BANFI, J.F. Cultivating the uncultivated: a community genomics perspectives. **Trends in Microbiology**, v.13, p.411-415, 2005.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (ÚNICA). Acompanhamento de estimativas da safra 2014/2015. Disponível em: < <http://www.novacana.com/tag/185-safra-2014-2015/>. Acesso em: 12 janeiro de 2016.

URQUIAGA, S., XAVIER, R., MORAIS, R.F., BATISTA, R., SCHULTZ, N., LEITE, J.M., RESENDE, A., ALVES, B.JR., BODDEY, R.M. Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data of the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**. n.356,p.5-21, 2012.

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

URQUIAGA, S.; LIMA, R.M.; XAVIER, R.P.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Avaliação da eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio em diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Agronomia**, v.37, n.1, p.55-58, 2003.

URQUIAGA, S.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Biological Nitrogen fixation as support for the sustainable production of sugar cane in Brazil: Perspectives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.71, n.3, parte II, p.505-513, 1999.

VAN ELSAS, J.D.; BOERSMA, F.G.H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n.2, p.77-87, 2011.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407- 438, 1996.

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

VIDEIRA, S. S.; DE OLIVEIRA, D. M.; DE MORAIS, R. F.; BORGES, W. L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 51–66, 2011.

VITTI, A.C.; TRIVELIN, P.C.O.; CANTARELLA, H.; FRANCO, H.C.J.; FARONI, C.E.; OTTO, R.; TRIVELIN, M.O.; TOVAJAR, J.G. Mineralização da palhada e crescimento de raízes de cana-de-açúcar relacionados com a adubação nitrogenada de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p.2757-2762, 2008.

WENBO, M.; ZALEC, K.; GLICK, B. R. Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. **FEMS Microbiology Ecology**, v.35, p.137-144, 2001.

WEZEL, A.; CASAGRANDE, M.; CELETTE, F.; VIAN, J. F.; FERRER, A.; PEIGNÉ, J. Agroecological practices for sustainable agriculture. A review. **Agronomy for sustainable development**, v.34, n.1, pp 1-20, 2014.

XAVIER, R. P. **Adubação verde em cana-de-açúcar: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita**. 2002. 108p. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ.

XAVIER, R.P. **Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio na Produção Sustentável da Cultura de Cana-de-Açúcar**. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, 2006.

YADAV, R. L.; SUMAN, A.; PRASAD, S. R.; PRAKASH, O. Effect of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Trichoderma viride* on soil health, yield and N-economy of sugarcane cultivation under subtropical climatic conditions of India. **European Journal of Agronomy**, v. 30, p. 296–303, 2009.

YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T. H.; DACANAY, E. V.; NAKANISHI, Y. The natural <sup>15</sup>N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, v. 189, p. 239-244, 1997.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G. ; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H.L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

ZOHARA, F.; AKANDA, M. A. M.; PAUL, N. C.; RAHMAN, M. , ISLAM, M. T. Inhibitory effects of *Pseudomonas* spp. on plant pathogen *Phytophthora capsici* in vitro and in planta. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p.69–77, 2016.

## Parte I

# CARACTERIZAÇÕES MORFOFISIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM CANA-DE-AÇÚCAR

## RESUMO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) tem um papel de destaque mundial, sendo matéria-prima de duas das principais *commodities* brasileira, o açúcar e o etanol. O estudo da diversidade da comunidade microbiológica associada à cana-de-açúcar é uma ferramenta que pode auxiliar na obtenção de bactérias eficientes para promoção do crescimento das plantas, aumentando a produtividade e diminuindo a utilização de insumos. As bactérias podem interagir com a planta de forma direta, fornecendo substâncias que auxiliam no crescimento vegetal. O objetivo desse trabalho foi isolar e determinar as características morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares de bactérias endofíticas de folha e colmo de três variedades de cana-de-açúcar (RB 867515; RB 1011 e RB 92579), visando à formulação de inoculantes microbianos com potencial de promover crescimento vegetal. O oligonucleotídeo BOX-A1R, foi utilizado para diferenciar os isolados semelhantes e posterior sequenciamento parcial do gene 16S rRNA ribossomal. Foram obtidos 56 isolados, sendo 62,5% do colmo e 37,5% da folha, em sua maioria Gram positivos, de crescimento rápido e não produtores de muco em meio de cultura. O BOX-PCR permitiu diferenciar os isolados em 34 perfis de bandas diferentes, pela formação de cinco agrupamentos distintos. Foram selecionados 35 isolados para os testes bioquímicos e/ou fisiológicos. Todos apresentaram respostas positivas e variáveis para o ácido indol-3-acético(AIA) na presença de L-triptofano, variando de 0,01 a 30,77 mg de AIA.L<sup>-1</sup>; 97 % reduziram acetileno (ARA) com valores entre 4,14 e 7,84 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/hora/mg de proteína ; 66 % apresentaram capacidade de solubilizar fosfato inorgânico; 26 % de produzirem urease, 34 % de produzirem proteases; 17 % de produzirem amilase; 68 % de produzirem lipase; 14 % de produzirem quitinase; 17 % de produzirem sideróforo; 71 % de produzirem ACC deaminase; 54 % de produzirem N-acil-homoserina lactona (AHL); 51 % de produzirem catalase e 23 % apresentaram capacidade hidrolítica de degradarem a gelatina. O sequenciamento do gene 16S rRNA indicou a presença de sete diferentes gêneros, distribuídos em quatro grupos, sendo o gênero *Bacillus* com maior número de representante (46 %), seguido de *Paenibacillus* (20 %), *Burkholderia* (14 %), *Herbaspirillum* (6 %), *Pseudomonas* (6 %), *Methylobacterium* (6 %) e *Brevibacillus* (3 %). As caracterizações bioquímica e molecular dos isolados endofíticos de colmo e folha de cana-de-açúcar revelou uma diversidade de bactérias colonizando esta planta, com potencial biotecnológico para serem usadas como biofertilizantes. Foram selecionados três isolados (IPAC-CC9, IPA-CC33 e IPA-CF65) pela atividade da nitrogenase e em conjunto com as respostas dos testes bioquímicos para serem avaliados quanto ao potencial de promoção de crescimento na cana-de-açúcar em experimentos em campo.

**Palavras-chave:** Bactérias promotoras de crescimento em plantas; fixação biológica do nitrogênio; BOX-PCR; 16S rRNA

## MORPHOPHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION, BIOCHEMICAL AND MOLECULAR ENDOPHYTIC BACTERIA IN SUGARCANE

### ABSTRACT

The culture of sugarcane (*Saccharum* spp.) Has a global leadership role, with raw material from two of the main Brazilian commodities, sugar and ethanol. The study of microbial diversity associated with plants, especially those of global economic importance, presents itself as an important alternative to improve its characteristics thus promoting more and better sustainability. This process can be based on the development of microbial inoculants containing bacteria capable of increasing crop productivity, reducing both the environmental impact and the cost of production for the producer. Bacteria can interact directly with the plant, providing substances that aid in plant growth. The objectives of this study was to isolate and determine the morphophysiological and molecular characteristics of endophytic leaf isolated and thatched three varieties of sugarcane: RB 867 515; RB 1011 and RB 92579, aiming to promote plant growth. The oligonucleotide BOX-A1R was used to differentiate between similar and further isolated partial sequencing 16S rRNA ribosomal gene. 56 isolates were obtained, being 62.5% and 37.5% of the stem of the leaf. Morphophysiological characterizations of all isolates were performed. For the Gram stain, 62.5% were positive. The BOX-PCR allowed to differentiate isolates in 34 different band profiles by forming five distinct groupings. 35 isolates were selected for biochemical and / or physiological such as Gram staining; urease; protease, amylase, lipase, chitinase, phosphate solubilization (NBRIP); siderophore; enzymatic activity of ACC deaminase; N-acyl homoserine lactones (AHLs); catalase; gelatinase; nitrogenase activity by the technique of reducing the acetylene (ARA) and production of indole-3-acetic acid (AIA). All isolates showed positive feedback variables to indole-3-acetic acid (AIA) in the presence of L-tryptophan of 0.1 of the 30.77 mg AIA.L<sup>-1</sup>, 97% reduced acetylene (ARA) the values ranging from 4.14 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 7.84 nmol / hr / mg protein, 65.71% showed ability to solubilize inorganic phosphate 25.71% to produce urease to produce proteases 34.29%, 17.14% to produce amylase, lipase to produce 68.57%, 14.29% to produce chitinase to produce siderophore 17.14%, 71.43% to produce ACC deaminase, 54.29% to produce N-acyl homoserine lactone (AHL), 51.43% of produce catalase 22.86% and 22.86% had hydrolytic ability to degrade gelatin. Sequencing of the 16S rRNA gene, indicated the presence of seven different genera distributed into four groups: the genus *Bacillus* with the most representative (45.71%), followed by *Paenibacillus* (20%), *Burkholderia* (14.29%) *Herbaspirillum* (5.71%), *Pseudomonas* (5.71%), *Methylobacterium* (5.71%) and *Brevibacillus* (2.86%). Biochemical and molecular characterization of endophytic isolates stem and sugarcane leaf, revealed a diversity of bacteria colonizing this plant, with biotechnological potential to be used as bio-fertilizers. Three isolates were selected (IPAC-CC9, IPA-CC33 and IPA-CF65), the nitrogenase activity and together with the responses of biochemical tests for reviews the potential to promote growth in sugarcane field experiments.

**Key words:** Growth promoting bacteria in plants; biological nitrogen fixation; prospecting, BOX-PCR, 16S rRNA, siderophore

## 1 INTRODUÇÃO

Originária da Nova Guiné, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) foi a primeira atividade agrícola expressiva economicamente no Brasil, que atualmente é o maior produtor mundial. Introduzida no Brasil por volta de 1532 por Martim Afonso de Sousa, passou a ter, desde então, significativa importância para o país (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2008).

Estudos têm demonstrado que a fixação biológica de nitrogênio (FBN) contribui significativamente no nitrogênio total da cultura da cana-de-açúcar (REIS et al., 1999; TAULÉ, et al., 2012). A FBN é realizada por representantes de diversos grupos filogenéticos bacterianos, denominados diazotróficos. Estas bactérias podem ser encontradas livres em diversos ecossistemas, estabelecer simbioses ou estar associados às plantas, sendo neste último caso denominados de diazotróficas associativas. As bactérias diazotróficas associativas podem contribuir para o crescimento vegetal não só pelo fornecimento de nitrogênio, mas também por outros mecanismos como produção de fitormônios, solubilização de fosfatos e antagonismo a fitopatógenos (MOREIRA et al., 2010).

As bactérias diazotróficas, podem colonizar a região rizosférica, o interior (endofíticas) ou superfície (epifíticas) de tecidos vegetais, inclusive plantas de cana-de-açúcar promovendo ganhos em seu desenvolvimento (BODDEY et al., 2003). As bactérias endofíticas podem ter uma vantagem sobre as bactérias que habitam a rizosfera, uma vez que vivem dentro do tecido das plantas, o que representa uma oportunidade de estar sempre em contato com as células vegetais e, portanto, de exercer mais facilmente um efeito benéfico direto (SANTOYO et al., 2016).

Os mecanismos utilizados por bactérias que são consideradas promotoras de crescimento de plantas (BPCP's) são razoavelmente bem conhecidos e compreendidos (GLICK, 1995; GAMALERO & GLICK, 2011; GLICK 2015). Conceitualmente, essas bactérias podem afetar o crescimento de plantas, de forma direta ou indireta. A promoção de forma direta ocorre quando a bactéria facilita a aquisição de recursos do ambiente, incluindo nitrogênio, fósforo e ferro; ou modulando o crescimento da planta, fornecendo ou regulando a expressão de vários hormônios vegetais, incluindo auxina, citocinina ou etileno. De forma indireta, a bactéria previne os danos às plantas que poderiam ser causadas por vários agentes patogênicos, incluindo bactérias, fungos e nematóides. Existe um grande número de mecanismos comuns que BPCP's usam para promover indiretamente o crescimento das

plantas, incluindo a produção de antibióticos, liberando enzimas que degradam a parede celular; diminuindo os níveis de etileno nas plantas, causado por estresses biótico e abiótico pela síntese da enzima ACC deaminase (1-aminociclopropano-1-carboxilato ) que cliva o composto ACC, o precursor imediato de etileno em todas as plantas superiores, induzindo a resistência sistêmica; diminuindo a quantidade de ferro disponível para agentes patogênicos assim como a síntese de compostos voláteis de inibição a patógenos (ALI et al., 2015; GLICK, 2015; PANDYA et al., 2015).

O número de espécies de bactérias identificadas como BPCP's tem aumentado consideravelmente nos últimos anos devido ao aumento da disponibilidade de ferramentas moleculares para o estudo de vários habitats revelando o modo de ação de várias espécies bacterianas (ALI et al., 2014; CHAUHAN et al., 2015; COUTINHO et al., 2015).

BOX-PCR é uma técnica utilizada para diferenciar isolados bacterianos filogeneticamente muito próximos (De BRUIJN et al., 1996; MENNA et al., 2009) podendo ser aplicada para análise genotípica de bactérias diazotróficas de maneira eficiente (LAGUERRE et al., 1997; KASCHUK et al., 2006) e para distinguir os isolados abaixo do nível de espécie (VERSALOVIC et al., 1991). A utilização do primer BOX-A1R tem permitido a caracterização de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pela formação e amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) de diversos perfis. Como a técnica é baseada na amplificação de regiões repetitivas do genoma, ela tem sido amplamente utilizada por ser considerada de fácil execução, principalmente para análise de grandes populações bacterianas (MEHTA et al., 2002).

Até hoje, a maioria das técnicas moleculares destinadas aos estudos microbiológicos são baseadas nas diferenças que existe na composição dos genes ribossomais. Em bactérias, o gene 16S rRNA é o mais amplamente utilizado, sendo considerado uma das mais importantes moléculas para o estudo filogenético e de ecologia microbiana (LOUWS et al., 1999). O sequenciamento desse gene permite a identificação de micro-organismos ao nível de gênero e possivelmente ao nível de espécie, como também pode permitir correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHENEBY et al., 2000).

O estudo da diversidade da comunidade microbiológica associada à cana-de-açúcar é uma ferramenta que pode auxiliar na obtenção de bactérias eficientes para promoção do crescimento das plantas, aumentando a produtividade e diminuindo a utilização de insumos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar e determinar as características morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares de bactérias endofíticas de folha e colmo de três

variedades de cana-de-açúcar (RB 867515; RB 1011 e RB 92579), visando à formulação de inoculantes microbianos com potencial de promover crescimento vegetal em plantas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta do material vegetal e isolamento de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar

Para o isolamento das bactérias diazotróficas endofíticas, foram utilizadas as variedades de cana-de-açúcar RB 867515; RB 1011 e RB 92579, coletadas em cultivos comerciais, antes da floração, na usina Japungú (7°10'38.85'' S / 34°58'12.72''W), no município de Santa Rita, e na destilaria Tabú (7°30' 30.19" S / 34°52' 33.17" W), no município de Alhandra, ambas na Paraíba. Folhas e colmos foram utilizados para o isolamento dos micro-organismos. As amostras foram transportadas para os laboratórios de Biologia do Solo e Genômica do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

Para a esterilização superficial das folhas foi utilizada água corrente, depois foram imersas em álcool a 70% por 30 min em seguida em uma solução de hipoclorito de sódio a 5% por 30min., lavadas com água destilada para a retirada do hipoclorito de sódio e secas em papel absorvente. Para os colmos, após lavagem superficial com água destilada, foi feita imersão em álcool a 70% por 30 min., seguida de lavagem com água destilada e posterior secagem em folhas de papel absorvente.

Para proceder ao isolamento, pequenos pedaços de folhas e colmos (10g) desinfestados superficialmente foram triturados, separadamente, com solução salina (NaCl a 5%) e colocados em tubos do tipo penicilina contendo meios semissólido específicos para *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia* spp., conforme metodologias sugeridas por Döbereiner et al. (1995) e Videira et al. (2007), com três repetições para cada amostra de planta. Ao tubos foram acondicionados em estufa bacteriológica a 30°C por até cinco dias até a visualização das películas aerotóxica típica. Os meios de cultivo utilizados estão descritos na Tabela 1.

Após a formação da película aerotóxica típica, próxima da superfície do meio, as culturas foram repicadas novamente para novos meios semissólidos, até formação de nova película (DÖBEREINER et al. 1995). Posteriormente, foram riscadas em placas de Petri, em meios sólidos específicos e em meio sólido batata e batata-P, incubadas em estufa a 30°C, por cinco dias, até a purificação dos isolados. Após a confirmação da pureza, os isolados foram



estocados em triplicata em meio de cultura batata e batata-p, adicionando ao meio de cultura óleo mineral estéril.

**Tabela 1:** Meios de cultivo (semissólido e sólido) sem adição de nitrogênio utilizados para o isolamento, purificação e armazenamento de bactérias diazotróficas endofíticas.

Gênero privilegiado	Meio de Cultivo e Armazenamento	Referências
<i>Azospirillum brasilense</i> , <i>A. lipoferum</i>	NFb, Batata	Baldani & Dobereiner (1980)
<i>Azospirillum amazonense</i>	LGI, Batata	Döbereiner et al. (1995)
<i>Gluconacetobacter spp.</i>	LGI-P, Batata-P	Baldani (1984); Döbereiner et al. (1995); Reis et al. (1994);
<i>Burkholderia spp.</i>	LGI e JMV, Batata	Baldani et al. (1984); Döbereiner et al.(1995); Estrada-de los Santos et al. (2001) e Reis et al. (1994)
<i>Herbaspirillum spp.</i>	JNFb, Batata	Baldani et al. (1992); Videira et al. (2004)
<i>Sphingomonas spp.</i>	JNFb, Batata	Baldani et al., (1992); Baldani, (1996) ; Videira et al. (2004)
<i>Pantoea spp.</i>	LGI-P, Batata-P	Reis et al., (1994); Döbereiner et al. (1995); Loiret et al.,(2004)

## 2.2 Caracterizações morfológica e fisiológica das colônias

As caracterizações morfológica e fisiológica da coleção de bactérias foi determinada em placas de Petri com meio 79 modificado (REIS et al., 2011) com indicador azul de bromotimol, sendo as características observadas até 192 horas de crescimento. Foram observadas as seguintes características morfológicas das colônias isoladas: forma (C – circular, L – lenticular, I – irregular); cor (B – branca, A – amarela, C - creme, T – transparente, R – rósea); borda (I – inteira, O – ondulada , F-filamentosa); superfície (L – lisa, R – rugosa, F – filamentosa); transparência (TL – translúcida, OP – opaca TP – transparente) e tamanho ( <1mm ou >1mm) . As características fisiológicas avaliadas foram: tempo de crescimento (R - rápido, 1 a 2 dias, I - intermediário, 3 a 4 dias, L – lento, 5 a 8 dias); formação de ácidos e álcalis (AC – ácida, AL – alcalina); formação de muco ( A - ausente, P - presente); volume do muco (UM – muito, P – pouco, S – seco) (MELLONI, 2006).

## 2.3 Caracterização bioquímica

Os isolados foram crescidos em meio TSB (caldo triptona de soja) a 25% e submetidos a testes bioquímicos tais como: coloração de Gram (YANO et al., 1991); produção de urease

(ROBERGE & KNOWLES, 1966); protease (DEES et al., 1995); amilase (VEDDER, 1915); lipase e quitinase (RENEWICK et al. 1991); solubilização de fosfato (NAUTIYAL, 1999; VERMA et al., 2001); produção de sideróforo (SHIN et al., 2001); atividade enzimática da ACC deaminase (PENROSE & GLICK, 2003); produção de N-acil-homoserina lactonas (AHLs) (CHA et al. 1998); produção de catalase (YANO et al., 1991); teste de gelatinase (YANO et al., 1991); atividade da nitrogenase pela técnica da redução do acetileno (ARA) (BODDEY et al., 1990) e produção de ácido indol-3- acético (AIA) (SARWAR & KREMER, 1995).

## **2.4 Caracterização genética**

### **2.4.1 Extração do DNA**

Para a extração do DNA genômico dos isolados, estes foram cultivados em 5,0 mL do meio de cultura DYGS líquido (RODRIGUEZ NETO, 1986) e incubados a 30 °C, em mesa agitadora, a 200 rpm por 48h. Após esse período, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão de células foi transferida para microtubos de 1,5 mL, sendo centrifugados por 3 minutos a 13.000 rpm. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e com o precipitado foi realizado a extração do DNA, utilizando-se o Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), conforme instruções do fabricante. Após a extração do DNA dos isolados, a sua integridade foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

### **2.4.2 Análise de “*fingerprint*” pela amplificação do elemento BOX**

Após a extração, o DNA dos isolados foi amplificado pela técnica de PCR. As amostras de DNA genômico foram quantificadas em Nanodrop® (*Thermo Scientific*) e diluídas com água milli-Q estéril para 30 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , depois armazenadas a -20 °C. Para amplificação do elemento BOX, foi utilizado o oligonucleotídeo BOX-A1R (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') sintetizado pela Invitrogen™ (Life Technologies) (VERSALOVIC et al., 1994). A reação de amplificação com volume final de 20,0  $\mu\text{L}$  foi a seguinte: 10% Tampão 10X; 0,2 mM dNTPs; 2mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\mu\text{M}$  0,3 U de Taq DNA polimerase; DNA molde (20-30 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ ). As condições de amplificação foram ajustadas de Freitas et al., (2007): um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 9 min, 30 ciclos de desnaturação (1 min, a 94 °C), anelamento (1 min, a 55 °C) e extensão (5 min, a 72 °C), um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 min. Todas as reações foram realizadas no termociclador 2720 da Applied Biosystems.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese, contendo tampão TBE 0,5X a 100 V, durante 40 min em géis de agarose a 1,2 %, corados com SybrGold (Sigma) e fotografados em fotodocumentador LPIX-HE da Loccus do Brasil. O perfil de bandas no gel foi transformado em uma matriz binária bidimensional, onde 0 indica ausência e 1, presença de bandas, sendo o agrupamento realizado pelo programa NTSYS-pc 2.1, usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic mean).

A matriz foi computada pela similaridade dos dados quantitativos (SIMQUAL), conforme Sokal & Sneath (1963), e o algoritmo de agrupamento usado foi SAHN – Sequential agglomerative hierarical nested cluster analysis, para elaboração da árvore filogenética e a formação do gráfico (SNEATH & SOKAL, 1973). O algoritmo usado para converter a árvore matriz em um dendrograma, o Tree Plot (ROHLF, 1975), e o coeficiente de Simple Matching (SM) foram utilizados visto que são úteis para valores binários realizados para informações de igualdade (simetria). A correlação expressa como porcentagem de similaridade e semelhança mínima, a um nível de 65% entre os isolados, foi utilizada como o critério para definir uma OTU (Operational Taxonomic Unit), segundo Yang et al. (2004).

Os isolados que mostraram padrões de bandas distintos foram considerados para os estudos bioquímicos e sequenciamento do gene 16S rRNA.

### **2.4.3 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA**

O gene 16S rRNA ribossomal foi amplificado com os seguintes oligonucleotídeos: fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e rD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') (WEISBURG et al., 1991). A reação foi realizada para um volume final de 50,0 µL, contendo: 10% Tampão 10X; 0,2 mM de dNTPs ; 0,2 µM primer; 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3 U de Taq DNA polimerase (5u.µL<sup>-1</sup>); DNA molde (20-30ng.µL<sup>-1</sup>). A reação foi iniciada com 3 min de desnaturação a 94°C, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 50 seg, anelamento a 57 °C por 50 seg, extensão a 72 °C por 60 seg, e extensão final a 72 °C por 7 min. Uma alíquota de 5,0 µL do produto da PCR foi analisada em gel de agarose 1,2 % em eletroforese a 100 V por 25min, corado com 1,5 µL de SybrGold (Sigma), e 3,0 µL de tampão de corrida (azul de bromofenol), utilizando como padrão de tamanho de DNA, o marcador molecular de 1kb plus (Promega). Os géis foram documentados através do programa “LabImagem 1D” da Loccus, usando o fotodocumentador LPIX-HE.

Na preparação dos produtos de PCR para a reação de sequenciamento foi realizada uma etapa de purificação, que consistiu em adicionar aos 25,0 µL da amostra do produto, 2,0 µL de acetato de amônio 7,5 M e 52,0 µL de etanol 100 %, e centrifugar a 10.000

rpm por 45 min a 20°C, descartando-se o sobrenadante e vertendo-se o tubo em papel toalha por 10 min. Em seguida, adicionou-se 150 µL de etanol 70% gelado, centrifugou-se novamente por 10 min a 4.000 rpm, descartou-se o etanol e verteu-se em papel toalha por 12h. O pellet contendo DNA foi ressuspêndido em 30,0 µL de água ultrapura estéril e conservado a -20°C, foi utilizado também para a purificação o kit GENCLEAN (PeqLab). O sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados foram realizados na empresa coreana Macrogen em Seoul (China) e/ou na Stabvida em Lisboa (Portugal).

#### 2.4.4 Análises das sequências

Para a separação dos grupos genotípicos, as sequências do gene 16S rRNA dos isolados foram alinhadas entre si, utilizando-se os programas *SeqMan Pro 7.1.0* do pacote Lasergene (DNASTAR) e o BioEdit 7.0.9, e posteriormente cortadas as extremidades após o alinhamento usando o programa ClustalW. Após o corte ficaram aproximadamente 1400 pb.

Após o alinhamento, e cortes das sequências que não foram alinhadas, para se obter sequências de tamanhos semelhantes, gerou-se uma matriz que foi convertida pelo programa MEGA v.5.1 e as sequências de nucleotídeos foram analisadas pelo código genético padrão. A árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbor Joining (NJ) (SAITOU & NEI 1987), usando-se o teste de filogenia Bootstrap, com 1000 repetições, deleção *pairwise*, onde neste caso os gaps são frequentemente inseridos durante o alinhamento de regiões homólogas de sequências e representam deleções ou inserções. O modelo usado foi de nucleotídeo, Jukes-Cantor, no qual a taxa de substituição de nucleotídeos é a mesma para todos os pares dos quatro nucleotídeos A, T, C e G. A equação de correção para este modelo produz uma máxima estimativa da probabilidade do número de substituições de nucleotídeos entre as duas sequências. Para as frequências de nucleotídeos iguais assume-se uma igualdade das taxas de substituição entre os locais (JUKES & CANTOR, 1969). O dendrograma foi construído através do programa TreeExplorer.

As sequências de nucleotídeos obtidas a partir do produto de PCR foram submetidas às análises comparativas no banco de dados do NCBI, usando a ferramenta BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al., 1990) do GenBank, fazendo uma busca direta por sequências de alta identidade com as sequências alvo com a finalidade de serem identificadas.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Obtenção dos isolados bacterianos

Foram obtidos 56 isolados, sendo 64,3% (36 isolados) do colmo e 35,7% (20 isolados) das folhas, nos três meios de cultivos utilizados. Foi observado maior número de isolados com capacidade de crescer em meio NFb que nos meios JNFb e LGI-P. Dos isolados obtidos, 54 % (30 isolados) foram provenientes do meio NFb; 32 % (18 isolados) do meio JNFb e 14 % (8 isolados) do meio LGI-P. Resultados semelhantes foram relatados Marra et al. (2012), que também observaram que o número de isolados também variaram em diferentes meios de cultura, destacando-se os meios NFb e JNFb quando comparados ao meio LGI.

De acordo com os resultados das análises feitas por identidade das sequencias pelo sequenciamento do gene 16S rRNA (apresentadas posteriormente), observou-se que os meios de cultivo não possibilitaram exclusivamente o isolamento dos gêneros de bactérias diazotróficas para os quais foram recomendados. Muitos micro-organismos isolados no meio para *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* spp. ou *Gluconacetobacter* spp. não apresentavam as características de tais gêneros. Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2015), onde ao usarem o meio JNFb conseguiram isolar *Methylobacterium radiotolerans* e *Bacillus pumilus* e não *Herbaspirillum* como descrito a especificidade do mesmo, isto porque os meios são semi-seletivos. Segundo Yanni et al. (1997), a comunidade de diazotróficos cultiváveis é extremamente variada e somente poucas bactérias já foram identificadas e caracterizadas.

A falta de especificidade dos meios de cultivo para o isolamento das bactérias diazotróficas, entre eles o meio NFB, já havia sido comprovada por Magalhães & Döbereiner (1984) e Baldani et al. (1999). Os autores consideraram que, além das espécies de *Azospirillum* que são favorecidas no meio NFb, outras bactérias diazotróficas também podem crescer neste meio. Esse crescimento em meio NFb foi observado para *Pseudomonas* (FERNANDES et al., 2001) e *Bacillus* (SILVA et al., 2015).

Era de se esperar um maior número de isolados com crescimento em meio LGI-P, por ser um meio que proporciona um melhor desenvolvimento de bactérias pertencentes à espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Estas bactérias necessitam de uma maior quantidade de açúcar para o seu desenvolvimento, e são bastante restritas a plantas ricas em açúcar, como cana-de-açúcar, batata doce e capim Camerom (DÖBEREINER et al., 1995).

A técnica microbiológica de seleção por meios específicos, por si só, não é mais capaz de identificar novos gêneros e muito menos espécies de bactérias diazotróficas

endofíticas, uma vez que as técnicas moleculares possuem maior precisão devido às diversas ferramentas utilizadas.

Em geral, um número significativo de bactérias diazotróficas é encontrado em tecidos de cana-de-açúcar, como descrito por Magnani et al. (2010), em maior quantidade nas raízes, no caule e nas folhas nessa ordem (CANUTO et al., 2003; GOMES et al., 2005; SUMAN et al., 2005). Os resultados encontrados neste trabalho, ou seja, a obtenção de um maior número de isolados a partir do colmo da planta, apontam para uma maior ocorrência dessas bactérias nesses tecidos que no tecido foliar da cana-de-açúcar, corroborando as inúmeras observações anteriores. Essa característica da ocorrência de endofíticos em cana-de-açúcar sugere a potencial transmissão desses micro-organismos através de material vegetal, contribuindo para a disseminação dos isolados, já que a multiplicação da cultura é por propagação vegetativa.

### **3.2 Caracterizações morfofisiológica e bioquímica dos isolados endofíticos**

As caracterizações morfológicas e fisiológicas dos isolados estão descritas nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. As características morfológicas, em geral, apresentaram pequena variação para a forma das colônias entre os isolados. A maioria dos isolados 46 (82 %) apresentaram forma circular, sete (12,5 %) irregular e apenas os isolados IPA-CC6, IPA-CC29 e IPA-CF45B apresentaram forma lenticular. Quanto a cor da colônia, a maioria dos isolados apresentou cor creme (43%) e amarela (41%), 9% dos isolados apresentaram cor branca, 3% transparente e apenas o isolado IPA-CF19 apresentou cor rósea. Para as características da borda da colônia, foi verificado que 76,78% dos isolados apresentaram borda inteira, 18% ondulada e apenas os isolados IPA-CC11, IPA-CC30B e IPA-CC30C apresentaram borda filamentosa. Para a superfície da colônia a variação entre os isolados foi sutil, quase 90 % (56 isolados) apresentaram superfície lisa, seguidos de 9% (5 isolados) com superfície rugosa e apenas o isolado IPA-CC11 com superfície filamentosa. Quanto à transparência da colônia, 39 % (22 isolados) apresentaram-se translúcidos, 30% (17 isolados) apresentaram-se opacos, esse mesmo número foi observado para colônia transparente. A maioria dos isolados, 70% (39 isolados) apresentou tamanho de colônia maior que 1mm, e apenas 30% (17 isolados) com tamanho menor que 1mm.

**Tabela 2** – Caracterizações morfológicas dos isolados de colmo e folha de cana-de-açúcar: forma, cor, borda, superfície, transparência e tamanho da colônia.

Isolado	Caracterizações morfológicas						Isolado	Caracterizações morfológicas					
	FOR	COR	BOR	SUP	TRP	TAM		FOR	COR	BOR	SUP	TRP	TAM
<b>IPA-CC1A</b>	CI	AM	IT	LS	TL	<1mm	<b>IPA-CC30C</b>	IR	TP	FL	LS	TR	<1mm
<b>IPA-CC1B</b>	CI	AM	IT	LS	TL	<1mm	<b>IPA-CC31</b>	CI	AM	IT	LS	OP	>1mm
<b>IPA-CC3A</b>	CI	CR	IT	LS	TL	>1mm	<b>IPA-CC32</b>	CI	AM	IT	LS	TL	>1mm
<b>IPA-CC3B</b>	CI	BR	IT	LS	TL	>1mm	<b>IPA-CC33</b>	CI	CR	IT	LS	TR	<1mm
<b>IPA-CC4</b>	CI	CR	IT	LS	OP	>1mm	<b>IPA-CC34</b>	CI	AM	IT	LS	OP	<1mm
<b>IPA-CC6</b>	LE	CR	OD	LS	TR	<1mm	<b>IPA-CC35</b>	CI	CR	IT	LS	TL	<1mm
<b>IPA-CC7</b>	IR	CR	IT	LS	TR	<1mm	<b>IPA-CC36</b>	CI	CR	IT	LS	OP	<1mm
<b>IPA-CC8</b>	CI	BR	IT	LS	TR	<1mm	<b>IPA-CC37</b>	CI	AM	OD	LS	TL	<1mm
<b>IPA-CC9</b>	CI	CR	OD	LS	TR	<1mm	<b>IPA-CC38</b>	CI	AM	OD	LS	TL	<1mm
<b>IPA-CC10</b>	CI	AM	IT	LS	OP	<1mm	<b>IPA-CF39</b>	CI	AM	IT	LS	TL	<1mm
<b>IPA-CC11</b>	IR	CR	FL	FL	OP	>1mm	<b>IPA-CF41</b>	CI	CR	IT	LS	OP	<1mm
<b>IPA-CF13A</b>	CI	AM	IT	LS	TL	>1mm	<b>IPA-CF42</b>	CI	AM	OD	LS	OP	>1mm
<b>IPA-CC14</b>	IR	AM	OD	RG	TR	<1mm	<b>IPA-CF43</b>	CI	AM	IT	LS	TL	<1mm
<b>IPA-CF16</b>	CI	AM	IT	LS	TL	<1mm	<b>IPA-CF44</b>	CI	CR	OD	LS	TR	<1mm
<b>IPA-CF18</b>	CI	CR	IT	LS	TL	<1mm	<b>IPA-CF45A</b>	CI	CR	IT	LS	TL	<1mm
<b>IPA-CF19</b>	CI	RO	IT	LS	TL	<1mm	<b>IPA-CF45B</b>	LE	AM	IT	LS	TL	>1mm
<b>IPA-CF20</b>	CI	CR	IT	RG	OP	>1mm	<b>IPA-CF46</b>	CI	CR	IT	LS	TR	>1mm
<b>IPA-CF21</b>	IR	AM	OD	LS	TL	<1mm	<b>IPA-CF47</b>	CI	CR	IT	LS	TR	>1mm
<b>IPA-CC22A</b>	CI	AM	IT	LS	OP	<1mm	<b>IPA-CC49</b>	CI	CR	OD	LS	TR	<1mm
<b>IPA-CC22B</b>	CI	CR	IT	LS	OP	<1mm	<b>IPA-CF48</b>	CI	AM	IT	LS	TL	>1mm
<b>IPA-CC23</b>	CI	BR	IT	LS	OP	<1mm	<b>IPA-CC51</b>	CI	AM	IT	LS	TR	>1mm
<b>IPA-CC24</b>	CI	AM	IT	LS	OP	<1mm	<b>IPA-CC52</b>	CI	BR	IT	LS	OP	<1mm
<b>IPA-CC25</b>	IR	CR	OD	LS	TL	<1mm	<b>IPA-CC55</b>	CI	BR	IT	LS	OP	>1mm
<b>IPA-CC26</b>	CI	CR	IT	LS	TL	<1mm	<b>IPA-CC56</b>	CI	TP	IT	RG	TR	<1mm
<b>IPA-CC27</b>	CI	CR	IT	LS	TR	<1mm	<b>IPA-CF61</b>	CI	AM	IT	RG	TL	<1mm
<b>IPA-CC28</b>	CI	CR	IT	LS	TR	>1mm	<b>IPA-CF62</b>	CI	CR	IT	LS	TR	<1mm
<b>IPA-CC29</b>	LE	CR	IT	LS	OP	<1mm	<b>IPA-CF65</b>	CI	AM	IT	RG	OP	>1mm
<b>IPA-CC30B</b>	IR	TP	FL	LS	TR	<1mm	<b>IPA-CF66</b>	CI	AM	IT	LS	TL	<1mm

FOR: forma da colônia (CI – circular, LE - lenticular, IR - irregular); COR: cor da colônia (BR – branca, AM – amarela, CR - creme, TP – transparente, RO – rósea); BOR: borda da colônia (IT – inteira, OD – ondulada, FL – filamentosa); SUP: superfície (LS – lisa, RG – rugosa, FL – filamentosa); TRP: transparência (TL – translúcida, OP – opaca, TR – transparente); TAM: tamanho(> 1mm ou <1mm).

Em relação ao tempo de crescimento dos isolados (Tabela 3), observou-se que 88% (49 isolados) apresentaram crescimento rápido, 7% (4 isolados) intermediário e 5% (3 isolados) com crescimento lento, levando até 168h para seu desenvolvimento.

**Tabela 3** - Caracterizações fisiológicas dos isolados de colmo e folha de cana-de-açúcar: tempo de crescimento, formação ácido/álcali, produção de muco, volume de muco.

Isolado	Caracterizações fisiológicas				Isolado	Caracterizações fisiológicas			
	TC <sup>1</sup>	FAA <sup>2</sup>	PM <sup>3</sup>	VM <sup>4</sup>		TC <sup>1</sup>	FAA <sup>2</sup>	PM <sup>3</sup>	VM <sup>4</sup>
IPA-CC1A	RP	AC	PS	PC	IPA-CC30C	RP	AL	PS	PC
IPA-CC1B	RP	AC	PS	PC	IPA-CC31	RP	AC	PS	MT
IPA-CC3A	RP	AL	PS	PC	IPA-CC32	RP	AC	PS	MT
IPA-CC3B	RP	AL	PS	PC	IPA-CC33	RP	AL	AU	SE
IPA-CC4	RP	AC	PS	MT	IPA-CC34	RP	AC	PS	MT
IPA-CC6	RP	AL	AU	SE	IPA-CC35	RP	AC	AU	SE
IPA-CC7	RP	AL	AU	SE	IPA-CC36	LT	AC	PS	PC
IPA-CC8	RP	AL	AU	SE	IPA-CC37	RP	AC	AU	SE
IPA-CC9	RP	AL	AU	SE	IPA-CC38	IT	AC	PS	PC
IPA-CC10	IT	AC	PS	PC	IPA-CF39	RP	AC	PS	PC
IPA-CC11	RP	AL	AU	SE	IPA-CF41	RP	AL	AU	SE
IPA-CF13A	IT	AC	AU	SE	IPA-CF42	RP	AL	PS	PC
IPA-CC14	RP	AC	AU	SE	IPA-CF43	RP	AC	PS	PC
IPA-CF16	RP	AC	AU	SE	IPA-CF44	RP	AL	AU	SE
IPA-CF18	IT	AC	AU	SE	IPA-CF45A	RP	AC	AU	SE
IPA-CF19	LT	AL	AU	SE	IPA-CF45B	RP	AC	AU	SE
IPA-CF20	RP	AC	AU	SE	IPA-CF46	RP	AC	PS	PC
IPA-CF21	RP	AC	AU	SE	IPA-CF47	RP	AC	PS	PC
IPA-CC22A	RP	AC	PS	MT	IPA-CC49	RP	AC	PS	PC
IPA-CC22B	RP	AC	PS	MT	IPA-CF48	RP	AC	PS	PC
IPA-CC23	RP	AC	AU	SE	IPA-CC51	RP	AC	AU	SE
IPA-CC24	RP	AC	PS	PC	IPA-CC52	RP	AC	AU	SE
IPA-CC25	RP	AC	AU	SE	IPA-CC55	RP	AC	AU	SE
IPA-CC26	RP	AC	PS	PC	IPA-CC56	RP	AC	AU	SE
IPA-CC27	RP	AC	PS	PC	IPA-CF61	RP	AC	AU	SE
IPA-CC28	RP	AC	PS	PC	IPA-CF62	LT	AL	AU	SE
IPA-CC29	RP	AC	AU	SE	IPA-CF65	RP	AC	AU	SE
IPA-CC30B	RP	AL	AU	SE	IPA-CF66	RP	AC	PS	PC

<sup>1</sup>Tempo de crescimento (TC) (RP - rápido, 1 a 2 dias, IT - intermediário, 3 a 4 dias, LT - lento, 5 a 8 dias); <sup>2</sup> Formação de ácidos e álcalis (FAA) (AC - ácida, AL - alcalina); <sup>3</sup> Produção de muco (PM) (AU - ausente, PS - presente); <sup>4</sup> Volume do muco (VM) (MT - muito, PC - pouco, SE - seco).

Quanto à produção de ácido e álcali (Tabela 3) observou-se pouca heterogeneidade, entre os isolados. A maioria 73% (41 isolados) teve reação ácida, tornando o meio verde-amarelo e 27% (15 isolados) com reação alcalina, tornando o meio de cultivo azul. Para a produção de muco, 46,5% (26 isolados) dos isolados observou-se a presença e 54% (30



isolados) ausência. Foi verificado o volume de muco produzido pelos isolados, sendo que dos isolados capazes de produzir muco, apenas 11% (6 isolados) produziram muito muco, 35%(20 isolados) produziram pouco muco e o maior número de isolados 54% (30 isolados) não foram capazes de produzir muco, sendo considerados secos.

### 3.3 Coloração de Gram

A determinação da coloração de Gram foi realizada para todos os isolados (Tabela 4). A maioria deles (62,5%, 35 isolados) foi considerada Gram-positiva e 37,5% (21 isolados) Gram-negativos. Resultados condizentes com as análises posteriores feitas por identidade das sequências pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

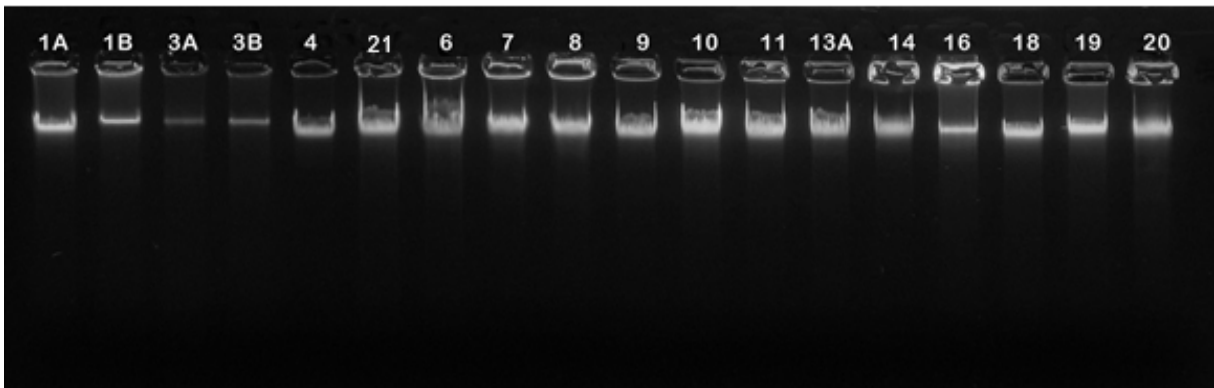
**Tabela 4** – Coloração de Gram dos isolados endofíticos de colmo e folha de cana-de-açúcar.

Isolado	Coloração de Gram	Isolado	Coloração de Gram
IPA-CC1A	GP	IPA-CC30C	GP
IPA-CC1B	GP	IPA-CC31	GN
IPA-CC3A	GP	IPA-CC32	GN
IPA-CC3B	GP	IPA-CC33	GN
IPA-CC4	GN	IPA-CC34	GP
IPA-CC6	GN	IPA-CC35	GN
IPA-CC7	GN	IPA-CC36	GN
IPA-CC8	GN	IPA-CC37	GN
IPA-CC9	GN	IPA-CC38	GN
IPA-CC10	GN	IPA-CF39	GN
IPA-CC11	GP	IPA-CF41	GP
IPA-CF13A	GP	IPA-CF42	GP
IPA-CC14	GP	IPA-CF43	GN
IPA-CF16	GP	IPA-CF44	GN
IPA-CF18	GP	IPA-CF45A	GP
IPA-CF19	GP	IPA-CF45B	GP
IPA-CF20	GP	IPA-CF46	GP
IPA-CF21	GP	IPA-CF47	GN
IPA-CC22A	GP	IPA-CF48	GN
IPA-CC22B	GP	IPA-CC49	GP
IPA-CC23	GP	IPA-CC51	GP
IPA-CC24	GN	IPA-CC52	GP
IPA-CC25	GP	IPA-CC55	GP
IPA-CC26	GN	IPA-CF61	GP
IPA-CC27	GP	IPA-CC56	GP
IPA-CC28	GP	IPA-CF62	GP
IPA-CC29	GN	IPA-CF65	GP
IPA-CC30B	GP	IPA-CF66	GP

GP: Gram positivo; GN: Gram negativo.

### 3.4 Avaliação da qualidade da extração do DNA genômico dos isolados bacterianos

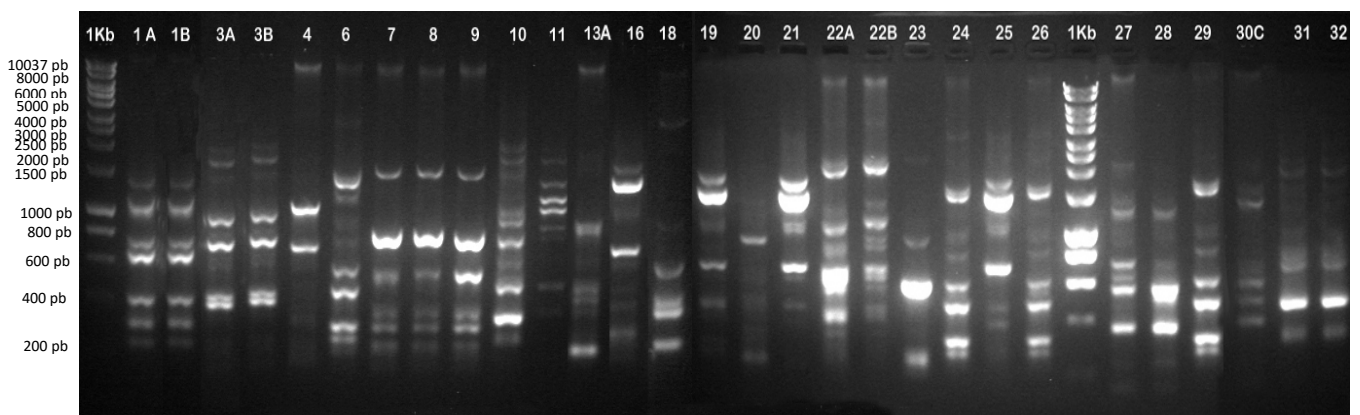
A qualidade da extração do DNA genômico dos isolados foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose. O aparecimento de uma única banda íntegra de alto peso localizada na parte superior do gel e sem rastros indica que o processo de extração do DNA foi realizado corretamente e o mesmo não se encontrava degradado



**Figura 1** – Avaliação da qualidade da extração do DNA total de alguns isolados utilizados no estudo através da eletroforese em gel de agarose a 1,0%, por 30min a 80 v, foi utilizado em cada poço 2,0 $\mu$ L do DNA de cada isolado. Legenda: 1A – IPA-CC1A; 1B – IPA-CC1B; 3A – IPA-CC3A; 3B – IPA-CC3B; 4 – IPA-CC4; 21 – IPA-CF21; 6 – IPA-CC6; 7 – IPA-CC7; 8 – IPA-CC8; 9 – IPA-CC9; 10 – IPA-CC10; 11 – IPA-CC11; 13A – IPA-CF13A; 14 – IPA-CF14; 16 – IPA-CF16; 18 – IPACF18; 19 – IPA – CF19; 20 – IPA-CF20.

### 3.5 Caracterização da diversidade genotípica pela amplificação do elemento BOX

Foi observado que os perfis dos produtos de amplificação do DNA dos isolados em estudo, com o oligonucleotídeo BOX-A1R, apresentou boa eficiência na produção de bandas polimórficas, conseguindo assim diferenciar os isolados em estudo (Figura 2).

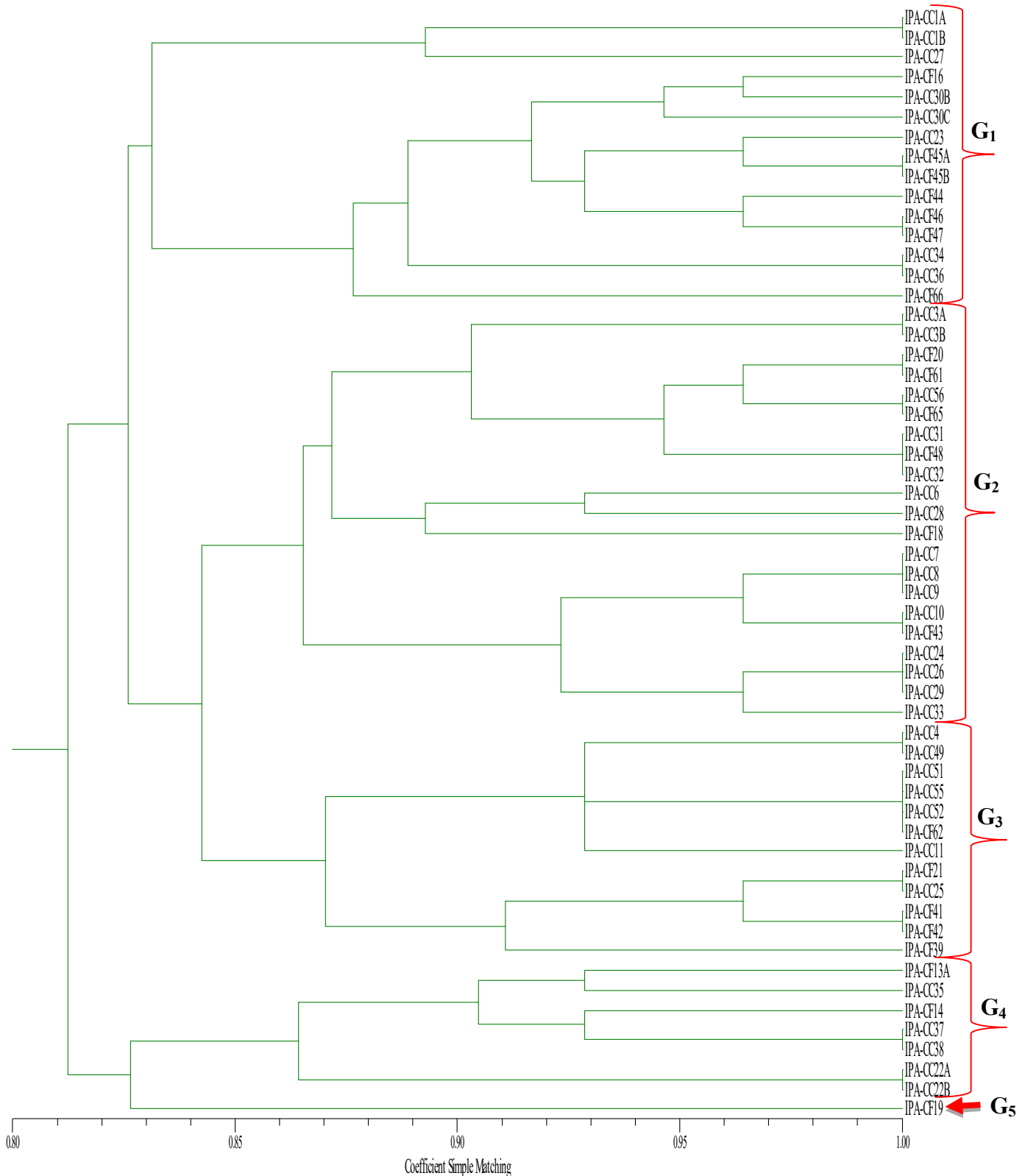


**Figura 2** – Padrão de bandas dos produtos de amplificação do elemento BOX-A1R de alguns isolados de cana-de-açúcar, em gel de agarose 1,2%. Legenda: 1kb – Marcador 1Kb da Bioline; 1A – IPA-CC1A; 1B – IPA-CC1B; 3A – IPA-CC3A; 3B – IPA-CC3B; 4 – IPA-CC4; 21 – IPA-CF21; 6 – IPA-CC6; 7 – IPA-CC7; 8 – IPA-CC8; 9 – IPA-CC9; 10 – IPA-CC10; 11 – IPA-CC11; 13A – IPA-CF13A; 16 – IPA-CF16; 18 – IPACF18; 19 – IPA – CF19; 20 – IPA-CF20; 21 – IPA-CF21; 22A – IPA-CC22A; 22B – IPA-CC22B; 23 – IPA-CC23; 24- IPA-CC24; 25 – IPA-CC25; 26 – IPA-CC26; 27 – IPA-CC27; 28 – IPAC-CC28; 29 – IPA – CC29; 30C – IPA-CC30C; 31 – IPA-CC31 e 32 – IPA-CC32.

Todos os 56 isolados foram submetidos a análise de BOX-PCR, com a finalidade de diferenciá-los pelos padrões de amplicons, sendo considerados para os testes bioquímicos subsequentes e para o sequenciamento do gene 16S rRNA. Considerando-se que cada padrão de bandas representa um isolado, a análise por BOX-PCR mostrou perfis de banda bastante diversificados com pesos moleculares variando de 200 a 4000 pb (Figura 2), em um complexo agrupamento entre os mesmos apontando uma possível diversidade.

Hungria et al.( 2008), em estudo de diversidade genética intra e interespecífica em rizóbios para a produção de inoculante, observaram que ao usar o oligonucleotídeo BOX-PCR mostrou capaz de produzir um maior número de amplicons, além de apresentar um menor custo nas análises quando comparando com os primers REP e ERIC. De acordo com Martins et al. (2015), verificaram que mesmo usando a análise conjunta dos três primers, o ganho de diversidade é muito pouco, em relação ao custo benéfico da técnica.

Comparações visuais dos perfis das bandas resultaram na formação de um dendrograma com 34 padrões de bandas distintos, sugerindo a existência de 34 diferentes isolados bacterianos provenientes do colmo e folha da cana-de-açúcar (Figura 3).



**Figura 3** - Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average) a partir da matriz de similaridade genética usando o oligonucleotídeo BOX-AIR de 56 isolados bacterianos associados a cana-de-açúcar. O coeficiente de Simple Matching foi utilizado para a construção da matriz de similaridade com bootstrap de 1000 repetições.

Pelas análises dos perfis, foi possível observar a formação de dois grupos (1 e 2), sendo o agrupamento 1 com maior número de nodos. O grupo 1, com duas ramas principais (1A e 1B). O agrupamento 1A, contendo o subgrupo G<sub>1</sub> com 15 isolados, o agrupamento 1B com os subgrupos G<sub>2</sub> e G<sub>3</sub> contendo 21 e 13 isolados, respectivamente. O outro grupo em destaque foi o 2, com subagrupamento 2A contendo 7 isolados e subagrupamento 2B com apenas um representante, em ramo monofilético (IPA-CF19).

Os subgrupos G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> apresentam agrupamentos mais complexos, com maiores números de nodos e isolados. O G<sub>1</sub>, com 15 isolados, apresentou similaridade variando de 88% a 100% dentro do grupo. Neste subgrupo, os isolados IPA-CC1A e IPA-CC1B são idênticos, assim como os isolados IPA-CF45A e IPA-CF45B; IPA-CF46 e IPA-CF47; IPA-CC34 e IPA-CC36, os quais apresentaram 100% de similaridade. A maioria dos isolados desse subgrupo apresentaram 96,5% de similaridade entre si. O isolado IPA-CF66 apresentou-se em rama monofilética com similaridade de aproximadamente 88% entre os isolados, indicando um isolado diferente dentro do grupo. Para este subgrupo, aproximadamente 53% dos isolados apresentaram similaridade genética entre si de 100%.

No subgrupo G<sub>2</sub>, do total de 21 isolados, apenas quatro são diferentes. Os isolados IPA-CC3A e IPA-CC3B são idênticos entre si, o mesmo ocorrendo com os isolados IPA-CC31, IPA-CF48 e IPA-CC32; IPA-CF20 e IPA-CF61; IPA-CC56 e IPA-CF65; IPA-CC7, IPA-CC8 e IPA-CC9; IPA-CC10 e IPA-CF43; IPA-CC24, IPA-CC26 e IPA-CC29, os quais apresentaram entre si 100% de similaridade. Este subgrupo, apesar de ter apresentado maior número de isolados que o subgrupo anterior (G<sub>1</sub>), manteve-se também o maior número de isolados semelhantes, aproximadamente 91% dos isolados com similaridade de 100%. Neste grupo, apenas os isolados IPA-CC6, IPA-CC28, IPA-CF18 e IPA-CC33, se mostraram únicos. O isolado IPA-CF18 apresentou uma rama monofilética de 89% de similaridade em relação aos dois isolados: IPA-CC6, IPA-CC28.

O subgrupo G<sub>3</sub> apresentou-se com 13 representantes, sendo os isolados IPA-CC4 e IPA-CC49 idênticos, assim como os isolados IPA-CC51, IPA-CC55, IPA-CF62 e IPA-CC52; IPA-CF21 e IPA-CC25; IPA-CF41 e IPA-CF42 apresentando 100% de similaridade entre si. Os isolados IPA-CC11 e IPA-CF39 foram os únicos representantes desse grupo que se apresentaram diferentes. O isolado IPA-CC11 apresentou aproximadamente 93% de similaridade com os isolados IPA-CC4 e IPA-CC49. O isolado IPA-CF39, em uma rama monofilética, apresentou similaridade de 91% com os isolados IPA-CF21, IPA-CC25, IPA-CF41 e IPA-CF42.

O grupo 2 ramificou-se em 2 subgrupos, o 2A contendo a maioria dos isolados (89%) no subgrupo G4, para este, os isolados IPA-CC37 e IPACC38 apresentaram 100% de similaridade, assim como os isolados IPA-CC22A e IPA-CC22B. Os isolados IPA-CF13A, IPA-CF14 e IPA-CC35 apresentaram entre si, dentro deste subgrupo aproximadamente 93% de similaridade genética.

O subgrupo G5, com o isolado IPA-CF19, apresentou-se em uma rama monofilética externa (outgroup), com aproximadamente 83% de similaridade com o grupo G4, mostrando-se bem diferente dos isolados dos grupos anteriores.

Apesar da alta similaridade encontrada entre os isolados usando o coeficiente de Simple Matching, foi observado que os isolados, de uma forma geral, possuem uma grande diferença genética visto que, mesmo com o corte de 80%, a diversidade foi muito elevada.

Antunes (2010) e Saavedra (2013) estudando a diversidade de bactérias em *Phaseolus lunatus* L. e *Oryza sativa* L. por BOX-PCR, mostraram diferentes perfis de bandas indicando que esta técnica é suficiente para diferenciar filogeneticamente estes micro-organismos.

Esta técnica foi usada como critério para identificar os diferentes perfis dos isolados bacteriano aleatoriamente para serem sequenciados mediante o gene 16S rRNA ribossomal, da mesma forma que foram realizadas as caracterizações fisiológicas e bioquímicas.

### **3.6 Caracterizações fisiológica e bioquímica das bactérias endofíticas selecionadas por BOX-PCR**

A habilidade dos isolados bacterianos endofíticos promoverem crescimento vegetal e potencialmente serem utilizados como produtos biotecnológicos pela produção e liberação de enzimas específicas foi avaliada pelas determinações fisiológicas e bioquímicas descritas na Tabela 5. Os 35 isolados foram selecionados após a caracterização por BOX-PCR e escolhidos ao acaso.

O método para determinação da urease foi utilizado nos isolados endofíticos com a finalidade de determinar a capacidade deles em degradarem a ureia para formas simples de nitrogênio que podem ser facilmente absorvidos pelas plantas, promovendo desta forma seu crescimento. A urease funciona como um catalisador da hidrólise da ureia em amônia e anidrido carbônico (HAROLD, 2002). A positividade do teste foi observada quando o meio se tornou róseo em torno da colônia bacteriana. Essa cor é devido a ureia ter sofrido a ação da

enzima urease liberada pelos isolados, provocando o acúmulo de amônia e gás carbônico no meio de cultura resultando na alcalinização do meio devido a elevação do pH (COGO, 2008).

Observou-se que 26% dos isolados apresentaram capacidade de hidrolisarem a ureia em amônia e anidrido carbônico (TISDALE et al., 1985), indicando assim atividade positiva para urease (Tabela 5). Lin et al. (2013) fizeram uso deste método para estudar a atividade enzimática dos micro-organismos rizosféricos na cultura da cana soca. Resultados semelhantes para atividade urease foram descritos por Tan et al.(2001), que descreveram a ocorrência de uma nova bactéria endofítica na cultura de arroz com capacidade para degradarem a ureia.

Neste estudo, os isolados que conseguiram hidrolisar a ureia pertencem aos gêneros *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus* e *Bacillus*. Kumar et al. (2014), utilizando *Pseudomonas* como biorremediadora de hidrocarbonetos de petróleo, observaram que esse gênero não foi capaz de produzir urease, corroborando os achados nesse estudo, já que os isolados IPA-CC33 e IPA-CF66 pertencem a esse gênero. Este fenômeno de atividade de urease positiva, também tem sido observado em outros estudos sobre os endófitos de arroz (TAN et al., 2001).

Para avaliação da capacidade de produção da enzima protease pela degradação da caseína, foi verificado que 57% dos isolados endofíticos (Tabela 5) apresentaram halo de degradação transparente ao redor da colônia indicando a produção dessa enzima. Os demais isolados, apesar de crescerem no meio de protease, não foram capazes de degradarem a proteína. Essas enzimas são encontradas em vários micro-organismos, em especial em bactérias do gênero *Bacillus*, este tido como uma das maiores fontes de enzima industrial (RAWLINGS & BARRETT, 1993; ABATE et al.,1999; DUBAL et al., 2008; PANT et al.,2015). Devido a impossibilidade das proteases de origem animal e vegetal atenderem a demanda mundial para essas enzimas, a prospecção de novos micro-organismos é de suma importância pois apresentam uma grande variabilidade bioquímica e relativamente de fácil manipulação genética (BEYNOM et al., 1989). Diante disso, os isolados endofíticos que apresentaram reação positiva têm potencial para um possível uso industrial e ecológico em futuros estudos.

Para amilase, 17,14% dos isolados endofíticos foram positivos (IPA-CF20, IPA-CC22A, IPA-CC23, IPA-CC30B, IPA-CF45A e IPA-CF65) (Tabela 5). A produção de amilase pelos micro-organismos auxilia na quebra do amido, que é o principal polissacarídeo de reserva dos vegetais superiores, em moléculas de glicose diretamente utilizáveis nas atividades metabólicas celulares (PASCHOLATI, 1995; LIN et al., 1997). Sodhi et al.(2005),

relatam que algumas bactérias do gênero *Bacillus*, são produtoras de  $\alpha$ -amilases termoestável e que a estirpe de *Bacillus* sp. PS-7 destaca-se na hidrólise do amido. Por serem da família das endoamilases e catalisarem a hidrólise de ligações glicosídicas do amido, glicogênio e outros carboidratos, estas enzimas possuem um papel importante no metabolismo de carboidratos em plantas, animais e outros organismos. As amilases são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento de muitos insetos, especialmente daqueles que vivem em sementes e grãos ricos em amido (GROSSI DE SÁ & CHRISPEELS, 1997). Os isolados positivos para esta determinação podem ser utilizados para a produção de enzimas extracelulares, a partir de diferentes fontes, como o bagaço da cana-de-açúcar (HAKI & RAKSHIT, 2003), assim como no processo de panificação, fermentação, solubilização de goma, indústria têxtil e branqueamento de papel (ANTO et al., 2006; KUROSAWA et al., 2006). Bactérias do gênero *Bacillus*, como *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* e *B. licheniformis* destacam-se na produção de amilases ativadas em altas temperaturas (SAJEDI et al., 2005).

Verificou-se que 68,57% dos isolados bacterianos apresentaram atividade lipásica positiva, observada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia. Resultados semelhantes foram observados por Bueno et al. (2014) onde 97% dos isolados bacterianos isolados de diferentes substratos foram capazes de produzir lipase. As lipases são enzimas utilizadas para fins industriais principalmente na hidrólise de lipídeos (GONÇALVES 2007).

Bueno et al.(2014), verificaram que os isolados dos gêneros *Burkholderia* sp. e *Bacillus* sp. foram bons produtores de lipases. Em nosso estudo, os isolados endofíticos IPA-CC3A, IPA-CC10, IPA-CC27 e IPA-CC49 foram identificados para o gênero *Burkholderia* e IPA-CC1B, IPA-CC11, IPA-CF13A, IPA-CF16, IPA-CF18, IPA-CF20, IPA-CC25, IPA-CC28, IPA-CC29, IPA-CC30B, IPA-CC30C, e IPA-CF42, como *Bacillus* ( Tabela 8), foram bons produtores de lipase, corroborando com Bueno et al.(2014) Outras espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são igualmente mencionadas como produtoras de lipases (CARVALHO et al., 2003; MARTINS, 2007), sendo os isolados IPA-CC33 e IPA-CF66 pertencentes ao gênero *Pseudomonas*.

Em relação à atividade positiva para quitinase, foi verificada em 14% dos isolados (Tabela 5), resultados semelhantes aos encontrados por Del Castillo et al. (2015), no isolamento de bactérias endofíticas em arroz. Quecine et al. (2012), estudando a interação de *Pantoea agglomerans* com cana-de-açúcar, verificaram que esta bactéria promoveu crescimento na cultura pela produção de quitinase e celulase, sugerindo que essas enzimas



desempenham um papel importante na defesa das plantas. Os isolados com essa capacidade de degradarem a quitina formam halo transparente ao redor da colônia.

A produção de sideróforos é outra característica a ser procurada na seleção de BPCP's, pois pode contribuir para a capacidade dos isolados produtores de competir com o meio ambiente, colonizar o hospedeiro e promover crescimento vegetal através da disponibilidade de formas solúveis de ferro (BENEDUZI et al. 2013). Foi observado que 17 % dos isolados endofíticos foram capazes de produzir sideróforos ( Tabela 5). O meio de cultivo utilizado induziu a produção de sideróforos. Deste modo, os sideróforos produzidos pelos isolados endofíticos retêm e complexam o ferro presente na solução corante ferro cromoazurol S (CAS), liberando o corante, o que resulta na mudança da coloração do meio de cultura (ALEXANDER & ZUBERER, 1991) . O ferro é um nutriente essencial para todos os organismos vivos, entretanto, é relativamente insolúvel na solução do solo. Assim, para competirem por esse elemento limitante, os micro-organismos sintetizam e liberam sideróforos, moléculas de baixo peso molecular, que se ligam com alta afinidade ao  $Fe^{3+}$  e adentram na planta, influenciando seu desenvolvimento (SIDDIQUI, 2005). Os isolados endofíticos que apresentaram reação positiva para sideróforos, são importantes no contexto em geral dessas caracterizações, principalmente quando em simbiose com a planta promovendo o seu desenvolvimento, pois atuam na biodisponibilidade do ferro para a planta (CAMPO & HUNGRIA, 2007).

Para o estudo da atividade da enzima (aminociclopropano-1-carboxilato) (ACC deaminase), 71% dos isolados endofíticos foram positivos ( Tabela 5). Relatos semelhantes foram observados por Idris et al. (2004), onde os endofíticos são capazes de usar a enzima ACC deaminase como única fonte de nitrogênio quando comparadas com bactérias localizadas na rizosfera. As bactérias promotoras de crescimento vegetal, que conseguem quebrar o composto aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), é conhecido como precursor imediato do etileno pela atividade da enzima ACC deaminase, reduzindo os níveis de etileno, que em alta concentração é prejudicial às plantas. O etileno é considerado um regulador orgânico que pode atuar no crescimento vegetal em baixas concentrações, tem sua produção aumentada quando a planta sofre algum estresse (CLICK, 2014).

Os isolados que apresentaram atividade positiva para a enzima ACC deaminase, possivelmente poderão ser utilizados para reduzir o estresse induzido pela produção de etileno uma vez que a ACC é precursora desse indutor (SALEEM et al., 2007). Nascimento et al.(2014), relatam que foi encontrada atividade ACC positiva num grande número de bactérias Gram positivas e Gram negativas, resultados coerentes com o que foi encontrado em nosso

estudo. Arshad et al.(2008), ao trabalharem com ervilhas submetidas ao estresse hídrico inoculadas com duas linhagens de *Pseudomonas* spp. produtoras de ACC, observaram que as bactérias atuaram de forma satisfatória reduzindo significativamente os efeitos deletérios causados pelo estresse em relação a produtividade e crescimento da cultura. Singh et al. (2015), mensuraram a ação da ACC em *Pseudomonas* sp. estirpe ACP e *P.putida* estirpe GR122, verificaram que tiveram ação comprovada da ACC.

Em relação à produção de N-acil-homoserina lactona (AHL), observou-se que 54% dos isolados endofíticos foram considerados positivos para a produção do auto-indutor (Tabela 5). A positividade do teste foi comprovada pela formação de um halo verde azulado em torno da colônia bacteriana.

Muitas espécies de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa controlam sua densidade populacional através de sinalização de comunicação intercelular, mediados por sinais moleculares sintetizados pelas células individuais, em que a expressão de genes alvo é induzida quando a densidade celular atinge seu limite, processo esse denominado *Quorum Sensing* (QS) (FUQUA et al., 1994; CHA et al., 1998). O Sistema QS é tido como um comportamento multicelular em procariontes realizada por alguns genes que regulam a ação de diversos processos fisiológicos e bioquímicos, incluindo a síntese de antibióticos, transferência de plasmídeo por conjugação, produção de fatores de virulência em patógenos de animais e vegetais (HARDMAN et al., 1998). O mais bem caracterizado sistema de QS é impulsionado pelas moléculas de homoserina lactona acilada (AHL)(CASE et al., 2008). A expressão desse gene é coordenada e mediada pela detecção, produção e liberação de pequenas moléculas de sinais denominadas auto-indutores, sendo a N-acil-homoserina lactona (AHL) mais conhecida entre as proteobactérias (MILLER & BASSLER, 2001).

Na literatura, alguns trabalhos descrevem a eficiência e a produção dessas moléculas por alguns gêneros de bactérias como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoe*, *Burkholderia* e *Rhizobium* fornecendo tolerância contra vários estresses abióticos, nas culturas do trigo, milho, uva e feijão (EGAMBERDIYEVA & HÖFLICH 2003; BARKA et al., 2006; ARSHAD et al., 2008; MARULANDA et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2010; PÉREZ-MONTAÑO et al., 2014).

Para a degradação da catalase (Tabela 5), foi observado que mais de 50% dos isolados apresentaram formação de bolhas de gás imediatamente após a adição de peróxido de hidrogênio, indicando atividade catalase positiva. Resultados semelhantes foram encontrados por Mbai et al.(2013) estudando bactérias endofíticas isoladas de arroz, com todos os isolados estudados apresentando característica de catalase positiva. Esta é uma característica

importante a ser buscada em um isolado, pois as bactérias que tem essa habilidade evitam a toxicidade celular, podendo ser usadas no combate ao estresse oxidativo (MBAI, et al. 2013).

A catalase é uma enzima que faz parte do sistema antioxidante, sistema esse considerado como um dos melhores indicadores que conferem tolerância ao estresse nas plantas (CERVILLA et al., 2012).

Rezende et al.(2009) relatam que o uso do método para determinação de catalase positiva é um dos critérios e requisitos para a correta identificação de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Em nosso estudo, os isolados IPA-CC33 e IPA-CF66 foram classificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e apresentaram atividade da catalase positiva. Algumas bactérias que contém flavoproteínas reduzem o oxigênio a peróxido de hidrogênio e superóxido, considerados extremamente tóxicos para muitos componentes celulares, levando a sua destruição rapidamente. (CAPPUCCINO & SHERMAN, 2002). Sendo assim, os isolados que apresentaram atividade catalase positiva neste estudo, possuem a capacidade de proteção desse efeito deletério (tóxico). A presença dessa enzima nos isolados bacterianos, permite a oxidação de espécies reativas ao oxigênio convertendo o composto tóxico, peróxido, em água favorecendo assim o sistema de defesa bacteriano e, podendo ser considerado assim, um mecanismo de proteção (BERGER et al., 2011).

**Tabela 5** - Produção de urease (URE); protease (PRO); amilase (AMI); lipase (LIP); quitinase (QUI); solubilização de fosfato (NBRIP); sideróforo (SID); ACC deaminase (ACC); N-acil-homoserina lactona (AHL); catalase (CAT) e gelatinase (GEL) de isolados bacterianos de cana-de-açúcar.

ISOLADO	DETERMINAÇÕES FISIOLÓGICAS E/OU BIOQUÍMICAS										
	URE	PRO	AMI	LIP	QUI	NBRIP	SID	ACC	AHL	CAT	GEL
IPA-CC1B	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
IPA-CC3A	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
IPA-CC6	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+
IPA-CC8	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
IPA-CC9	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
IPA-CC10	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
IPA-CC11	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
IPA-CF13A	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+
IPA-CF14	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
IPA-CF16	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-
IPA-CF18	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
IPA-CF19	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
IPA-CF20	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
IPA-CC22A	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
IPA-CC23	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-
IPA-CC25	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
IPA-CC27	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
IPA-CC28	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
IPA-CC29	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
IPA-CC30B	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-
IPA-CC30C	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
IPA-CC33	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
IPA-CC35	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
IPA-CC36	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IPA-CC37	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
IPA-CF39	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
IPA-CF42	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-
IPA-CF44	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
IPA-CF45A	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-
IPA-CF47	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
IPA-CF48	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
IPA-CC49	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
IPA-CF62	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
IPA-CF65	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
IPA-CF66	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-

Os campos com o sinal (+) indicam reação positiva e os campos com sinal (-) indicam reação negativa.

<sup>1</sup> Soma total dos testes bioquímicos positivo para cada isolado.

### 3.7 Avaliação da capacidade de solubilização do fosfato

Dos 35 isolados endofíticos estudados, 23 (66%) apresentaram capacidade de solubilizar fosfato em meio de cultura sólido acrescido de fosfato de cálcio (Tabela 6). A reação positiva pode ser observada pela formação do halo transparente em volta da colônia. Os isolados IPA-CC3, IPA-CC6, IPA-CC10, IPA-CC11, IPA-CC22, IPA-CC25, IPA-CC36, IPA-CC37, IPA-CF39, IPA-CC49, IPA-CF62 não apresentaram capacidade de solubilização aparente até o 18º dia de avaliação. Destes, 82% foram isolados da folha de cana-de-açúcar.

Avaliando-se o índice de solubilização (IS) dos isolados, apenas o IPA-CC1B, apresentou IS médio após o 18º dia de avaliação, com um valor médio de 2,23 mostrando-se significativamente superior ( $p < 0,05$ ), seguidos dos isolados IPA-CF14 e IPA-CC30C respectivamente (Tabela 6). Foi observado que aproximadamente 96% dos isolados foram classificados com baixo IS, variando de 1,11 (IPA-CF65 – *Pseudomonas* sp.) a 1,70 (IPA-CF14 – *Paenibacillus* sp.) (Tabela 8). Resultados semelhantes foram encontrados por Santos et al. (2012), onde trabalhando com bactérias endofíticas isolados de raízes de cana-de-açúcar, observaram variações nos índices de solubilização entre 1,00 e 2,33, em destaque aos isolados bacterianos rizosféricos que apresentaram maiores índices de solubilização em relação aos endofíticos. Desta maneira, foi possível inferir que a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico pelos micro-organismos solubilizadores diferiu entre os isolados endofíticos.

O isolados IPA-CC1B e IPA-CC30C, foram identificados como *Bacillus* sp. e *Bacillus subtilis* respectivamente (Tabela 8). Rodríguez e Fraga (1999), estudando bactérias solubilizadoras de fosfato e seu papel na promoção de crescimento em diversas culturas citam esses gêneros bacterianos com habilidade para solubilizar fosfato de compostos inorgânicos.

A solubilização de fosfato por espécies de *Bacillus* também foi constatada por Çakmakçı et al. (2010), em estudo sobre a diversidade e potencial metabólico de *Bacillus*, constataram que a solubilização foi positiva para várias espécies, como: *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. atrophaeus*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, assim como *Brevibacillus reuszeri* e *Paenibacillus* spp., a grande maioria comum a esse estudo (Tabela 8). Halder et al. (1990); Rodriguez & Fraga (1999) relatam em seus estudos que o principal mecanismo da ação de solubilização exercido por esses micro-organismos é a ação de síntese de ácidos orgânicos, principalmente o glucômico. Todos os isolados foram classificados como tardios para o tempo de solubilização, solubilizando o fosfato à partir do 6º dia após inoculação (Tabela 7). Inui (2009), ao trabalhar com bactérias solubilizadoras de fosfato em solo com cana-de-açúcar, encontraram maior frequência de isolados bacterianos de médio índice de

solubilização, resultados contrários aos encontrados neste trabalho. Diferindo também dos índices de solubilização encontrados por Silva Filho & Vidor (2000) e Massensini (2007) que obtiveram diâmetro dos halos diversificando de 2 a 7 mm para *Pseudomonas* e de 2 a 5 mm para *Bacillus*.

**Tabela 6** – Índice e tempo de solubilização de fosfato para os isolados endofíticos de cana-de-açúcar.

Isolado	Início da Solubilização (dias)	Índice de Solubilização		Tempo Solubilização
		Inicial	Final <sup>(1)</sup>	
IPA-CC1B	9	1,48	2,23a	Tardio
IPA-CC8	9	0,90	1,26f	Tardio
IPA-CC9	15	1,19	1,19 f	Tardio
IPA-CF13A	6	1,22	1,43d	Tardio
IPA-CF14	6	1,20	1,70 b	Tardio
IPA-CF16	6	0,80	1,24 e	Tardio
IPA-CF19	11	1,00	1,20 f	Tardio
IPA-CF20	6	1,20	1,33 e	Tardio
IPA-CC23	7	1,32	1,53 c	Tardio
IPA-CC27	7	1,14	1,33 e	Tardio
IPA-CC28	12	1,15	1,17 f	Tardio
IPA-CC29	9	1,13	1,30 e	Tardio
IPA-CC30B	7	1,30	1,53 c	Tardio
IPA-CC30C	7	1,36	1,63 b	Tardio
IPA-CC33	9	1,10	1,47 d	Tardio
IPA-CC35	9	0,85	1,33 e	Tardio
IPA-CF42	6	0,95	1,47 d	Tardio
IPA-CF44	7	0,90	1,24 f	Tardio
IPA-CF45A	7	1,13	1,32 e	Tardio
IPA-CF47	12	1,17	1,58 c	Tardio
IPA-CF48	15	1,21	1,18 f	Tardio
IPA-CF65	12	1,11	1,13 f	Tardio
IPA-CF66	6	1,32	1,33 e	Tardio

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ), nédias de três repetições, CV = 4,51%.

Para o local de isolamento das bactérias, o colmo e folha apresentaram números iguais de isolados capazes de solubilizar fosfato (Tabela 7). Estes resultados mostram que a cana-de-açúcar pode ter forte interação com bactérias diazotróficas capazes de solubilizar fosfato, já que os dois nichos estudados apresentaram uma porcentagem de isolados solubilizadores de fosfato semelhantes. A proporção de bactérias solubilizadoras de fosfato para a variedade de cana-de-açúcar estudada foi semelhante aos estudos realizados por Lira-Cadete et al. (2012), na prospecção de bactérias que solubilizam fosfato inorgânico em cana-

de-açúcar. Silva Filho et al. (2002) relatam que os melhores isolados bacterianos a serem utilizados na preparação de inoculantes microbianos devem apresentar características benéficas essenciais a planta, como a FBN e altas taxas de solubilização de fosfato, pois quanto maior a capacidade de solubilização dos isolados utilizados como inoculante, maior será a quantidade de nutrientes disponibilizado para a cultura. Peix et al. (2001) reportam que bactérias envolvidas na solubilização de fosfato aumentam o crescimento vegetal pelo aumento da eficiência da fixação biológica do nitrogênio.

Os isolados, IPA-CC1B , IPA-CF14 e IPA-CC30C apresentaram maior habilidade em solubilizar o fosfato em relação aos demais. De acordo com Sobral (2003), essa habilidade das bactérias endofíticas desperta grande interesse em microbiologistas agrícolas, ganhando grande importância durante o processo de colonização, pois podem inicialmente colonizar superficialmente o hospedeiro e, conseqüentemente, fornecer o nutriente fósforo para o desenvolvimento das plantas. Resultados semelhantes foram relatados por Santos et al.(2012), que encontraram que 90% dos isolados bacterianos associados a raiz de cana-de-açúcar apresentaram habilidade para solubilizar fosfato.

A inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato ou o manejo da população destes micro-organismos em culturas agronomicamente importantes, como a cana-de-açúcar, podem proporcionar grandes benefícios ao desenvolvimento das plantas, melhorando o suprimento de fósforo (SOUCHIE et al., 2005). Richardson (2001) descreve em seus estudos o papel que esses micro-organismos podem desempenhar na disponibilidade de fósforo às plantas.

Dessa maneira é primordial a busca por micro-organismos com essa habilidade de solubilização de fosfato como alternativa econômica e ambiental em substituição aos fertilizantes químicos (KHAN et al., 2007; MEHRVARZ et al., 2008).

### **3.8 Avaliação da produção de ácido-indol-3-acético (AIA) e atividade de redução do acetino (ARA)**

A variação na produção dos compostos indólicos, observadas entre os isolados bacterianos, indica uma eficiência variável entre os representantes, quando em associação com plantas de cana-de-açúcar.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que os isolados provenientes tanto do colmo quanto da folha foram capazes de produzirem AIA e que a produção deste

fitohormônio não foi dependente da parte da planta de onde as bactérias foram isoladas (Tabela 8).

Os isolados endofíticos apresentaram capacidades variáveis de produzir compostos indólicos. Os valores para produção de AIA pelos isolados endofíticos variaram de 0,01 a 30,77 mg de AIA.L<sup>-1</sup> (Tabela 7). Os isolados IPA-CC36 (*Bacillus pumilus*), IPA-CC3A (*Burkholderia gladioli*), IPA-CF48 (*Brevibacillus agri*) e IPA-CC22A (*Paenibacillus* sp.) apresentaram os maiores valores de AIA, respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Ikeda (2014) em bactérias isoladas do milho, em que o isolado do gênero *Bacillus* apresentou a maior produção de AIA, assim como os resultados descritos por Luvizotto (2008), que verificou que todos os isolados de *Burkholderia* associados às raízes da cana-de-açúcar produziram esse fitormônio.

No presente trabalho, foi possível observar diferentes valores de AIA para bactérias pertencentes ao mesmo gênero (Tabelas 7 e 8), produzindo diferentes proporções de AIA no meio líquido enriquecido em L-triptofano. Isso pode ser devido a síntese de AIA sofrer influência das condições da cultura, do estágio de crescimento e disponibilidade do substrato (MIRZA et al., 2001).

As auxinas sintetizadas pelas bactérias afetam o sistema radicular, aumentando o tamanho, o número de ramificações de raízes adventícias e a área de contato com o solo, possibilitando que uma maior área seja explorada pela superfície radicular, disponibilizando assim grandes quantidades de nutrientes à planta (LAMBRECH et al., 2000; ARRUDA et al., 2013). Essa, por sua vez, beneficia as bactérias através de elevados níveis de exsudatos radiculares (VESSEY, 2003; DOBBELAERE et al., 2003; BASHAN, 2004). Khan et al.(2016), verificaram que a aplicação de *Bacillus pumilus*, na cultura do arroz proporcionou uma maior eficiência das plantas para tolerarem o estresse salino, com maior produção de biomassa que o tratamento não inoculado. Fato esse atribuído possivelmente a produção de antioxidante pela bactéria. Vários relatos descrevem o papel de *Bacillus pumilus* como promotor de crescimento vegetal, através da produção de oxidantes e promoção do crescimento de plantas com vários níveis de estresse (JHA & SUBRAMANIAN, 2013; KANG, et al. 2014 e YOUNESI & MORADI, 2014).

As menores concentrações de AIA foram observadas nos isolados IPA-CC35 (*Bacillus* sp.), IPA-CF66 (*Pseudomonas* sp.) e IPA-CF19 (*Methylobacterium organophilum*.) que produziram 0,01; 0,09 e 0,16 mg de AIA.L<sup>-1</sup> respectivamente.



**Tabela 7** - Análises quantitativas da produção de ácido-indol-3-acético (AIA) e atividade da nitrogenase pela redução do acetino (ARA) de bactérias diazotróficas endofíticas de cana-de-açúcar (continua)

Isolado	AIA (mg de AIA.L <sup>-1</sup> )	ARA (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> . h <sup>-1</sup> )
IPA-CC1B	0,72 <sup>(1)</sup> ±0,015 l	4,72 <sup>(1)</sup> ±0,106 h
IPA-CC3A	16,33±0,061 b	5,39± 0,162 f
IPA-CC6	2,12±0,017 i	7,41±0,175 b
IPA-CC8	0,22 ±0,015 o	7,05 ±0,020 c
IPA-CC9	0,17±0,017 o	7,62±0,145 a
IPA-CC10	3,93±0,020 e	5,16±0,153 g
IPA-CC11	1,41±0,012 j	5,38±0,023 f
IPA-CF13A	2,50±0,145 g	4,15±0,129 j
IPA-CF14	0,55±0,018 m	4,14±0,029 j
IPA-CF16	0,36±0,017 n	4,31±0,392 j
IPA-CF18	2,13±0,057 i	5,57±0,256 f
IPA-CF19	0,16±0,023 o	6,53±0,194 d
IPA-CF20	0,59±0,041 m	6,37±0,204 d
IPA-CC22A	4,42±0,112 d	5,25±0,020 g
IPA-CC23	1,96±0,126 i	7,07±0,308 c
IPA-CC25	0,28±0,012 o	7,02±0,271 c
IPA-CC27	2,36±0,087 h	7,43±0,112 b
IPA-CC28	1,41±0,059 j	6,38±0,164 d
IPA-CC29	1,98±0,118 i	5,03±0,220 g
IPA-CC30B	2,46±0,066 h	6,39±0,257 d
IPA-CC30C	0,71±0,055 l	6,15±0,169 e
IPA-CC33	2,71±0,099 f	7,84±0,232 a
IPA-CC35	0,01±0,007 p	6,48±0,193 d
IPA-CC36	30,77±0,406 a	6,62±0,065 d
IPA-CC37	1,13±0,020 k	7,36±0,295 b
IPA-CF39	4,11±0,048 e	6,03±0,382 e
IPA-CF42	0,45±0,021 n	6,62±0,109 d
IPA-CF44	3,08±0,043 f	7,41±0,216 b
IPA-CF45A	2,08±0,118 i	S/A*
IPA-CF47	2,56±0,084 g	4,47± 0,146 i
IPA-CF48	6,13±0,054 c	5,58±0,062 f
IPA-CC49	1,27±0,091 j	4,47±0,264 i
IPA-CF62	0,40±0,021 n	7,45±0,138 b
IPA-CF65	1,30±0,203 j	7,70±0,155 a
IPA-CF66	0,09±0,015 p	6,55±0,248 d
CV(%)	2,13	2,56

<sup>(1)</sup> Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente, entre si, pelo teste de Scott-Knott (p<0,05). Média de três repetições em delineamento inteiramente casualizado. \*(S/A) sem atividade aparente.

De acordo com Taiz & Zeiger (2004), a produção de concentrações de AIA não muito elevadas é preferível pois, sendo considerado um fitormônio, em concentrações elevadas, pode ter reação negativa sobre o crescimento, podendo atuar como um herbicida, produzindo uma reação contrária ao esperado. Assim, os resultados indicam que parte dos isolados estudados podem ser promissores na promoção de crescimento vegetal.

A produção dessa auxina é variada quanto aos diferentes gêneros bacterianos. Ahmad et al. (2008) em seus estudos para seleção de bactérias rizosféricas produtoras de crescimento vegetal verificaram maior produção de AIA, por bactérias do gênero *Pseudomonas*, seguida de *Bacillus* e *Azotobacter*. Existem relatos também da presença de AIA em *Enterobacter*, *Pantoea* e *Paenibacillus* (SELVAKUMAR et al., 2008; ERTURK et al., 2010; FARINA et al., 2012; MONTAÑEZ et al., 2012), resultados estes de acordo com os encontrados nesse estudo.

A atividade da nitrogenase, responsável pela FBN, foi mensurada indiretamente pela técnica da atividade de redução de acetileno (ARA). Dos 35 isolados endofíticos utilizados para determinação da ARA, 34 formaram película característica em condições microaerófilas, sendo então selecionados para o procedimento.

A ARA dos isolados estudados variou de 4,14 a 7,84 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. h<sup>-1</sup> (Tabela 7). No entanto relata-se que nem sempre as condições *in vitro*, em ambiente controlado, refletem as condições naturais, podendo assim superestimar ou até mesmo subestimar os resultados. A maior produção de ARA foi observada para os isolados IPA-CC33 (*Pseudomonas* sp.), IPAC-CF65 (*Bacillus megaterium*) e IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropedicae*) com 7,84; 7,7 e 7,62 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>.h<sup>-1</sup>, respectivamente e, estatisticamente (p<0,05) superior aos isolados IPA-CF62, IPA-CC27, IPA-CF44, IPA-CC6 e IPA-CC37. Santos et al (2014), relatam que em bactérias diazotróficas endofíticas de sisal, o teste de ARA positivo pode ser um indicativo de um isolado com potencial para fixação de nitrogênio e o sucesso da escolha vai depender da interação micro-organismo/planta e da ação do meio ambiente.

A capacidade de reduzir acetileno em etileno são bastantes variáveis entre isolados de uma mesma espécie. Esse comportamento segue-se também para todos os testes bioquímicos aqui estudados. Fischer et al. (2012), em seus estudos de caracterização de comunidade bacteriana em cana-de-açúcar, indicam que, embora muitas bactérias diazotróficas isoladas a partir da cultura tenham teste de ARA positivo, não se sabe ainda quais fixam nitrogênio ativamente, pois as condições ambientais, níveis de nutrientes no solo e até mesmo a cultivar interferem no processo da FBN.

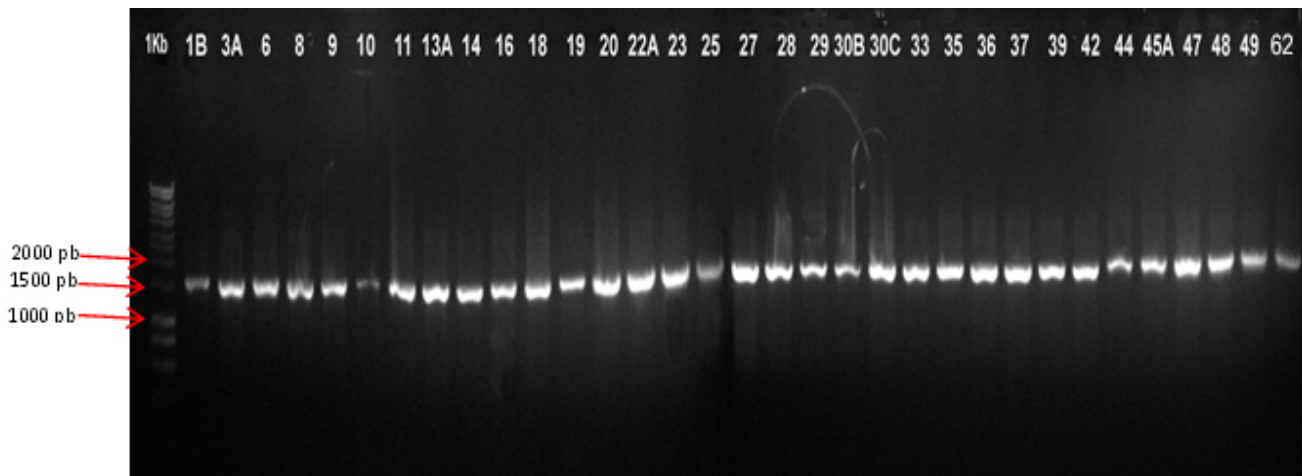
Rodrigues et al. (2006) relataram grande amplitude dos dados na detecção de ARA em bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* isolados de arroz. Pedrinho et al. (2009), verificaram uma grande variação da redução do acetileno de bactérias oriundas do milho, obtendo valores de ARA entre 0,1 a 0,64 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> cultura<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, para bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Sphingomonas* sp. Resultados estes discordantes ao descrito nesse estudo para os gêneros acima citados, onde os valores variaram

para as bactérias do gênero *Pseudomonas* de 6,55 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. h<sup>-1</sup> (IPA-CF66) a 7,84 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. h<sup>-1</sup> (IPA-CC33), para o gênero *Herbaspirillum* foi de 7,05 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. h<sup>-1</sup> (IPA-CC8) a 7,62 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. h<sup>-1</sup> (IPA-CC9) e para *Burkholderia* a variação foi de 4,47 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. h<sup>-1</sup> (IPA-CC49) a 7,43 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>. h<sup>-1</sup> (IPA-CC27) (Tabelas 7 e 8).

### 3.9 Sequenciamento

#### 3.9.1 Amplificação e Sequenciamento do gene 16S rRNA ribossomal

O DNA total dos 36 isolados bacterianos foi utilizado como molde na reação de PCR para amplificação do gene 16S rRNA. Os produtos dessa amplificação geraram fragmentos únicos de aproximadamente 1.500 pb, tamanho este esperado para o gene em questão (Figura 4).



**Figura 4** - Eletroforese em gel de agarose (1,2%) do produto da amplificação do gene 16S Rrna ribossomal de alguns isolados de colmo e folha de cana-de-açúcar . Legenda: 1Kb – Marcador 1Kb (BioLine); 1B – IPA-CC1B; 3A – IPA-CC3A; 6 – IPA-CC6; 8 – IPA-CC8; 9 – IPA-CC9; 10 – IPA-CC10; 11 – IPA-CC11; 13A – IPA-CF13A; 14 – IPA-CF14; 16 – IPA-CF16; 18 – IPACF18; 19 – IPA – CF19; 20 – IPA-CF20; 22A – IPA-CC22A; 23 – IPA-CC23; 25 – IPA-CC25; 27 – IPA-CC27; 28 – IPAC-CC28; 29 – IPA – CC29; 30B – IPA-CC30B ; 30C – IPA-CC30C; 33 – IPA-CC33; 35 – IPA-CC35; 36 – IPA-CC36; 37 – IPA-CC37; 39 – IPA-CF39; 42 – IPA-CF42; 44 – IPA-CF44; 45A – IPA-CF45A; 47 – IPA-CF47; 48 – IPA-CF48; 49 – IPA-CC49 e 62 – IPA-CF62.

#### 3.9.2 Comparação das sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA ribossomal dos isolados sequenciados

A identidade entre as sequências nucleotídicas esta relacionada com uma origem comum de genes, ou seja, as sequências biológicas dos ácidos nucleicos permitem que relações evolutivas, estruturais e funcionais entre as sequências sejam reveladas quando

comparadas fornecendo dados suficientes para inferir que estas sequências sejam homólogas (MAGNANI et al., 2010).

Aproximadamente 77 % dos isolados apresentaram identidade acima de 96 %. Neste estudo foi observada a presença de sete diferentes gêneros de bactérias, distribuídos em quatro grupos, sendo o gênero *Bacillus* o com maior número de representante (46 %), seguido de *Paenibacillus* (20 %), *Burkholderia* (14 %), *Herbaspirillum* (6 %), *Pseudomonas* (6 %), *Methylobacterium* (6 %) e *Brevibacillus* (3 %) (Quadro 1).

Com base nas análises individuais, verificou-se que os isolados apresentaram uma identidade, oscilando entre 82 a 100% com as sequências depositadas no banco de dados GenBank, o tamanho dos pares de bases das sequências variaram de 531 a 1433 pb. O comprimento final das sequências consenso para cada uma das estirpes está descrito na Tabela 8. Os isolados IPA-CF14, IPA-CC23 e IPA-CC35, apresentaram identidade de 84, 88 e 82%, respectivamente com *Paenibacillus* sp, *Paenibacillus* sp e *Bacillus* sp. (Tabela 8).

Os isolados do grupo I foram agrupados na ordem Bacillales da classe Bacilli, dentro do filo Firmicutes, com a presença de duas famílias distintas a Bacillaceae contendo os isolados: IPA-CC1B, IPA-CC11, IPA-CF13A, IPA-CF16, IPA-CF18, IPA-CF20, IPA-CC25, IPA-CC28, IPA-CC29, IPA-CC30B, IPA-CC30C, IPA-CC35, IPA-CC36, IPA-CF42, IPA-CF45A, IPA-CF65 e a Paenibacillaea com os isolados: IPA-CC6, IPA-CF14, IPA-CC22A, IPA-CC23, IPA-CC37, IPA-CF47, IPA-CF48 e IPA-CF62.

O grupo II ficou relacionado com o filo proteobacteria, classe  $\beta$ -proteobacteria e ordem Burkholderiales, que compreende as famílias Burkholderiaceae, com os isolados: IPA-CC3A, IPA-CC10, IPA-CC27, IPA-CF44, IPA-CC23 e IPA-CF49, e Oxalobacteraceae, com os isolados IPA-CC8 e IPA-CC9.

O grupo III compreendeu os isolados IPA-CF19 e IPA-CF39 ficando junto à divisão das proteobacterias, classe  $\alpha$ -proteobacteria, ordem Rhizobiales, família Methylobacteriaceae, gênero *Methylobacterium*. Finalmente, o grupo IV, compreendeu os isolados IPA-CC33 e IPA-CC66, classificados no gênero *Pseudomonas*, da classe  $\gamma$ -proteobacteria, ordem Pseudomonadales, família Pseudomonadaeae.

**Tabela 8** – Identidade dos isolados endofíticos de colmo e folhas de cana-de-açúcar, com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rRNA realizada pelo programa Blast no GenBank.

Isolado	Pares de base	<sup>1</sup> Max score	<sup>2</sup> Query cover	<sup>3</sup> Identidade	<sup>4</sup> E-value	<sup>5</sup> Acesso	Alinhamento mais significativo pelo NCBI, Genbank
IPA-CC1B	1331	2438	100%	99%	0.0	HM045842.1	<i>Bacillus sp.</i>
IPA-CC3A	1401	2569	100%	99%	0.0	HQ023278.1	<i>Burkholderia gladioli</i>
IPA-CC6	1401	2418	100%	98%	0.0	KF479589.1	<i>Paenibacillus sp.</i>
IPA-CC8	1378	2531	100%	99%	0.0	NR_074695.1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>
IPA-CC9	1378	2536	100%	99%	0.0	NR_114142.1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>
IPA-CC10	1433	2418	99%	97%	0.0	AY839565.1	<i>Burkholderia sp.</i>
IPA-CC11	1381	2551	100%	100%	0.0	EU070369.1	<i>Bacillus sp.</i>
IPA-CF13A	1360	2132	99%	95%	0.0	HM045842.1	<i>Bacillus sp.</i>
IPA-CF14	1113	649	97%	84%	0.0	KF479589.1	<i>Paenibacillus sp.</i>
IPA-CF16	1408	2252	99%	96%	0.0	LM655316.1	<i>Bacillus sp.</i>
IPA-CF18	1071	2037	99%	94%	0.0	HM045842.1	<i>Bacillus sp.</i>
IPA-CF19	942	1733	99%	99%	0.0	AB298391.1	<i>Methylobacterium organophilum</i>
IPA-CF20	762	1216	96%	96%	0.0	KC443087.1	<i>Bacillus megaterium</i>
IPA-CC22A	1382	2327	100%	97%	0.0	KF479589.1	<i>Paenibacillus sp.</i>
IPA-CC23	1003	1077	94%	88%	0.0	KF479589.1	<i>Paenibacillus sp.</i>
IPA-CC25	1401	2399	93%	99%	0.0	KC849252.1	<i>Bacillus subtilis</i>
IPA-CC27	1171	1971	99%	97%	0.0	AY873982.1	<i>Burkholderia sp.</i>
IPA-CC28	1377	2407	100%	98%	0.0	AM110940.1	<i>Bacillus subtilis</i>
IPA-CC29	1395	2178	100%	98%	0.0	KC849251.1	<i>Bacillus subtilis</i>
IPA-CC30B	1399	2584	100%	100%	0.0	KR259220.1	<i>Bacillus megaterium</i>
IPA-CC30C	1364	2388	99%	98%	0.0	AM110938.1	<i>Bacillus subtilis</i>
IPA-CC33	1373	2518	100%	99%	0.0	FJ588230.1	<i>Pseudomonas sp.</i>
IPA-CC35	1050	889	100%	82%	0.0	FM877978.1	<i>Bacillus sp.</i>
IPA-CC36	1332	2449	100%	99%	0.0	JQ821376.1	<i>Bacillus pumilus</i>
IPA-CC37	659	1092	100%	97%	0.0	KF479589.1	<i>Paenibacillus sp.</i>
IPA-CF39	599	985	96%	97%	0.0	JQ659427.1	<i>Methylobacterium sp.</i>
IPA-CF42	1390	2302	100%	96%	0.0	KF818634.1	<i>Bacillus methylophilus</i>
IPA-CF44	589	1024	100%	98%	0.0	DQ813326.1	<i>Burkholderia sp.</i>
IPA-CF45A	1257	2313	100%	99%	0.0	KR259244.1	<i>Bacillus megaterium</i>
IPA-CF47	1395	2429	99%	98%	0.0	AM162328.1	<i>Paenibacillus sp.</i>
IPA-CF48	531	874	98%	97%	0.0	KM403209.1	<i>Brevibacillus agri</i>
IPA-CC49	1378	2492	100%	99%	0.0	KJ200405.1	<i>Burkholderia sp.</i>
IPA-CF62	1392	2390	99%	98%	0.0	KF479589.1	<i>Paenibacillus sp.</i>
IPA-CF65	1385	2558	100%	100%	0.0	LC005453.1	<i>Bacillus megaterium</i>
IPA-CF66	880	1531	99%	98%	0.0	JX867250.1	<i>Pseudomonas sp.</i>

<sup>1</sup> Nota atribuída pelo algoritmo e baseado no número de pareamento perfeitos (*match*) e imperfeitos (*mismatch*) entre a sequência de entrada e alguma sequência do banco de dados. O seu valor alto dá uma indicação da qualidade do alinhamento; <sup>2</sup> Percentagem da sequência de entrada que alinhou com as sequências do banco de dados; <sup>3</sup> Número de pares de bases porcentagem de identidade entre a sequência do isolado de cana e o organismo relacionado; <sup>4</sup> Probabilidade do alinhamento ser real ou obtido meramente ao acaso entre as sequências de entradas e a do banco de dados. Quanto mais próximo de zero, mais significativo é o alinhamento; <sup>5</sup> Número de acesso da sequência do organismo relacionado.

**Quadro 1** – Posição taxonômica das bacterias isoladas de colmo e folha de cana-de-açúcar.

<b>Grupo I</b>		Dominio: Bactéria Filo: Firmicutes <b>Classe: Bacilli</b> Ordem: Bacillales	
Familia: Bacillaceae Gênero: <i>Bacillus</i>		Familia: Paenibacillaea Gênero: <i>Paenibacillus</i> Gênero: <i>Brevibacillus</i>	
Isolados: IPA-CC1B, IPA-CC11, IPA-CF13A, IPA-CF16, IPA-CF18, IPA-CF20, IPA-CC25, IPA-CC28, IPA-CC29, IPA-CC30B, IPA-CC30C, IPA-CC35, IPA-CC36, IPA-CF42, IPA-CF45A e IPA-CF65		Isolados: IPA-CC6, IPA-CF14, IPA-CC22A, IPA-CC23, IPA-CC37, IPA-CF47 e IPA-CF62  IPA-CF48	
<b>Grupo II</b>		Filo: Proteobacteria <b>Classe: <math>\beta</math>-proteobacteria</b> Ordem: Burkholderiales	
Familia: Burkholderiaceae Gênero: <i>Burkholderia</i>		Familia: Oxalobacteraceae Gênero: <i>Herbaspirillum</i>	
Isolados: IPA-CC3A, IPA-CC10, IPA-CC27, IPA-CF44, e IPA-CF49		Isolados: IPA-CC8 e IPA-CC9	
<b>Grupo III</b>		<b>Classe: <math>\alpha</math>-proteobacteria</b> Ordem: Rhizobiales Familia: Methylobacteriaceae Gênero: <i>Methylobacterium</i>	
		Isolados: IPA-CF19 e IPA-CF39	
		<b>Classe: <math>\gamma</math>-proteobacteria</b> Ordem: Pseudomonadales Familia: Pseudomonadaceae Gênero: <i>Pseudomonas</i>	
		Isolados: IPAC-CC33 e IPA-CF66	

### 3.9.3 Análise filogenética com base no marcador 16S rRNA ribossomal

Após obtenção das sequências parciais do gene 16S rRNA ribossomal, as mesmas foram tratadas e alinhadas entre si e em conjunto com algumas espécie-tipo do banco de dados do NCBI. O alinhamento foi utilizado para melhor visualização do grau de parentesco entre os isolados. De posse dos alinhamentos das sequências, foi construída uma árvore filogenética (Figura 5).

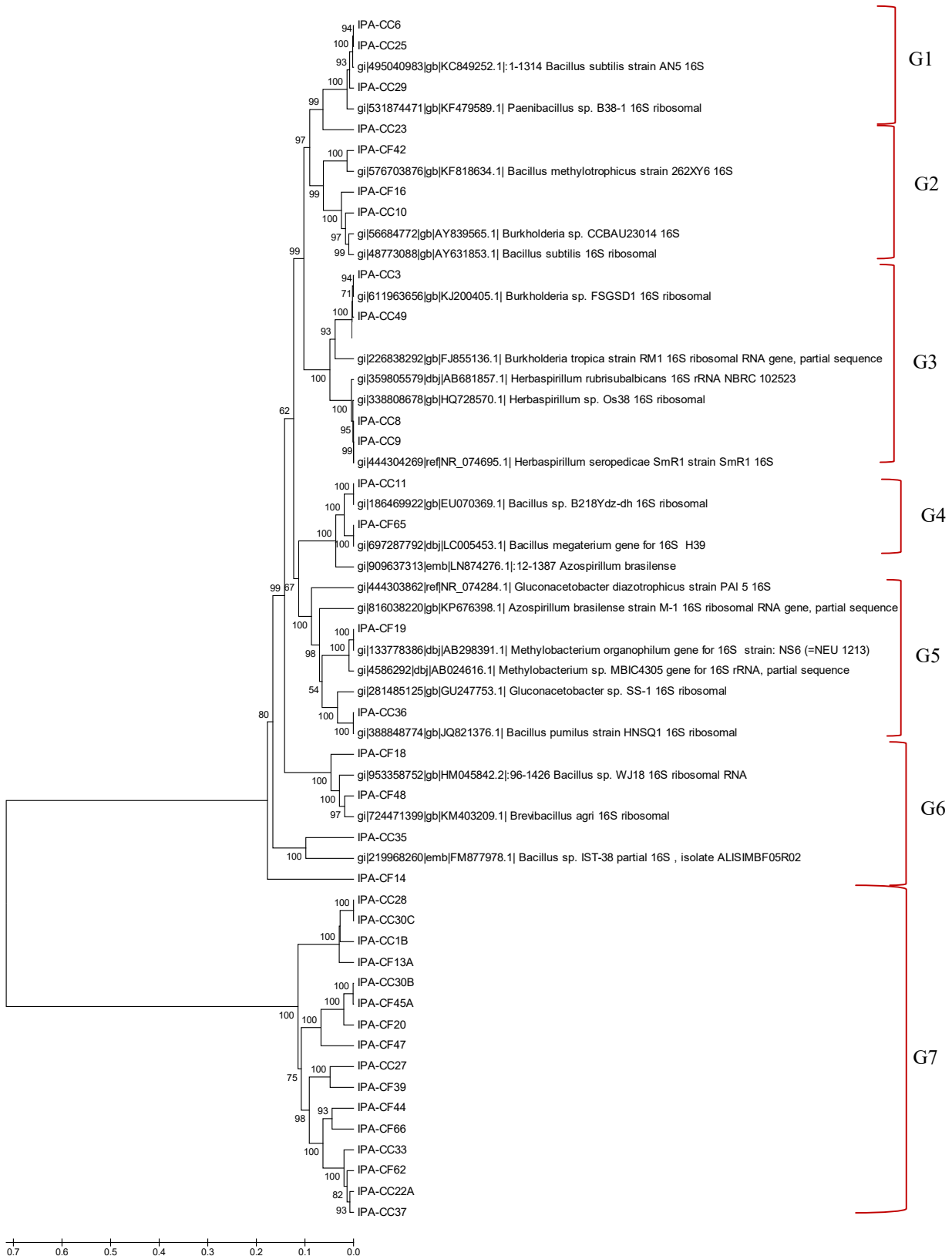
Foi possível observar a formação de sete grupos, sendo o grupo 1 com quatro isolados pertencentes a ordem Bacillales: os isolados IPA-CC6 e IPA-CC25 apresentaram identidade genética de 99 % com *Bacillus subtilis* strain AN5 e 98 % com *Paenibacillus* sp. B38-1, o isolado e IPA-CC29 apresentou identidade de 98 % com *B.subtillis*, em um ramo mais externo a esse grupo, o isolado IPA-CC23 apresentou identidade máxima de 88 % com *Paenibacillus* sp.

O grupo 2, formou-se com três isolados pertencentes a ordem Bacillales e Burhholderiales. O isolado IPA-CF42 com identidade genética de 96% com *B. methylotrophicus* strain 262XY6, o isolado IPA-CF16 apresentou 96% de identidade com *B.subtillis* e o isolado IPA-CC10 mostrou 96% identidade com *Burkholderia* sp. CCBAU23014.

O grupo 3 foi formado exclusivamente por isolados pertencentes a classe  $\beta$ -proteobacteira da ordem Burkholderiales com quatro isolados. Os isolados IPA-CC3A e IPA-CC49 mostraram identidades de 98 e 99% com *Burkholderia* sp FSGSD1, respectivamente. Os isolados IPA-CC8 e IPA-CC9 apresentaram identidade de 99% com *Herbaspirillum seropecicae* strain SmR1.

O grupo 4, com dois representantes da ordem Bacillales, foi formado pelos isolados IPA-CC11, com identidade de 100% com *Bacillus* sp. B218Y-dh, e IPA-CF65, com 99 % de identidade com *Bacillus megaterium* DSM319.

O grupo 5, formou um grupo com apenas dois isolados, o IPA-CF19 pertencente a família Methylobacteriaceae com 99% de identidade com *Methylobacterium organophilum* strain NS6 e o IPA-CC36 com identidade de 99% com *Bacillus pumilus* stain HNSQ1.



**Figura 5.** Árvore filogenética construída a partir de seqüências do gene 16S rRNA ribossomal de isolados de cana-de-açúcar, em relação às seqüências já depositadas em banco de dados, utilizando-se o método de Neighbor-Joining, com distâncias calculadas pelo método de Jukes-Cantor. Os valores de cada rama representam as porcentagens de 1000 réplicas bootstrap. Ramas com valores de bootstrap abaixo de 55% são como não resolvidas.



O grupo 6 foi composto por quatro isolados pertencentes à ordem Bacillales: IPA-CF18, com identidade máxima de 92 % com *Bacillus* sp.; IPA-CF48, com 97 % de identidade com *Brevibacillus agri*; IPA-CC35, com 82 % de identidade com *Bacillus* sp.; e IPA-CF14, que apresentou-se em uma rama mais externa com ligação ao grupo 5, com 84 % de identidade com *Paenibacillus* sp. B381.

Os 16 isolados do grupo 7 formaram um agrupamento separado e bem distinto, sem agrupar-se com nenhuma das estirpes tipo mais representativas de cada espécie encontrada no banco de dados de GenBank. Porém, quando blastadas isoladamente com o banco de dados, mostraram identidade com algum gênero bacteriano, conforme Tabela 8. Este resultado é bastante interessante, uma vez que pouco se conhece sobre os endofíticos de cana-de-açúcar, e este grupo pode ser considerado como novos gêneros ou novas espécies bacterianas ainda não estudadas. Estudos de hibridização DNA-DNA ou o uso de outros iniciadores mais específicos e mais conservados podem ser primordiais na identificação e classificação taxonômica destes indivíduos.

Como já descrito anteriormente, o gênero *Bacillus* foi identificado com maior número de isolados (Tabela 8). De acordo com Seldin et al. (1998), seus representantes são facilmente isolados em maior quantidade de solos rizosféricos em várias espécies de plantas. Tem uma grande importância ecológica e na diversidade genética ambiental (GARDENER, 2004). Segundo, Xie et al. (1998), o gênero *Bacillus* apresenta atividade da nitrogenase para as espécies *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, corroborando os resultados do presente estudo. Vários pesquisadores já descreveram que muitas espécies de *Bacillus* podem contribuir significativamente para a melhoria da planta, de várias formas e principalmente, como agente de controle biológico fitopatogênico (BACON et al., 2001; LACEY et al., 2001; DAVOLOS et al., 2015), e produção de  $\alpha$ -amilase (SODHI et al., 2005; DILLIRAN et al., 2006). A espécie *B. megaterium*, quando inoculada na cultura do arroz, promoveu maior crescimento, maior absorção de Mn e ganhos na eficiência fotossintética pela produção de AIA e sideróforos positivo (ZHANG, 2015).

De acordo com Kokalis-Burelle et al. (2006), as linhagens de *B. subtilis* são as BPCP's mais utilizadas, devido a suas diversas características de promoção de crescimento, entre elas, a produção de antibióticos e redução de doenças quando aplicadas no tratamento de sementes.

*Paenibacillus* sp. LLZ1 foi descrito como capaz de hidrolisar a celulose de forma eficiente e economicamente viável, com atividade ótima a 40 °C e pH 6, levando a uma significativa economia energética (HU et al., 2016). Daane et al. (2002), descreveram que as

espécies de *Paenibacillus* têm sido isolados de diversos locais, como solo, água, rizosfera da planta, materiais vegetais, alimentos, forragens larvas de inseto.

As bactérias do gênero *Burkholderia* spp. colonizam diferentes nichos ecológicos, entre eles, o solo (COSTA et al., 2014), estão comumente presentes na rizosfera de espécies de gramíneas, tais como o trigo (BALANDREAU et al., 2001; PARKE & GURIANO-SHERMAN, 2001) e milho (BEVIVINO et al., 1998; ARRUDA et al., 2013). Elas também podem ser encontradas como endofíticas de videira (COMPANT et al., 2005), cana-de-açúcar (BODDEY, 2002; MENDES et al., 2007) e como simbioses de leguminosas (HOWIESON et al., 2013). Meyer et al. (1995) e Barelmann et al. (1996) descrevem pelo menos quatro tipos de sideróforos produzido pelo complexo *Burkholderia cepacia*, que podem atuar no crescimento vegetal através do controle dos baixos níveis de etileno na planta por meio da ação da ACC deaminase (GLICK et al., 1998).

Assim, como os *Bacillus* e *Paenibacillus* spp., as *Burkholderia* têm efeitos benéficos na promoção do crescimento de planta, no controle biológico de doenças do solo, na fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, e na produção de AIA e ACC deaminase (SHAHAROONA et al., 2007; HAGGAG & TIMMUSK, 2008; KUMAR et al., 2012; CHEN et al., 2013; BACHA et al., 2016) e indiretamente, pela produção de compostos antagônicos como enzimas hidrolíticas, sideróforos e vários antibióticos (GOVINDASAMY et al., 2011; SUÁREZ-MORENO et al., 2012; COSTA et al., 2014).

As bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum* tem mais de 10 espécies descritas, sendo *H. seropedicae* a primeira descrita por Baldani et al. (1986), encontradas em diversos representantes das Poaceae, em especial em cana-de-açúcar, arroz, milho e sorgo (BALDANI et al. 1996). Souza (2011), mostrou que a bactéria *H. seropedicae* estirpe SmR1 tem ação de controle biológico contra a bactéria causadora do raquitismo na cana-de-açúcar (*Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*) baseando-se em evidências indiretas, como aumento da massa dos colmos e com tendência a maiores rendimentos de produção. Usando essa mesma estirpe, Neiverth et al. (2014) verificaram maiores ganhos na produtividade de trigo (*Triticum aestivum*) em relação ao tratamento sem adubo nitrogenado. Olivares et al. (2000) comprovaram efeitos de *Herbaspirillum* na promoção de crescimento em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, promovendo ganho de biomassa radicular em até 350 %. Canuto et al. (2003), avaliaram a contribuição da FBN por várias estirpes de *H. seropedicae* em plantas de cana-de-açúcar inoculadas nos toletes, comprovando ganhos em relação aos tratamentos não inoculados.

O gênero *Methylobacterium* é amplamente encontrado em diferentes espécies de plantas como endofítica de arroz (MADHAIYAN et al., 2009), amendoim (POONGUZHALI et al., 2008), girassol, milho e soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; RAJA et al., 2008). Em sementes de cana-de-açúcar promoveu ganho na germinação de quase 20 % (MADHAIYAN et al., 2006). Esse gênero pode beneficiar as plantas de várias maneiras, na filosfera, ele age sinergicamente usando o metanol das folhas como única fonte de carbono e energia e em contrapartida produz fitormônios para a planta. Além disso, promove melhoria na germinação e aumento do crescimento das plantas pela produção de auxinas e citocininas.

Outros mecanismos pelos quais *Methylobacterium* promovem crescimento vegetal é pela regulação dos níveis de etileno, causado pelo estresse nas plantas através da produção de ACC deaminase (OMER et al.2004; MADHAIYAN et al.2006), pela FBN suprindo a planta hospedeira com fontes orgânicas de nitrogênio (SY et al., 2001) e são capazes de sintetizarem pectina e celulase, sugerindo uma possível apresentarem uma possível resistência sistêmica a planta hospedeira (MADHAIYAN et al., 2006).

Micro-organismos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* têm sido amplamente utilizados no sistema de produção orgânica como fornecedor de fósforo e têm mostrado resultados promissores na produção vegetal (PATEL et al. 2011; AMARESAN et al. 2012). *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa* e *Pseudomonas* sp. foram isoladas na rizosfera de arroz (*Oryza sativa*), canola (*Brassica napus* L.), gengibre (*Zingiber officinale*), milho (*Zea mays* L.) e cana-de-açúcar (*Sarcarumm* L.), promovendo crescimento dessas plantas através da produção de AIA, sideróforos, ACC deaminase, solubilização de fosfato, ácido cianídrico, fixação de nitrogênio, controle de fitopatogênicos entre outros (SHAHAROONA et al., 2006; JAYARAJ et al., 2007; ARAÚJO et al., 2013; SIVASAKTHI et al., 2013; SULOCHANA et al., 2014).

Neste estudo, apenas um isolado (IPAC-CF48) apresentou similaridade ao gênero *Brevibacillus*, resultado similar ao encontrado por Magnani (2005), estudando a diversidade de bactérias endofíticas também na cana-de-açúcar, isolou apenas um micro-organismo desse mesmo gênero. Ratón et al.(2012), isolaram e identificaram seis bactérias do gênero *Brevibacillus* na rizosfera de cana-de-açúcar, todas com ação antifúngica, com atividade para pectina, celulose, solubilização de fosfato inorgânico e produção de AIA. *Brevibacillus* sp. tem sido descrito como um importante biorremediador de metais pesados como o arsênio. Mallick et al. (2014), verificaram que a estirpe KUMAs2, promoveu a imobilização de arsênio do solo, mostrou capacidade de produzir AIA e, quando inoculada no solo contaminado com metais pesados, colonizou com sucesso a rizosfera do solo plantado com

pimentão, promovendo seu crescimento, diminuindo a acumulação de metais pesados como Cr e Zn na planta. A estirpe BISR-HY65 de *Brevibacillus* sp. foi descrita por Yadav et al.(2013) como uma bactéria termo tolerante capaz de solubilizar fosfato de complexa solubilização através da produção de ácidos orgânicos como o cítrico, glucônico, málico e fórmico, e mais quatro não identificados, podendo ser utilizado como bioinoculante eficiente capaz de solubilizar fósforo complexado no solo.

No presente trabalho foi observado a dominância das bactérias do filo Firmicutes, resultados contrários à maioria dos trabalhos com micro-organismos diazotróficos em cana-de-açúcar. Esses trabalhos relatam que a maior ocorrência de bactérias endofíticas são pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* spp., *Gluconocatobacter diazotrophicus* e *Azospirillum* spp. (BALDANI et al., 1986; JAMES et al., 1997; REIS JUNIOR et al., 2000). Possivelmente, a não ocorrência do gênero *Azospirillum* spp., tão frequentemente encontrado na cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1997; JAMES & OLIVARES, 1997), pode ter sido devida ao fato que bactérias desse gênero ocorrem com mais frequência na rizosfera e nas zonas de alongação e pelos radiculares das plantas (BROEK & VANDERLEYDEN, 1995).

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA ribossomal, verificado por Gonzalez (2008) mostrou-se uma técnica inadequada para agrupamento das estirpes de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* a nível de espécie, porém conforme Toledo et al.(2009), para caracterização de bactérias já descritas a técnica foi precisa para o sequenciamento parcial de isolados rizobianos indicados para composição de inoculantes. No entanto quando são realizados estudos de novos isolados, o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA não é suficiente, para sanar esse problema, é necessário o uso de outros marcadores taxonômicos nucleares.

Atualmente, o gene 16S rRNA ribossomal é extremamente conservado e além disso, tem um grande número de sequências bacterianas depositadas, nos bancos de dados de genes e por isso a grande facilidade de encontrar vários gêneros com a mesma identidade é alta, sendo assim, a diferença de apenas um nucleotídeo pode diferenciar um organismo a nível de gênero.

Para evitar erros, uma vez, que a biologia molecler é bastante dinâmica no tempo e no espaço, o uso de técnicas mais avançadas para identificar taxonomicamente isolados de forma mais precisa como: regiões hipervariáveis ribossomais, regiões intergênicas e hibridação DNA-DNA já se encontra descrita. Ou até mesmo o uso de marcador taxonômico menos conservado como os *gyrA*, *gyrB*, *recA*, *glyA*, *gliA*, etc.

#### 4 CONCLUSÕES

As características bioquímicas e/ou fisiológicas dos isolados endofíticos estudados indicam que a grande maioria tem potencial para ser utilizada como bactérias promotoras de crescimento vegetal, apresentando mais de um mecanismo de promoção de crescimento, como degradação de amido e quitina, solubilização de fosfato, produção de ácido-indol-3-acético e fixação de nitrogênio.

A caracterização molecular dos isolados endofíticos de colmo e folha de cana-de-açúcar revelou uma grande diversidade de bactérias colonizando esta planta. O uso do marcador BOX-PCR foi importante para separar os isolados idênticos diminuindo desta forma o número de bactérias a serem estudadas.

Através da análise molecular do gene 16S rRNA ribossomal, foi possível verificar que os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* foram os que apresentaram maiores números de indivíduos identificados, seguidos por *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas* e *Brevibacillus*.

Os isolados endofíticos IPA-CC33, IPA-CF65 e IPA-CC9, apresentaram maiores atividades da nitrogenase, solubilização de fosfato, ACC deaminase, catalase e AIA *in vitro*, sendo estes escolhidos para o teste em campo.

## 5 REFERÊNCIAS

- ABATE, C. M. et al. Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 3, p. 249-252, 1999.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, Pavia, v. 163, p. 173-181, 2008.
- ALEXANDER, D.B.; ZUBERER, D.A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 12, n. 1, p. 39-45, 1991.
- ALI, S.; DUAN, J.; CHARLES, T.C.; GLICK, B. R. A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. **Journal of Theoretical Biology**, v. 343, p.193–198, 2014.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, n.3, p. 403–410, 1990.
- AMARESAN, N.; JAYAKUMAR, V.; KUMAR, K.; THAJUDDIN, N. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annum*) seedling growth. **Annals of Microbiology**, v. 62, p. 805–810, 2012.
- ANTO, H.; TRIVEDI, U.; PATEL, K. 2006. Alpha Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 Using Solid-State Fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n.2, p.241-24, 2006.
- ANTUNES, J. E. L. **Diversidade genética e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos em feijão-fava (*Phaseolus lunatos* L.)**. 2010. 108 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal do Piauí, Piauí. 2010.
- ARAÚJO, A.E.S.; BALDANI, V.L.D.; GALISA, P.S.; PEREIRA, J.A.; BALDANI, J.I. Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.64, p.49–55, 2013.
- ARRUDA, L., BENEDUZI, A., MARTINS, A., LISBOA, B., LOPES, C., BERTOLO, F., PASSAGLIA, L.M.P., VARGAS, L.K., 2013. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul state (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v.63, p.15–22, 2013.
- ARSHAD, M.; SHAHROONA, B.; MAHMOOD, T. Inoculation with *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase partially eliminates the effects of drought stress on growth yield and ripening of pea (*Pisum sativum* L). **Pedosphere**, v.18, p.611-620, 2008.

- BACHA, E., SEGERB, G. D. DOS S. , FERNANDES, G. DE C. , LISBOA, B.B., PASSAGLIA, L.M. P. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 99, p.141–149, 2016.
- BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON, D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 325-332, 2001.
- BALANDREAU, J., VIALARD, V., COURNOYER, B., COENYE, T., LAEVENS, S., VANDAMME, P., 2001. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.982–985, 2001.
- BALDANI, J. I.; AZEVEDO, M. S.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; OLIVARES, F. L.; GOI, S. R.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G., eds. **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, SBCS/UFLA/DCS, 1999, 621-666p.
- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMAN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Hesbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, UK, v.46, n.3, p.802-810, 1996.
- BALDANI, J.I., BALDANI, V.L.D., SELDIN, L., DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.36, p.86-39, 1986.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, VL.D.; GOI, S.R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v.29, p.911-922, 1997.
- BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 433-439, 1980.
- BARELMANN, I., MEYER, I.M., TARAZ, K., BUDZIKIEWICZ, D. Cepaciachelin, a new catecholate siderophore from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 51, p. 627- 630, 1996.
- BARAKA, E.A.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth-promoting rhizobacterium, *Burkholderia phytofirmas* strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p. 7246-7252, 2006.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. Azospirillum-plant relationships: agricultural, physiological, molecular and environmental advances (1997–2003). **Canadian Journal Microbiology**, v.50, p.521–525, 2004.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P.B.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J.I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p.94–104, 2013.

BEVIVINO, A., SARROCCO, S., DALMASTRI, C., TABACCHIONI, S., CANTALE, C., CHIARINI, L. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **Federation of European Microbiological Societies journals**, v. 27, p.225–237, 1998.

BEYNOM, R. J., BOND, J.S. **Proteolytic enzymes: A practical approach**. Academic press. Oxford, 1989.

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

BODDEY, R. M.; BODDEY, L. H.; URQUIAGA, S. **A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio**. Itaguaí: Editora Universidade Rural, 1990. 37 p. (EMBRAPA-CNPBS. Documentos, 6).

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

BROEK, A.; VANDEVAN, DERLEYDEN, J. Review genetics of the *Azospirillum-plant* root association. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, p.445-466, 1995.

BUENO, P. R. M.; DE OLIVEIRA, T. F.; CALIARI, M.; CASTIGLIONI, G. L.; JÚNIOR, M. S. S. Selection and optimization of extracellular lipase production using agro-industrial waste. **African Journal of Biotechnology**, v.13, n.4, p.566-573, 2014.

ÇAKMAKÇI, R.; DÖNMEZ, M.F.; ERTÜRK, Y.; ERAT, M.; HAZNEDAR, A.; SEKBAN, R. Diversity and metabolic potential of culturable bacteria from the rhizosphere of Turkish tea grown in acidic soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 332, p. 299-318, 2010.

CAMPO, R. J.; HUNGRIA, M. **Anais da XIII da Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE)**. EMBRAPA Soja, Londrina, 2007, 212p.

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

CAPPUCCINO, J.G.; SHERMAN, N. **Microbiology: a laboratory manual** (8th edition,) Pearson, 2002.



CARVALHO, P. O.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M. T.I.; SILVA, D.M. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**, v.26, n.1, p.75-80, 2003.

CASE, R. J.; LABBATE, M.; KJELLEBERG, S. AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. **The ISME Journal**, v.2, n.4, p.345-349, 2008.

CERVILLA, B.; BLASCO, J.J.; RIOS, M.A.; ROSALES, E.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, M.M.; RUBIO-WILHELMI, L.; ROMERO, J.M.; RUIZ, J. M.. Parameters Symptomatic for Boron Toxicity in Leaves of Tomato Plants. **Journal of Botany**, v.2012, p.1-17, 2012.

CHA, C.; GAO, P.; CHEN, YU-CHING.; SHAW, P. D. and FARRAND, S. K. Production of Acyl-Homoserine Lactone Quorum-Sensing Signals by Gram-Negative Plant-Associated Bacteria. **The American Phytopathological Society**, v. 11, n. 11, p. 1119–1129, 1998.

CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D.J.; SELVAKUMAR, G.; SUNDARAM, S.P. Novel plant growth promoting rhizobacteria – Prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p.38-53, 2015.

CHEN, Y., YAN, F., CHAI, Y., LIU, H., KOLTER, R., LOSICK, R., GUO, J.-H. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. **Environmental Microbiology**, v. 15, p.848–864, 2013.

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

COGO, L. L. **Caracterização molecular de genes de virulência de isolados clínicos de *Helicobacter pylori* determinação da atividade antimicrobiana in vitro de diferentes fitoterápicos utilizados na medicina popular brasileira**. 2008. 107f. Dissertação (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, UFPR, Curitiba, 2008.

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; AIT BARKA, E. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.1685–1693, 2005.

COSTA, P.B.D.; GRANADA, C.E.; AMBROSINI, A.; MOREIRA, F.; SOUZA, R., PASSOS, J.F.M.; ARRUDA, L.; PASSAGLIA, L.M.P. A model to explain plant growth promotion traits: a multivariate analysis of 2,211 bacterial isolates. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p.1-25, 2014.

COUTINHO, B.G.; LICASTRO, D.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; CÁMARA, M.; VENTURI, V. Plant-influenced gene expression in the rice endophyte *Burkholderia kururiensis* M130. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n.1, p. 10–21, 2015.

DAANE, L.L.; HARJONO, I.; BARNS, S.M.; LAUNEN, L.A.; PALLERONI, N.J.; HAGGBLOM, M.M. PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p.131–139, 2002.

DAVOLOS, C.C.; HERNÁNDEZ-MARTINEZ, P.; CRIALESI-LEGORI, P.C.B.; DESIDÉRIO, J.A.; FERRÉ, J.; ESCRICHE, B.; LEMOS, M.V.F. Binding analysis of *Bacillus thuringiensis* Cry1 proteins in the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v.127,p.32–34, 2015.

DE BRUIJN, F.J.; RADEMAKER, J.; SCHNEIDER, M.; ROSSBACH, U.; LOUWS, F.J. 1996. Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses. In:**Biology of Plant-Microbe Interaction, Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions**. Stacey, G., Mullin, B., and Gresshoff, P., eds. Knoxville, APS Press, p. 497–502, 1996.

DEL CASTILLO, I.; OJEDA, J.; MEGÍAS, E.; MANYANI, H.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; PÉREZ-MONTAÑO, F.; BELLOGÍN, R. A.; ESPUNY, M. R.; CUBO, M. T.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.. Isolation of endophytic , epiphytic and rhizosphere plant growth-promoting bacteria from cultivated rice paddy soils of the Guadalquivir river marshes. **Journal of Agricultural Science** v. 4, n. 2, p. 127-136, 2015.

DEES, C., RINGELBERG, SCOTT, T.C. AND PHELPS, T.J. Characterization of the Cellulose-Degrading Bacterium NCIMB 10462. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.51-52, p. 263-274, 1995.

DILLIRANI, N., GOBINATH, R., CHANDRARAJ, K. Purification and characterization of malto-oligosaccharide forming  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* KCC103. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 591–597, 2006.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107 – 149, 2003.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI,1995, 60p.

DUBAL S.A.; TILKARI Y.P.; MOMIN S.A.; I.V. BORKAR. Biotechnological routes in flavour industries. **Biotechnology Advances**, v. 6, p. 30–45, 2008.

EGAMBERDIYEVA, D.; HOFlich, G. Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils temperatures. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p.973-978, 2003.

ERTURK, Y.; ERCISLI, S.; HAZNEDAR, A.; CAKMAKCI, R. Effects of plant growthpromoting rhizobacteria (PGPR) on rooting and root growth of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*)stem cuttings. **Biological Research**, Santiago de Chile, v. 91, p. 91-98, 2010.

FARINA, R.; BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; CAMPOS, S.B.; LISBOA, B.B.;WENDISCH, V.; VARGAS, L.K.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity of plant

growthpromotingrhizobacteria communities associated with the stages of canola growth. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 55, p. 44-52, 2012.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; RODRIGUES, L.. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.12, p. 1509-1517, 2001.

FIGUEIREDO, M.V.B.; SELDIN, L.; ARAUJO, F.F.; MARIANO, R.L.R. Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**, v.18, 21-43p, D.K. Maheshwari (ed.), 2010.

FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; REIS, V.M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMAN, A.; SCHOLER, M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uniculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil**, v.356, p.83–99, 2012.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N.P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino no Estado de Pernambuco, **Bragantia**. v. 66, n.3, p. 481-490, 2007.

FUQUA, C.; WINANS, S. C. A. LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plas- mid conjugal transfer in the pre- sence of a plant tumor metabolite. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n.10, p. 2796- 2806, 1994.

GAMALERO, E.; GLICK, B.R. Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. In: MAHESHWARI, M.K. (Ed.), **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 17–46p, 2011.

GARDENER, B. B. M.. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. The nature and application of biocontrol microbes: *Bacillus* spp. **Phytopathology** , v.94, p.1252-1258, 2004.

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

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

GLICK, B. R.. **Beneficial Plant-Bacterial Interactions**. Springer, Heidelberg, 2015.

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

GONÇALVES, F. A. G. **Produção de Lipase Extracelular por Levedura em Cultivo Submerso**. 67 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos, Departamento de Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

GOVINDASAMY, V., SENTHILKUMAR, M., MAGHESHWARAN, V., KUMAR, U., BOSE, P., SHARMA, V., ANNAPURNA, K. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential PGPR for sustainable agriculture. In: Maheshwari, D.K. (Ed.), **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**. Springer, Berlin Heidelberg, 333–364p, 2011.

GROSSI DE SÁ, M.F.; CHRISPPEELS, M.J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amilase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v27, n.4, p. 271-281, 1997.

HAGGAG, W.M.; TIMMUSK, S. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p.961–969, 2008.

HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, p.17–34, 2003

HALDER, A.K.; MISHRA, A. K.; BHATTACHARYYA, P.; CHAKRABARTTY, P.K. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 36, p. 81-92, 1990.

HARDMAN, A. M.; STEWART, G. S.; WILLIAMS, P. *Quorum sensing* and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 74, n.4, p. 199-210, 1998.

HAROLD, J.B. Microbiological applications: a Laboratory Manual in General Microbiology. 8th Edition. William C Brown Publishers, New York. 1-478p, 2002.

HOWIESON, J.G.; DE MEYER, S.E.; VIVAS-MARFISI, A.; RATNAYAKE, S.; ARDLEY, J.K.; YATES, R. J. Novel *Burkholderia* bacteria isolated from *Lebeckia ambigua*—a perennial suffrutescent legume of the fynbos. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 60, p. 55–64, 2013.

HU, D.; XIN, JU.; LIANGZHI, LI.; CUIYING, HU.; LISHI, YAN.; TIANYUN, WU.; JIAOLONG, FU.; MING, QIN. Improved in situ saccharification of cellulose pretreated by dimethyl sulfoxide/ionic liquid using cellulase from a newly isolated *Paenibacillus* sp. LLZ1. **Bioresource Technology**, v.201, p.8-14, 2016.

HUNGRIA, M.; MENNA, P.; BANGEL E.V.;BARCELLOS, F.G.; GRANGE, L.; PINTO, F.G.S.;RIBEIRO, R.A.; BATISTA, J.S.S.; BINDE, D.R.;PLOTTEGHER, F.; KASCHUK, G.; ALBERTON, A.;LOUREIRO, M.F.; CAMPO. R.J.; CHUEIRE, L.M.O. Identificação das metodologias mais adequadas para a análise da diversidade genética intra e interespecífica em rizóbios. In: Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão da Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola (RELARE), v.14, 12p. Bonito: **Embrapa Agropecuária Oeste**, 2008.

IDRIS, R.; TRIFONOVA, R.; PUSCHENREITER, M.; WENZEL, W.W.; SESSITSCH, A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.2667–2677, 2004.

IKEDA, A.C. **Bioprospecção e identificação de bactérias isoladas de raízes de milho (*Zea mays* L.) para promoção de crescimento vegetal e controle biológico.** TESE (Doutorado em Genética). Curitiba, PR. 2014, 94p. Universidade Federal do Paraná

INUI, R. N. **Isolamento e identificação de bactérias solubilizadoras de fósforo e produtoras de auxinas em solo com cana-de-açúcar.** 2009. 90f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, 2009.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, and endophyte diazotrophic colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 308, 785-797, 1997.

JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.17, p.77-119, 1997.

JAYARAJ, J.; PARTHASARATHI, T.; RADHAKRISHNAN, N.V. Characterization of a *Pseudomonas fluorescens* strain from tomato rhizosphere and its use for integrated management of tomato damping-off. **Biocontrol**, v. 52, p. 683-702, 2007.

JHA, Y.; SUBRAMANIAN, R. Paddy plants inoculated with PGPR show better growth physiology and nutrient content under saline condition. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v.73, p.213-219, 2013.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. **Evolution of protein molecules.** In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, p. 21-132, Academic Press, New York, 1969.

KANG, S.M.; KHAN, A.L.; WAQAS, M.; YOU, Y.H.; KIM, J.H.; KIM, J.G.; HAMAYUN, M.; LEE, I.J. Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, p.673-682, 2014.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional systems in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.32, n.2, p.210-220, 2006.

KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture – a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 27, p. 29-43, 2007.

KHAN, A.; SIRAJUDDIN, ZHAO, X. Q.; JAVED, M. T.; KHAN, K. S.; BANO, A.; SHEN, R. F.; MASOOD, S. *Bacillus pumilus* enhances the tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) to combined stresses of NaCl and high boron due to limited uptake of Na<sup>+</sup>. **Environmental and Experimental Botany**, v.124, p.120-129, 2016.

KOKALIS-BURELLE, N.; KLOEPPER, J.W.; REDDY, M.S. Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous rhizosphere microorganisms. **Applied Soil Ecology**, v. 31, p. 91-100, 2006.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANIKLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

KUMAR, P., DUBEY, R.C., MAHESHWARI, D.K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, v. 167, p.493–499, 2012.

KUMAR, V.; SINGH, S.; MANHAS, A.; SINGH, J.; SINGLA, S.; KAUR, P.; DATA, S.; NEG, I P.; KALIA, A. Bioremediation of petroleum hydrocarbon by using *Pseudomonas* species isolated from petroleum contaminated soil. **Oriental Journal of Chemistry**, v.30, p.1771-1776, 2014.

KUROSAWA, K.; HOSAKA, T.; TAMEHIRO, N.; INAOKA, T.; OCHI, K. Improvement of  $\alpha$ -Amylase Production by Modulation of Ribosomal Component Protein S12 in *Bacillus subtilis* 168. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.1, p. 71–77, 2006.

LACEY, L.A.; FRUTOS, R.; KAYA, H.K.; VANDERLEYDEN, J. Insect pathogens as biological control agents: Do you have a future? **Biological Control**, v. 21, p. 230-248, 2001.

LAGUERRE, G.; VAN BERKUM, P.; AMARGER, N.; PRÉVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4748- 4758, 1997.

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

LIN, L. L.; HSU, W. H.; CHU, W. S. A gene encoding for an  $\alpha$ -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. Strain TS-23 and its expression in *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 325-334, 1997.

LIN, WENXIONG ; WU, LINKUN ; LIN, SHENG ; ZHANG, AIJIA ; ZHOU, MINGMING ; LIN, RUI ; WANG, HAIBIN ; CHEN, JUN ; ZHANG, ZHIXING ; LIN, RUIYU LIN, WENXIONG. Metaproteomic analysis of ratoon sugarcane rhizospheric soil. **BMC Microbiology**, v.13, n.1, p.135, 2013.

LIRA-CADETE, L.; FARIAS, A.R.B.; RAMOS, A.P.S.; COSTA, D.P.; FREIRE, F.J.; KUKLINSKY SOBRAL, J. Variabilidade genética de bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de solubilizar fosfato inorgânico. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 122-129, 2012.

LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, p. 81-125, 1999.

LUVIZOTTO, D. M. **Caracterização fisiológica e molecular de *Burkholderia* spp. associadas às raízes de cana-de-açúcar**. Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola. Piracicaba. 94f, 2008  
Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; KWON, S.W.; SA, T.M.. *Methylobacterium phyllosphaerae* sp. nov., a pink-pigmented, facultative methylotroph from the phyllosphere of rice. **international journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, p.22–27, 2009.

MADHAIYAN, M.; REDDY, B. V. S.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S. P.; SA, T. M. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n. 4, p. 270-276, 2006.

MAGALHÃES, F.M.M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.15, n.4, p.246-252, 1984

MAGNANI, G.S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar**. 92 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Universidade Federal do Paraná, Curitiba- PR, 2005.

MAGNANI, G.S; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA F.O.; SOUZA, E. M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n.1, p. 250-258, 2010.

MALLICK, IVY; HOSSAIN, SK. TOFAJEN; SINHA, SANGRAM; MUKHERJEE, SAMIR KUMAR. *Brevibacillus* sp. KUMAs2, a bacterial isolate for possible bioremediation of arsenic in rhizosphere. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.107, p.236-244, 2014.

MARRA, L.M.; GRAZZIOTTI, P.H.; NUNES, U.R.; MOREIRA, F.M.S. Bactérias diazotróficas em sempre-viva. **Bioscience Journal**, v. 28, p. 17-24, 2012.

MARTINS, M.L. **Caracterização de protease e lipase de *Pseudomonas fluorescens* e quórum sensing em bactérias psicotróficas isoladas de leite**. 2007. 183 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola (Universidade Federal de Viçosa-MG, 2007.

MARTINS, P.G.; LIRA JUNIOR, M.A.; · FRACETTO, G.G. M.; SILVA, · M.L. R. B.; VINCENTIN, R. P.; LYRA, · M.D. C. C. P. DE. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins. of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, v.197, n.3, p.459-469, 2015.

MARULANDA, A.; AZCON, R.; CHAUMONT, F.; RUIZ-LOZANO, J.M.; AROCA, R.. Regulation of plasma membrane aquaporins by inoculation with *Bacillus megaterium* strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions. **Planta**, v. 232, n.2, p. 533- 543, 2010.

MASSENSINI, A.M. **Solubilização de fosfatos mediada por microrganismo do solo de plantio de Eucalipto**. 2007. 95f. (Dissertação em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

MBAI, F.N.; MAGIRI, E.N.; MATIRU, V N; NG'ANGA'A, J.; NYAMBATI, V. C. S. Isolation and Characterisation of Bacterial Root Endophytes with Potential to Enhance Plant Growth from Kenyan Basmati Rice. **American International Journal of Contemporary Research**. v. 3, n. 4, p. 25-40, 2013.

MEHRVARZ, S.; CHAICHI, M.R.; ALIKHANI, H.A. Effects of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on yield and yield components of barely (*Hordeum vulgare* L.). **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, Dubai, v. 3, n. 6, p. 822-828, 2008.

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

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata*(L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.2, p.235-246, 2006.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 5., 2007, Recife. Anais. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia, 2007. p. 129-140.

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

MEYER, J.M., TRAN, V., STINZI, A., BERGE, O., WINKELMAN, G. Ornibactin production and transport properties in strains of *Burkholderia vietnamiensis* and *Burkholderia cepacia* (formely *pseudomonas cepacia*). **Biometales**,v. 8, p.309-307, 1995.

MILLER, M. B.; BASSLER, B.L. *Quorum sensing* in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v.55, p. 165-199, 2001.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Resenha Energética Brasileira**, junho de 2015, 2 p. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/documents/1138787/1732840/Resenha+Energ%C3%A9tica+Brasil+2015.pdf/4e6b9a34-6b2e-48fa-9ef8-dc7008470bf2>. Acesso em 15 janeiro 2016.

MIRZA, M.S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, p. 47-54, 2001.

MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A.R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M.Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associatedwith maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 58, p. 21-28, 2012.



MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n. 2, p. 74 – 99, 2010.

NASCIMENTO, F.X.; ROSSI, M.J.; SOARES, C.R.F.S.; MCCONKEY, B. J.; GLICK, B.R. New Insights into 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate (ACC) Deaminase Phylogeny, Evolution and Ecological Significance. **PloS One**, v.9, n.6, p.1-17, 2014.

NAUTIYAL, C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265-270, 1999.

NEIVERTH, A.; DELAI, S.; GARCIA, D.M.; SAATKAMP, K.; DE SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.D.O.; GUIMARÃES, V.F.; DOS SANTOS, M.F.; VENDRUSCOLO, E.C.G.; DA COSTA, A.C.T. Performance of different wheat genotypes inoculated with the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **European Journal of Soil Biology**, v. 64, n.1, 2014.

OLIVARES, F.L.; REIS, V.M.; FACANHA, A.R. The role of endophytic diazotrops in sugarcane rootmorphogenesis and development. In: FINAN, T.M.; O'BRIAN, M.R.; LAYZELL, D.B.; VESSEY, J.K.; NEWTON, W., eds. **Nitrogen fixation: Global perspectives**. Oxon, CAB International, 2000, 476-477p.

OMER, Z.S., TOMBOLINI, R., BROBERG, A., GERHARDSON, B., 2004. Indole-3- acetic acid production by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria. **Plant Growth Regul.** 43, 93–96.

PANDYA, M.; RAJPUT, M.; RAJKUMAR, S. Exploring Plant Growth Promoting Potential of Non Rhizobial Root Nodules Endophytes of *Vigna radiate*. **Microbiology**, 2015, Vol. 84, p. 80–89, 2015.

PANT, GAURAV; PRAKASH, ANIL; PAVANI, J.V.P.; BERA, SAYANTAN; DEVIRAM, G.V.N.S. et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis* (2015). **Journal of Taibah University for Science**, v.9, n.1, p. 50-55.

PARKE, J.L., GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the Burkholderia cepacia complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, v.39,p. 225–258, 2001.

PASCHOLATI, S.F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A. KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agrônomicas Ceres, 1995. cap. 19, p.343-364.

PATEL, B.N., SOLANKI, M.P., PATEL, S.R., DESAI, J.R. Effect of bio-fertilizers growth, physiological parameters, yield and quality of brinjal cv. Surati Ravaiya. **Indian J. Hortic.** V.68, p.370–374, 2011.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (zea mays)**. 2009. 74 F. TESE (DOUTORADO) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade De Ciências Agrárias E Veterinárias. Jaboticabal.

PEIX, A.; RIVAS-BOYERO, A. A.; MATEOS, P. F.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; MARTÍNEZMOLINA, E.; VELAZQUEZ, E. Growth promotion of chickpea and barley by a

phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.103-110, 2001.

PENROSE, D. M. and GLICK, B. R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**, v.118, n.1, pp 10-15, 2003

PÉREZ-MONTAÑO, F., ALÍAS-VILLEGAS, C., BELLOGÍN, R. A, DEL CERRO, P., ESPUNY, M. R., JIMÉNEZ-GUERRERO, I., LÓPEZ-BAENA, F. J., et al. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiological research**, 169(5-6), 325–36.

POONGUZHALI, S., MADHAIYAN, M., YIM, W.J., KIM, K.A., SA, T.M. Colonization pattern of plant root and leaf surfaces visualized by use of green-fluorescentmarked strain of *Methylobacterium suomiense* and its persistence in rhizosphere. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p.1033–1043, 2008.

QUECINE, M.C.; ARAUJO, W.L.; ROSSETTO, P.B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LACAVA, P.T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Sugarcane growth promotion by the endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p.7511-7518, 2012.

RAJA, P.; BALACHANDAR, D.; SUNDARAM, S.P. Genetic diversity and phylogeny of pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria isolated from the phyllosphere of tropical crop plants. **Biology and Fertility of Soils**, v.45, p.45–53, 2008.

RATÓN, T. D. L. M. O.; YANO, R.; GÁMEZ, O. R.; FLOH, E. I. S.; DÍAZ, M. D. J. S.; BARBOSA, H. R. Isolation and characterisation of aerobic endospore forming Bacilli from sugarcane rhizosphere for the selection of strains with agriculture potentialities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.1593-1603, 2012.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemistry Journal**, v. 290, p. 205-218, 1993.

REIS, V. M. ; PITARD, R. M. ; DOURADO, F. S. ; CAMACHO, N. N. ; VIDEIRA, S. S. ; CAMARGO, A. B. ; SORTE, P. F. B. ; VIDAL, M. S. ; SCHWAB, S. ; Baldani, J.I. . **Caracterização morfo-fisiológica e molecular das estirpes diazotróficas do inoculante de cana-de-açúcar**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2011 (Documento No. 280).

REIS, V. M.; PEREIRA, W.; HIPÓLITO, G. S. **Métodos de aplicação de bactérias diazotróficas em cana-planta para fins de determinação de eficiência agrônômica**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 4p. (Comunicado Técnico, 118).

REIS-JUNIOR, F.B., SILVA, L.G., REIS, V.M., DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p. 985-995, 2000.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *gaumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 40, p. 524–532, 1991.

REZENDE, S. S.; OLIVEIRA, M. E. S. de; DIDONET, C. C. G. M. **Bactérias Diazotróficas do gênero *Pseudomonas*: isolamento, diversidade e caracterização em plantas de arroz no cerrado de Goiás, 2009.** Disponível em <http://www.prp2.ueg.br/06v1/conteudo/pesquisa/inic-cien/eventos/sic2007/flashsic2007/arquivos/resumos/resumo69.pdf> / Acesso em: 17 Dez/2015.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 897-906, 2001.

ROBERGE, M. R.; KNOWLES, R. Ureolysis, immobilization and nitrification in black spruce (*Picea mariana* Mill.)-humus, **Soil Science Society of America Proceedings**, v.30, p. 201–204, 1966.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. Summa. **Phytopathologica**, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

RODRIGUES, L. S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 275-284, 2006.

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

ROHLF, F. J. Note on Algorithm 81: **Dendrogram plot**. **Computer J**, v. 18, p. 90-92, 1975.

SAAVEDRA, M. E. M. (2013). *Estudio del caracter endofito de bacterias aisladas de plantas de arroz en las marismas del Guadalquivir*, 224f (Tesis doctoral). Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. 2013.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAJEDI, R.H.; NADERI-MANESH, H.; KHAJEH, K.; AHMADVAND, R.; RANJBAR, B.; ASOODEH, A.; MORADIAN, F. A Ca-independent  $\alpha$ -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n.5-6, p. 666–671, 2005.

SALEEM, M.; ARSHAD, M.; HUSSAIN, S.; BHATTI, A.S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 34, p. 635-648, 2007.

SANTOS, A. F.J.; MARTINS, C. Y. S.; SANTOS, P. O.; CORRÊA, É. B.; BARBOSA, H. R.; SANDOVAL, A. P. S.; OLIVEIRA, L. M. Diazotrophic bacteria associated with sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm): potential for plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 385, n. 1-2, p. 37-48, 2014.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKYSOBRA, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, n.1, p. 142-149, 2012.

SANTOYO, G., MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, MA. D. C.; GLICK, B.R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v.183, p. 92–99, 2016.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v. 172, n. 2, p. 261 – 269, 1995.

SELDIN, L.; ROSADO, A.S.; CRUZ, D.W.; NOBREGA, A.; VAN ELSAS, J.D.; PAIVA, E. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* Strains Isolated from Rhizoplane, Rhizosphere, and Non-Root-Associated Soil from Maize Planted in Two Different Brazilian Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p.3860–3868, 1998.

SELVAKUMAR, G.; MOHAN, M.; KUNDU, S.; GUPTA, A.D.; JOSHI, P.; NAZIM, S.;GUPTA, H.S. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). **Letters in Applied Microbiology**, Washington, v. 46, p. 171-175, 2008.

SHAHAROONA B, ARSHAD M, ZAHIR ZA. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiate* L.). **Lett Appl Microbiol**, v.42, p.155-159–9, 2006.

SHIN, S.H.; LIM, Y.; LEE, S.E.; YANG, N.W.; RHEE, J.H. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 89-95, 2001.

SIDDIQUI, Z.A. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Dordrecht: Springer, 2005. chap. 4, 111- 141p.

SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de Fosfatos Naturais por Microrganismos Isolados de Cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 847-854, 2002.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de Fosfatos por Microrganismos na Presença de Fontes de Carbono. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v.24, p.11-319, 2000.

SILVA, M.L.R.B.; FIGUEIRÔA, C. S.; MERGULHÃO, A. C.E. S.; LYRA, M. C.C. P. Identificação de bactérias diazotróficas isoladas em cultivares de palma (*Opuntia* e *Nopalea*) usando o gene recA. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 2, p. 577-583, 2015.

SINGH, R. P.; SHELKE, G. M.; KUMAR, A.; JHA, P. N. Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to “stress ethylene” produced in plants. **Frontiers in microbiology**, v.6, n.937, 2015.

SIVASAKTHI, S.; KANCHANA, D.; USHARANI, G.; SARANRAJ, P. Production of plant growth promoting substance by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* isolates from paddy rhizosphere soil of Cuddalore District Tamil Nadu, India. **International Journal of Microbiology Research**, v.4, n.3, p. 227–233, 2013.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy**. Freeman. San Francisco, 573p, 1973.

SOBRAL, J.K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003. 108p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

SODHI, H.K.; SHARMA, K.; GUPTA, J.K.; SONI, S.K. Production of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. **Process Biochemistry**, v. 40, p.525–534, 2005.

SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. A. **Principles of Numerical Taxonomy**. Freeman. San Francisco, 1963. 359 p.

SOUCHIE, E.L; BAREA, J.M.; SAGGIN-JUNIOR, O.J.; DA SILVA, E.M.R. Solubilização de fosfatos em meios sólido e líquido por bactérias e fungos do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.1149-1152, 2005.

SOUZA, S.R. **Reação de genótipos de cana-de-açúcar ao raquitismo da soqueira (*Leifsonia xily* subsp. *Xyli*), métodos de detecção e efeito de bactérias diazotróficas**. Curitiba, PR. 2011. 141f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias). Universidade Federal do Paraná.

SUÁREZ-MORENO, Z.; CABALLERO-MELLADO, J.; COUTINHO, B., MENDONÇA-PREVIATO, L.; JAMES, E.; VENTURI, V. Common features of environmental and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. **Microbial Ecology**, v. 63, p.249–266, 2012.

SULOCHANA, M.B.; JAYACHANDRA, S.Y.; KUMAR, S.A.; PARAMESHWAR, A.B.; REDDY, K.M.; DAYANAND, A. Siderophore as a potential plant growth-promoting agent produced by *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.174, p.297–308, 2014.

SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A.K; YADAV, R.L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v.47, p.155–162, 2005.

SY, A.; GIRAUD, E.; SAMBA, R.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. Certain legumes of the genus *Crotalaria* are specifically nodulated by a new species of *Methylobacterium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 6, p. 503-508, 2001.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3ed. Porte Alegre: Artmed. 2004. 719 p.

TAN, Z., HUREK, T., GYANESHWAR, P., LADHA, J.K. AND REINHOLD-HUREK. B. (2001). Novel endophytes of rice form a taxonomically distinct subgroup of *Serratia marcescens*. **Systematic Applied Microbiology**, 24 (2): 245-51.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V.M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n.1, p.35–49, 2012.

TISDALE, S.L.; NELSON, W.L.; BEATON, J.D. Soil fertility and fertilizers. Macmillan, New York, 1985, 161–168p.

VEDDER, E.B. Starch agar-A new culture medium for the gonococcus. **Journal Infectious Diseases**, v.16: p.385, 1915.

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

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

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

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, p. 571–586, 2003.

VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, T. L. S.; BALDANI, V. L. D. **Metodologia para o isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não leguminosas**. DOC. 234. EMBRAPA, agosto, 2007. 80p.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

XIE, G. H.; SU, B.L.; CUI, Z. J. Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing strains of *Bacillus* in rice rhizosphere of the Yangtze River valley. **Acta Microbiologica Sinica**, v.38, p. 480–483, 1998.

YADAV, H.; GOTHWAL, R.K.; NIGAM, V.K.; SINHA-ROY, S.; GHOSH, P. Optimization of culture conditions for phosphate solubilization by a thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacterium *Brevibacillus* sp. BISR-HY65 isolated from phosphate mines. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.3, n.2, p.217-225, 2013.

YANG, H. H.; VINOPAL, R. T.; GRASSO, D.; SMETS, B. F. High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1528-1536, 2004.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; BRUIJN, F.D.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K. & DAZZO, F.B. Natural endophytic associations between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, v. 194, p.99-114, 1997.

YANO, D. M. Y.; ATTILI, D. S.; GATTI, M. S. V.; EGUCHI, S. Y.; OLIVEIRA, U. M. **Técnicas de microbiologia em controle de qualidade**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1991.

YOUNESI, O.; MORADI, A. Effects of plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungus (AM) on antioxidant enzyme activities in salt stressed bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Agriculture**, v. 60, n 1, p.10-21, 2014.

ZHANG, W-I.; HE, L-Y.; WANG, Q.; SHENG, X-F. Inoculation with endophytic *Bacillus megaterium* 1Y31 increases Mn accumulation and induces the growth and energy metabolism-related differentially-expressed proteome in Mn hyperaccumulator hybrid pennisetum. **Journal of Hazardous Materials**, v.300, p. 513-521, 2015.

## Parte II

### INOCULAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

#### RESUMO

O cultivo de cana-de-açúcar no Brasil vem se destacando a cada ano, principalmente com a necessidade de combustíveis e energias limpas. Novas áreas de plantios estão surgindo e com isso há necessidade de investimentos em tecnologia que visem maiores produtividades e que seja economicamente e ambientalmente viável. Sendo a cultura bastante extratora de nitrogênio, a adubação com esse nutriente nas grandes áreas de plantio é economicamente inviável, não contribui para a produção de energia limpa, uma vez que os fertilizantes são fabricados utilizando energia fóssil. Como alternativa, o uso de bactérias diazotróficas tem o potencial de fornecer nitrogênio à cultura pela fixação biológica do nitrogênio (FBN). Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de inoculantes microbianos contendo bactérias diazotróficas endofíticas, previamente selecionadas, inoculadas individualmente e em mistura na produtividade, qualidade tecnológica e fixação biológica de N<sub>2</sub> da cana-de-açúcar, variedade RB92579, nos ciclos da cana planta, soca e ressoca. O experimento foi conduzido por três anos compreendendo os ciclos de cana planta, soca e ressoca na Estação Experimental Itapirema, do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), no município de Goiana-PE. O solo da área experimental foi classificado como Espodosolo Cárbico de textura arenosa e apresenta baixa fertilidade natural. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 10x3, constituído de dez tratamentos (IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropedicae*), IPA-CC33(*Pseudomonas* sp.), IPA-CF65 (*Bacillus Megaterium*), IPA-CC9 + IPA-CC33, IPA-CC9 + IPA-CF65, IPA-CC33 + IPA-CF65, IPA-CC9 + IPA-CC33 + IPA-CF65, Mistura Embrapa (BR1140 (*Azospirillum amazonense*), BR11175 (*H. seropedicae*), BR11192 (*H. rubrisubalbicans*), BR11284 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e BR11364 (*Burkholderia tropica*), testemunha nitrogenada (TN) e testemunha absoluta (TA)), três ciclos de cultivo (cana-planta, cana-soca e cana-ressoca) com quatro repetições, totalizando 40 parcelas por cultivo. As avaliações foram aos 11 meses após o plantio para cana-planta e 12 meses após o corte para cana-soca e ressoca. Os parâmetros avaliados foram: altura de plantas, diâmetro do colmo, massa seca da parte aérea, nitrogênio total das folhas +3, produtividade do colmo fresco, rendimento de açúcar por hectare (TPH), teor de sólidos solúveis totais (°Brix), fibra, açúcar total recuperável (ATR) e estimativa da contribuição da FBN na nutrição da cana-de-açúcar pela técnica de abundância natural do isótopo <sup>15</sup>N. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com comparações entre médias dos tratamentos pelo teste F seguido da aplicação do teste Duncan a 5% de probabilidade. A inoculação resultou em diferenças significativas (p<0,05) entre os tratamentos inoculados com as bactérias diazotróficas endofíticas e a TA para os parâmetros diâmetro do colmo e ATR, para o cultivo cana-ressoca. A contribuição da FBN nos tratamentos inoculados variou de 4,62% a 57,31% . Nos demais parâmetros avaliados não houve diferença significativa (p>0,05), porém constatou-se incrementos na produtividade do colmo de até 14 Mg.ha<sup>-1</sup> em comparação a TN, entre os ciclos. Este incremento possivelmente foi proveniente dos benefícios da inoculação, inferindo baixo custo econômico e ecológico, assim como resultando em promoção de crescimento das plantas, pela aplicação do inoculante bacteriano que está relacionado a uma necessidade iminente para uma agricultura mais sustentável.

**Palavras-chave:** RB92579; inoculante; *Bacillus megaterium*; *Pseudomonas* sp.; *Herbaspirillum seropedicae*; fixação biológica do nitrogênio, <sup>15</sup>N.



## INOCULATION OF CANE SUGAR WITH BACTERIA DIAZOTROPHIC ENDOPHYTIC

### ABSTRACT

The sugarcane cultivation in Brazil has been increasing every year, especially with the need for clean fuels and energies. New areas of plantations are emerging and with it the need for investments in technology aimed at higher productivity and is economically and environmentally viable. Being quite extraction culture of nitrogen fertilization with this nutrient in large areas of plantation is economically viable, it does not contribute to the production of clean energy, since fertilizers are manufactured using fossil energy. Alternatively, the use of diazotrophs has the potential to provide nitrogen culture for biological nitrogen fixation (BNF). This study aimed to evaluate the microbial inoculants efficiency containing endophytic bacteria, previously selected, inoculated individually and in combination in productivity, technological quality and biological N<sub>2</sub> fixation of sugarcane, variety RB92579, the cycles of plant cane, soca and ressoca. The experiment was conducted for three years comprising the cycles of plant cane, soca and ressoca in Itapirema Experimental Station of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), in Goiana-PE municipality. The soil of the experimental area was classified as Spodosol Carbic sandy texture and has a low natural fertility. The experimental design was randomized blocks in a factorial 10x3, consisting of ten treatments (IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropedicae*), IPA-CC33 (*Pseudomonas* sp.), IPA-CF65 (*Bacillus Megaterium*), IPA-CC9 + IPA-CC33, IPA-CC9 + IPA-CF65, IPA-CC33 + IPA-CF65, IPA-CC9 + IPA-CC33 + IPA-CF65, mix Embrapa (BR1140 (*Azospirillum amazonense*) BR11175 (*H. seropedicae*) BR11192 (*H. rubrisubalbicans*) BR11284 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) and BR11364 (*Burkholderia tropica*), nitrogen witness (TN) and absolute control (TA)), three crop cycles (plant cane, cane ratoon and cane ressoca) with four replications, totaling 40 .. growing by installments Assessments were at 11 months after planting to plant cane and 12 months after the cut for cane ratoon and ressoca the parameters evaluated were: plant height, stem diameter, shoot dry weight, nitrogen total +3 leaves, fresh stalk yield, sugar yield per hectare (TPH), total soluble solids (° Brix), fiber, total recoverable sugar (ATR) and estimation of the contribution of BNF nutrition of sugar cane the technique of natural abundance of <sup>15</sup>N isotope. Data were subjected to analysis of variance comparisons between treatment means the test F followed by the application of Duncan test at 5% probability. The inoculation resulted in significant differences (p<0,05) between the treatments inoculated with endophytic bacteria and TA parameters for stem diameter and ATR, for cane cultivation ressoca. The contribution of BNF in the inoculated treatments ranged from 4.62% to 49.35%. In other parameters no significant difference (p >0.05), but it was found in increments of up to 14 Mg ha<sup>-1</sup> stalk productivity compared to TN, between cycles, which was possibly from the benefits of inoculation, implying low economic and environmental cost, as well as resulting in growth promotion of plants, the application of inoculant that is related to an imminent need for a more sustainable agriculture.

**Keywords:** RB92579; inoculant; *Bacillus megaterium*; *Pseudomonas* sp.; *Herbaspirillum seropedicae*; biological nitrogen fixation, <sup>15</sup>N.

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo da cana-de-açúcar tem grande importância para o agronegócio brasileiro, em especial para a economia nordestina, em destaque para os estados de Alagoas e Pernambuco, com 338 e 264 mil hectares plantados respectivamente. Segundo o último levantamento da produção de cana-de-açúcar, de dezembro de 2015, publicado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015), o Brasil deverá colher cerca de 659 milhões de toneladas na safra 2015/2016, volume este 3,2% maior que o ciclo 2014/2015 (CONAB, 2015).

No Brasil a utilização de insumos nitrogenados na cultura de cana-de-açúcar é relativamente baixo em comparação a outros países com produtividades semelhantes. Na Índia, Estados Unidos da América, Colômbia e Austrália os fertilizantes nitrogenados são adicionados a cultura entre 150 e 200 kg ha<sup>-1</sup> de N ano (BAPTISTA et al., 2014).

No Brasil, em média, são aplicados entre 40 a 60 kg ha<sup>-1</sup> de N na cana-planta e de 80 kg ha<sup>-1</sup> de N nas soqueiras (NUNES JUNIOR et al., 2005), com baixa eficiência de utilização do N pelas plantas nos plantios comerciais (BALASUBRAMANIAN et al., 2004), chegando a 40% de aproveitamento na cana-planta e 70% na cana-soca (FRANCO et al., 2011). A utilização dessa pouca quantidade de fertilizante nitrogenado na cultura da cana-de-açúcar no Brasil, sem haver o esgotamento das reservas de N no solo, Boddey et al. (2004), sugeriu haver bactérias diazotróficas associadas a cultura que poderiam fornecer N a cana-de-açúcar.

Esses micro-organismos benéficos aos vegetais, conhecidos como bactérias promotoras de crescimento em planta (BPCP's), representam uma estratégia nos setores agrícolas e ecológicos, pois garantem ganhos econômicos com menos danos ao meio ambiente (COMPANT et al., 2010).

Com intuito de aumentar a eficiência do uso do N, e, ao mesmo tempo elevar a produtividade da cultura, baixando os custos de produção e, conseqüentemente aumentando a renda do produtor rural, sugere-se a utilização da tecnologia de inoculação com uso de bactérias diazotróficas, que através de vários mecanismos podem promover o crescimento vegetal, como a fixação biológica do nitrogênio (FBN) (URQUIAGA et al., 1992), a redução do ataque de patógenos, a mitigação dos efeitos deletérios dos estresses bióticos e abióticos (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009), pela produção de ácido-indol-3-acético (SUMAN et al., 2001), solubilização de fosfato inorgânico (SHUKLA et al., 2008), produção de sideróforos (BENEDUZI et al. 2013) entre outros.

A presença desses micro-organismos, especialmente na cultura da cana-de-açúcar, tem sido bastante estudada desde a década de 50, quando as primeiras espécies promotoras de crescimento foram isoladas por Baldani et al.(1997). Schultz et al. (2014) estudando a inoculação de bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar, verificaram que houve aumento do potencial produtivo da cultura, indicando uma possível redução da adubação nitrogenada, resultando em lucro para a indústria da cana e na preservação do meio ambiente, por ser um produto alternativo, com baixo custo e menor risco ambiental que o uso dos fertilizantes nitrogenados. Pesquisas de interações entre planta e bactérias diazotróficas evidenciaram que a cana-de-açúcar pode obter quantidades relevantes de N pela FBN quando inoculada com esses micro-organismos (MUTHUKUMARASAMY & REVATHI, 1999).

A contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada na cultura pode chegar a pelo menos 40 kg. ha<sup>-1</sup> de N (URQUIAGA et al., 2012). Variação esta que pode estar correlatada com o genótipo da planta, altitude, temperatura, umidade, e principalmente com as condições da fertilidade do solo. Porém, em se tratando de uma cultura que ocupa milhões de hectares, o suprimento de cerca de 30 % da demanda de N pela FBN certamente trará benefícios ambientais e econômicos para essa cultura (BALDANI et al., 2009; CHAVES et al., 2015).

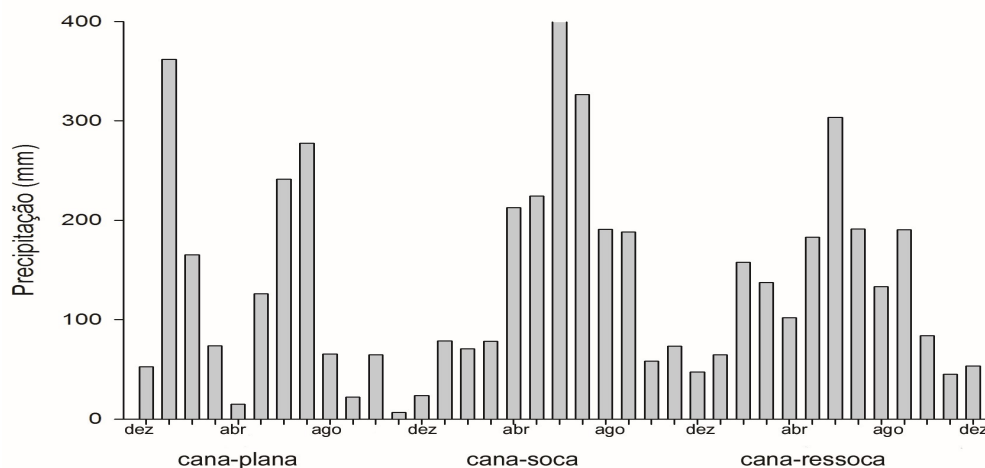
Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de inoculantes microbianos contendo bactérias diazotróficas endofíticas, previamente selecionadas, inoculadas individualmente e em misturas na produtividade, qualidade tecnológica e fixação biológica de N<sub>2</sub> da cana-de-açúcar, variedade RB92579, nos ciclos da cana-planta, soca e ressoca.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local do experimento e caracterização do solo**

O estudo foi realizado na Estação Experimental de Itapirema do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), no município de Goiana, (7°38'33,33" S e 34°56'50.80" O), zona da Mata Norte de Pernambuco. A região apresenta um clima tropical chuvoso (temperatura média anual em torno de 28°C, com verão seco) conforme a classificação de Köppen (Am), com predominância de solos com baixa fertilidade natural. O experimento foi conduzido durante três anos consecutivos e as avaliações foram realizadas aos 11 meses após o plantio para cana-planta, 12 meses após o corte para cana-soca e 12 meses após o segundo

corde para cana-ressoca. As precipitações acumuladas foram de 1.418 mm, 1.950 mm e 1.643 mm para os três ciclos de cultivo avaliados, respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Precipitação mensal registrada no local do estudo durante a permanência do experimento em campo.

O solo da área experimental foi classificado como Espodosolo Cárstico de textura arenosa (EMBRAPA,1999). Foram feitas amostragens do solo nas profundidades de 0–20 e 20–40 cm para a caracterização química e física (Tabelas 1 e 2), seguindo metodologia recomendada pela Embrapa (1997). Previamente ao plantio, o solo foi preparado com aração, gradagem e abertura dos sulcos com profundidade de 30 cm para o plantio.

**Tabela 1.** Características químicas do solo Espodosolo Cárstico, coletado na Estação Experimental de Itapirema do IPA, Goiana-PE.

	Pd cm	pH H <sub>2</sub> O	M.O dag/Kg	P mg/dm <sup>3</sup>	Ca	Mg	Na	K	Al	H	S	CTC	V	m	
														-----Cmol c/dm <sup>3</sup> -----	-----%-----
Cana-planta	0-20	5,70	0,06	3,00	1,10	1,65	0,02	0,03	0,05	2,01	2,8	4,9	58	2	
	20-40	5,60	0,03	2,00	0,90	0,60	0,02	0,02	0,10	1,79	1,5	3,4	45	6	
Cana-ressoca	0-20	5,8	0,08	2,00	1,40	0,45	0,04	0,04	0,00	2,55	1,9	4,5	43	0	
	20-40	5,9	0,04	2,00	1,20	0,70	0,03	0,04	0,00	2,64	2,0	4,6	43	0	

profundidade (Pd)

**Tabela 2.** Características físicas do solo Espodosolo Cárstico, coletado na Estação Experimental de Itapirema do IPA, Goiana-PE.

Pd cm	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )		Composição granulométrica (%)				Argila natural (%)	Grau Floculação (%)	Classe Textural
	Ds	Dp	Areia Grossa	Areia Fina	Silte	Argila			
0-20	1,49	2,65	62	27	1	10	2	80	AF*
20-40	1,52	2,59	72	14	3	11	2	82	AF*

\* Areia Franca, profundidade (Pd), densidade do solo (Ds), densidade da partícula (Dp)

## 2.2 Correção e adubação do solo para cana-planta

Foi realizada calagem no solo um mês antes do plantio, com aplicação a lanço e incorporação ao solo com grade niveladora, de 800 kg ha<sup>-1</sup> de calcário dolomítico (PRNT = 80%), elevando a saturação por base a 60%. A adubação de fundação foi realizada na ocasião do plantio, com base na análise do solo, conforme sugerido por Cavalcanti (2008), com 120 kg.ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma de superfosfato simples e 40 kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O na forma de KCl para todos os tratamentos. Nas parcelas que receberam nitrogênio foi aplicada dose equivalente a 20 kg.ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia. Após 90 dias do plantio, foi realizado uma adubação de cobertura ao lado da linha de plantio com 40kg.ha<sup>-1</sup> de N na forma de ureia, apenas nas parcelas que receberam nitrogênio, e 40 kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O na forma de KCl para todos os tratamentos.

## 2.3 Delineamento experimental

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, em esquema fatorial 10 x 3 com quatro repetições, totalizando 40 parcelas por cultivo. Foram testados 10 tratamentos envolvendo inoculação com bactérias diazotróficas (oito com inoculação e duas testemunhas sem inoculação, sendo uma com adubação nitrogenada e outra sem adubação nitrogenada), em três ciclos de cultivo (cana planta, cana soca e cana ressoca).

Cada parcela foi composta por cinco linhas de 8 m de comprimento, com espaçamento de 1,3 m entre linhas, totalizando 52 m<sup>2</sup>, considerando como área útil as três linhas centrais retirando 1,0 m de cada lado, perfazendo uma área útil de 23,4m<sup>2</sup> para cada parcela. A área total do experimento foi de 3.312m<sup>2</sup>.

## 2.4 Descrição dos tratamentos e preparo dos inoculantes

Os inoculantes foram preparados utilizando três estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas pertencentes à coleção de bactérias obtidas na primeira parte do trabalho, além de um padrão de referência, que foi o inoculante misto proposto pela Embrapa Agrobiologia (OLIVEIRA et al., 2003; 2006), para cana-de-açúcar. As estirpes foram selecionadas de acordo com suas características morfofisiológicas, bioquímicas e moleculares. Visando a utilização de estirpes com maior potencial de promoção de crescimento vegetal, para formulação dos inoculantes bacterianos deste experimento, foram selecionadas aquelas que apresentaram maior atividade de redução de acetileno em meio de cultura, além de capacidade de solubilização de fosfato e produção de ACC deaminase, catalase e ácido-indol-3-acético.

As estirpes selecionadas foram a IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropedicae*); a IPA-CC33 (*Pseudomonas* sp.) e a IPA-CF65 (*Bacillus megaterium*), que foram utilizadas como inoculantes puros e também em misturas, detalhadas adiante nesse texto. O inoculante da EMBRAPA consiste na mistura de cinco estirpes: BR1140 (*Azospirillum amazonense*), BR11175 (*H. seropedicae*), BR11192 (*H. rubrisubalbicans*), BR11284 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e BR11364 (*Burkholderia tropica*).

Todas as estirpes (selecionadas na parte I e estirpes de referências da Embrapa) foram crescidas, separadamente, em Erlenmeyer com meio líquido DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986), com pH específico para cada bactéria conforme Baldani et al. (2014), em agitador rotatório (200 rpm), por 48 horas a 31°C. Após o crescimento, as bactérias foram inoculadas de forma individualizada em condições assépticas em turfa estéril conforme Figueiredo et al. (2013) e distribuídas em sacos de polietileno de média densidade (0,04- 0,09 mm). O produto apresentou  $10^9$  células por grama de turfa. Ao final, os inoculantes foram estocados para maturação a temperatura ambiente (28- 30° C) por sete dias.

Os tratamentos utilizados foram compostos pelas inoculações com as estirpes selecionadas de forma individual e as seguintes misturas:

**Tratamento 1:** IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropedicae*);

**Tratamento 2:** IPA-CC33 (*Pseudomonas* sp.);

**Tratamento 3:** IPA-CF65 (*Bacillus megaterium*);

**Tratamento 4:** Mistura: IPA-CC9 + IPA-CC33 (*H. seropedicae* + *Pseudomonas* sp.);

**Tratamento 5:** Mistura: IPA-CC9 + IPA-CF65 (*H. seropedicae* + *B. megaterium*);

**Tratamento 6:** Mistura: IPA-CC33 + IPA-CF65 (*Pseudomonas* sp.+ *B. megaterium*);

**Tratamento 7:** Mistura: IPA-CC9 + IPA-CC33 + IPA-CF65 (*H. seropedicae* + *Pseudomonas* sp. + *B. megaterium*);

**Tratamento 8:** Mistura Embrapa: *Azospirillum amazonense* (BR1140), *H. seropedicae* (BR11175), *H. rubrisubalbicans* (BR11192), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11284), *Burkholderia tropica* (BR11364);

**Tratamento 9:** TN (testemunha nitrogenada) – sem inoculação e com adubação nitrogenada, conforme recomendação do IPA (CAVALCANTI, 2008);

**Tratamento 10:** TA (testemunha absoluta) – sem inoculação e sem adubação nitrogenada.

Para os tratamentos 1, 2 e 3 (inoculação individual com as estirpes selecionadas na parte I), foram utilizados 50 mL de meio de cultura DYGS com população de  $10^9$  células mL<sup>-1</sup> de cada isolado endofítico e misturado em 150 g de turfa estéril com pH final 6,5. Para os

tratamentos 4, 5 e 6 (inoculação dupla), utilizou-se 25 mL do cultivo bacteriano individual misturado a 75 g de turfa estéril. Para o tratamento 7 (inoculação tripla), utilizou-se 17 mL do cultivo bacteriano para 50g de turfa. Para o tratamento 8 (mistura Embrapa) foi utilizado 10 mL do crescimento bacteriano misturado a 30 g de turfa. A composição final de cada dose do inoculante, foi de 50mL do crescimento bacteriano misturado a 150 g do veículo turfa totalizando um produto final com 200g.

## **2.5 Variedade de cana-de-açúcar utilizada no experimento**

Foi utilizada a variedade RB92579, bastante utilizada nos plantios pernambucanos (BARBOSA et al., 2003), que apresenta maturação média, com alto teor de sacarose e médio teor de fibra. Seguida de boa brotação, alto perfilhamento em cana-planta e soca, bom fechamento de entrelinhas, porte semiereto, ótima colheitabilidade e eficiente no uso dos principais nutrientes. Também apresenta alta produtividade agrícola, florescimento baixo, tolerante ao ataque da broca comum, resistente a ferrugem marrom, escaldadura das folhas e moderadamente resistente ao carvão (SIMÕES NETO et al., 2005).

## **2.6 Processo de inoculação e plantio dos toletes no campo**

Para o plantio, foram utilizadas cana-semente de 10 meses de idade. Os colmos foram cortados com cerca de 30 cm com pelo menos três gemas viáveis selecionadas. Os toletes foram colocados em sacos de ráfia e imersos por 60 min. em 8 reservatórios de capacidade de 310 L cada, contendo o inoculante turfoso diluído na proporção de 200 g do inoculante para 30 L de água, seguindo metodologia descrita por Oliveira et al. (2002) e Reis et al. (2009). Em seguida, os toletes foram imediatamente plantados. Utilizou-se cerca de 14 a 20 gemas por metro linear de sulco, com cerca de 300 colmos por tratamento. Nos ciclos da cana planta e da cana soca, a umidade do solo foi mantida próxima a 80% da capacidade de campo pela aplicação de lâmina de água de acordo com a necessidade da cultura. No ciclo da ressoca, a cana não recebeu irrigação.

## **2.7 Adubação e reinoculação da soqueira**

Após os dois cortes da cana-de-açúcar, foi feita adubação das soqueiras com  $40\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$  na forma de superfosfato simples e  $100\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de  $\text{K}_2\text{O}$  na forma de KCl para todos os tratamentos e  $80\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de N na forma de ureia nas testemunhas nitrogenadas. A reinoculação da segunda soqueira foi realizada com pulverizador manual após o corte, com

jato dirigido à superfície do corte nos devidos tratamentos. Foram utilizados 750 mL de cada inoculante, diluídos na proporção 1:5 e contendo uma concentração final em torno de  $10^6$  a  $10^7$  células mL<sup>-1</sup>.

## 2.8 Colheita e avaliações

Ao término de cada ciclo, onze meses após o plantio para cana-planta, doze meses para cana-soca e ressoca, foram colhidos manualmente e pesados separadamente as folhas secas, as folhas verdes e o colmo de todas as plantas das três linhas centrais de cada tratamento. Sub-amostras foram coletadas para estimativa da matéria seca de cada parte, por meio de pesagens e secagem em estufa de circulação forçada de ar a 65°C até peso constante. Com base nos pesos frescos determinados em campo e nas percentagens de peso seco de cada fração, foram estimadas a produtividade de colmos frescos, matéria seca da parte aérea (folhas secas + folha verdes + colmos) por hectare. As determinações de N foram realizadas segundo o método semimicro-Kjeldahl (NOGUEIRA & SOUZA, 2005). Uma amostra de dez plantas por parcela foi colhida ao acaso para as análises industriais/tecnológicas conforme CONSECANA (2006), realizadas na usina de açúcar e álcool, Santa Teresa no Município de Goiana-PE.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: altura de plantas, diâmetro do colmo, massa seca da parte aérea (obtida pelo somatório da massa seca das folhas e colmo), nitrogênio acumulado nas folhas verdes, produtividade do colmo fresco, tonelada de pol no caldo da cana por hectare (TPH), sólidos solúveis totais (°Brix), fibra, açúcar total recuperável (ATR) e contribuição da fixação biológica do nitrogênio na nutrição da cana-de-açúcar pela técnica de abundância natural do isótopo <sup>15</sup>N.

## 2.9 Estimativa das quantidades de N fixado pela cana-de-açúcar

Para determinar a contribuição da FBN na nutrição da cana-de-açúcar, amostra de 10 folhas-índice (+3) que, conforme Orlando Filho et al. (1980), indicam o estado nutricional das plantas e representam, de acordo com Boddey et al. (2001), o valor médio de enriquecimento de <sup>15</sup>N para a planta inteira, foram colhidas nas fileiras centrais das unidades experimentais, aos 11 meses de cultivo (cana-planta). Folhas de plantas espontâneas, que ocorreram entre as fileiras da cana, e de girassol, de um experimento contíguo sobre a mesma mancha de solo, foram amostradas para servirem de referência para estimativa da FBN. As plantas espontâneas foram identificadas taxonomicamente a nível de espécie. As folhas foram secas em estufa a 65° C com circulação forçada de ar por 72 horas, trituradas em moinho tipo Willey (com



peneiras de 20 mesh) e enviadas para análise de abundância natural do isótopo  $^{15}\text{N}$  por espectrometria de massa no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) em Piracicaba-SP. As abundâncias naturais foram expressas em unidades de  $\delta$ , de acordo com a equação:

$$\delta = (R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}} - 1) \times 1000$$

Onde:  $R_{\text{amostra}}$  e  $R_{\text{padrão}}$  são as razões  $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$  da amostra e do padrão ( $\text{N}_2$  atmosférico).

O percentual de nitrogênio derivado do ar (% N<sub>dda</sub>) foi calculado utilizando a equação:

$$\% \text{N}_{\text{dda}} = [(\delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})} - \delta^{15}\text{N}_{(\text{fixadora})}) / \delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})} - B] \times 100$$

Em que:  $\delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})}$  é o valor médio dos  $\delta^{15}\text{N}$  das plantas referência (espécies espontâneas e girassol),  $\delta^{15}\text{N}_{(\text{fixadora})}$  é o valor dos  $\delta^{15}\text{N}$  da cana-de-açúcar dos diferentes tratamentos e B é o valor de  $\delta^{15}\text{N}$  para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N. Para gramíneas é utilizado o valor de B = 0 ‰ (MORAIS et al., 2012).

## 2.10 Análise dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ), utilizando o programa computacional SAS version 8.02 (SAS Institute 2001).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos três ciclos avaliados, o número de plantas não apresentou diferença estatística entre os tratamentos, variando sempre entre 70 e 80 mil plantas por hectare. Para a altura de plantas, comparando-se os tratamentos dentro de cada cultivo, houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos na cana-ressoca (Tabela 3), porém para os outros cultivos não foi observado diferença entre eles. A maior média de altura na cana-ressoca foi proporcionada pela inoculação com a estirpe IPA-CC33 (*Pseudomonas* sp.) com 2,39 m, 15% maior que a altura das plantas inoculadas com a estirpe IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropecicae*) com

2,07m. Em geral, a cana-soca atingiu maiores médias de altura em relação à cana-planta e à cana-ressoca. A inoculação com o mix da EMBRAPA proporcionou maiores ganhos em altura na cana-soca e cana-planta, com 3,02 e 2,72 m, respectivamente.

Como não houve diferença significativa para o tratamento com nitrogênio (TN) em relação aos demais, pode-se inferir que a inoculação foi tão eficaz quanto a aplicação do nitrogênio. O comportamento quase semelhante da cana-de-açúcar entre a testemunha absoluta e os demais tratamentos pode ser explicado pela existência de bactérias diazotróficas endofíticas e/ou epifíticas nativas na cana-semente e até mesmo na área em estudo. Bologna-Campbell (2007) e Sartori (2010) relatam que a falta de resposta da cana-planta, como observado nesse estudo, pode ser atribuída a vários fatores, entre eles a uma possível FBN, ao vigor radicular, ao estoque de nitrogênio no colmo semente e às condições climáticas. Por outro lado, Franco et al. (2008) relatam que nem todo o nitrogênio aplicado no solo é utilizado pela cultura, podendo ser fixado ao solo, ser perdido por lixiviação para as águas subterrâneas ou volatilizado para a atmosfera.

Em geral, no Brasil observam-se respostas baixas da cana-planta a adubação nitrogenada, principalmente em solos com alta fertilidade natural, provavelmente pela presença de matéria orgânica no solo, que supre boa parte da necessidade da cana e, possivelmente, pela FBN (ROSSETTO et al., 2010; URQUIAGA et al., 2012). Oliveira et al. (2006) constataram que as melhores respostas ao uso de bactérias diazotróficas endofíticas ocorreria em solos de média a baixa fertilidade natural. Contrariando essas observações, no presente estudo não foi possível verificar resposta dos tratamentos com as estirpes diazotróficas nem ao uso de fertilizante nitrogenado, apesar da baixa fertilidade natural e baixo teor de matéria orgânica do solo da área experimental (0,06%) (Tabela 1).

O menor desenvolvimento da cana-ressoca no tratamento nitrogenado (TN) em relação à cana-planta e à cana-soca pode ser devido à inibição da FBN causada pela reaplicação do fertilizante nitrogenado. As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP's) podem promover incremento no crescimento de plantas por causarem a mineralização de nutrientes, disponibilizando-os adequadamente para as espécies vegetais (CLEYET-MAREL et al., 2001). A maior altura de plantas observado para cana-soca, pode ter sido pela possível mineralização de nutrientes durante o ciclo da cana-planta, deixando uma maior disponibilidade de nutrientes para o ciclo seguinte, consequentemente obteve ganhos em altura em relação a cana-planta, mesmo não diferindo estatisticamente. Além disso, as estirpes de BPCP's podem atuar na fixação assimbiótica do nitrogênio a ser disponibilizado para a planta e utilizado em reações metabólicas que levam ao crescimento

vegetal e ainda ocasionar respostas variáveis a depender da efetividade da associação com as espécies vegetais (SPAEPEN et al., 2009).

Em relação ao diâmetro de colmo, foi possível observar diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos na cana-ressoca (Tabela 3). As plantas inoculadas com a estirpe IPA-CC33 (*Pseudomonas* sp.), com a mistura IPA-CC33+IPA-CF65 (*Pseudomonas* sp. + *Bacillus megaterium*) e com o mix da EMBRAPA tiveram diâmetro igual ao das plantas que receberam adubação nitrogenada. A adubação aumentou o diâmetro do colmo em mais de 4,0 mm em relação à testemunha absoluta, representando um incremento de mais de 22%. Resultados contrários foram observados por Oliveira et. al. (2007), ao analisarem o crescimento de três cultivares de cana-de-açúcar, não observaram diferença na primeira época, até aos 135 dias após plantio (DAP), sendo a diferença verificada a partir dos 279 DAP. Após este período, os autores verificaram a tendência de diminuição e estabilização do diâmetro médio do colmo de todos as cultivares. Alvarez & Castro (1999) verificaram que o diâmetro do colmo sofre pouca influência do sistema de manejo, sendo evidenciado que o seu crescimento é mais acentuado no início do ciclo.

De acordo com Cesnik & Miocque (2004), o tamanho médio do diâmetro em cana-de-açúcar é de 2,5 cm, corroborando os valores encontrados neste estudo. Landell & Silva (1995), relataram que entre as variáveis biométricas da cana-de-açúcar, o diâmetro do colmo é o que apresenta a menor variação, e que depende das características da variedade da cana, do número de perfilhos, do espaçamento entre linhas e das condições ambientais. Landell & Silva (2004), descrevem que os componentes de produção determinantes para o potencial de um canavial são comprimento e diâmetro do colmo e número de perfilhos.

**Tabela 3.** Altura e diâmetro do colmo de plantas de cana-de-açúcar, cultivar RB92579, inoculadas (individualmente e em mistura) ou não com bactéria diazotróficas endofíticas, em três anos consecutivos de cultivo na Estação Experimental do IPA-Itapirema (Goiana-PE).

Tratamento	Altura de Planta (m)		
	Cana Planta	Soca	Ressoca
IPA-CC9	2,50±0,09 aB	2,93±0,11 aA	2,07±0,14 bC
IPA-CC33	2,63±0,12 aAB	2,91±0,10 aA	2,39±0,06 aB
IPA-CF65	2,60±0,16 aB	3,00±0,05 aA	2,31±0,04 abB
IPA-CC9 + IPA-CC33	2,70±0,07 aA	2,79±0,13 aA	2,21±0,05 abB
IPA-CC9+IPA-CF65	2,56±0,17 aB	3,00±0,07 aA	2,19±0,08 abB
IPA-CC33+IPA-CF65	2,64±0,21 aA	2,90±0,07 aA	2,27±0,03 abB
IPA-CC9+IPA-CC33+IPA-CF65	2,52±0,13 aB	2,91±0,06 aA	2,16±0,08 abC
EMBRAPA	2,72±0,07 aB	3,02±0,08 aA	2,29±0,05 abC
TN	2,59±0,06 aA	2,87±0,08 aA	2,27±0,12 abB
TA	2,62±0,17 aA	2,85±0,06 aA	2,23±0,09 abB
CV (%)	14,19		
Tratamento	Diâmetro do Colmo (mm)		
	Cana Planta	Soca	Ressoca
IPA-CC9	21,43±3,97 aA	24,11±1,87 aA	19,49±0,54 bcA
IPA-CC33	21,42±4,02 aA	23,42±1,97 aA	20,78±0,57 abA
IPA-CF65	21,10±4,28 aA	22,15±0,96 aA	18,95±0,46 bcA
IPA-CC9 + IPA-CC33	22,71±4,13 aA	22,30±0,89 aA	19,36±0,53 bcA
IPA-CC9+IPA-CF65	21,87±3,61 aA	22,28±0,64 aA	19,89±0,92 bcA
IPA-CC33+IPA-CF65	22,23±3,12 aA	22,60±0,27 aA	20,52±0,79 abA
IPA-CC9+IPA-CC33+IPA-CF65	22,02±3,63 aA	22,63±0,85 aA	19,73±0,95 bcA
EMBRAPA	21,58±4,27 aA	21,93±0,82 aA	20,44±0,29 abA
TN	20,91±4,51 aA	22,42±0,44 aA	22,26±0,57 aA
TA	21,73±3,75 aA	23,39±1,12 aA	18,16±0,54 cA
CV(%)	18,12		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas para cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropedicae*), IPA-CC33 (*Pseudomonas* sp.), IPA-CF65 (*Bacillus megaterium*), EMBRAPA (BR1140 (*Azospirillum amazonense*), BR11175 (*H. seropedicae*), BR11192 (*H. rubrisubalbicans*), BR11284 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e BR11364 (*Burkholderia tropica*); TN (Testemunha nitrogenada- sem inoculação e com adubação nitrogenada); TA (Testemunha absoluta- sem inoculação e sem adubação nitrogenada).

Para o parâmetro massa seca da parte aérea (MSPA), houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os cultivos, apresentando maior massa seca na cana-soca com valores variando de 38,23 Mg.ha<sup>-1</sup> para a testemunha absoluta (TA) a 18,11 Mg.ha<sup>-1</sup> para o tratamento composto pela tríplice mistura IPA-CC9+IPA-CC33+IPA-CF65 (*Herbaspirillum seropedicae*, *Pseudomonas* sp. *Bacillus megaterium*), na cana-ressoca (Tabela 4). Comparando-se os tratamentos dentro de cada cultivo não foi observado diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Porém, para cana-planta o tratamento IPA-CC33+IPA-CF65 apresentou maior valor (25,68 Mg.ha<sup>-1</sup>) e o IPA-CC33 o menor (21,12 Mg.ha<sup>-1</sup>), com um incremento de quase 22% de produção de MSPA. Essa mesma mistura proporcionou incrementos de 16% e 25% respectivamente, em relação a testemunha nitrogenada (TN) a ao tratamento com a tríplice mistura, IPA-CC9+IPA-CC33+IPA-CF65. Para cana-soca o tratamento TA, proporcionou maior acúmulo de MSPA com 38,23 Mg.ha<sup>-1</sup>, 26 % de

incremento em relação a TN. Para cana-ressoca os dados variaram entre 21,88 Mg.ha<sup>-1</sup> para o tratamento IPA-CF65 (*Pseudomonas* sp.) a 18,11 Mg.ha<sup>-1</sup> para o inoculação com o mix da EMBRAPA. Valores de acumulação de biomassa seca da parte aérea de 11,2 e 12,7 Mg.ha<sup>-1</sup> em relação à adubação nitrogenada (100 kg.ha<sup>-1</sup> de N) e ao tratamento inoculado *Burkholderia gladioli*, respectivamente, foram relatadas por Pereira et al. (2013), para a cultivar RB92579, a mesma utilizada nesse estudo. Além disso, estes autores conseguiram acúmulo de biomassa seca frente a inoculação na cana-de-açúcar, quando inoculada com o mix da EMBRAPA proposto por Oliveira et al.(2006) e inoculação individual com *B. gladioli* de 14 e 11,9 Mg.ha<sup>-1</sup> respectivamente, em relação ao controle sem adubação com N e sem inoculação na variedade RB86579.

Schultz et al. (2014), ao utilizarem a inoculação de cinco estirpes de bactérias diazotróficas em duas variedades comerciais de cana-de-açúcar, não observaram diferenças significativas para massa seca da parte aérea em cana-planta e cana-soca, o mesmo encontrado no presente estudo.

Resultados semelhantes foram observados por Dobbelaere et al. (2003), que citam que valores de fitomassa de massa seca não apresentaram diferença significativa entre plantas inoculadas (trigo e milho) e sem inoculação.

**Tabela 4.** Massa seca da parte aérea (MSPA) (folha secas + folhas verdes + colmos), nitrogênio acumulado nas folhas verde (NAFV) e produtividade do colmo fresco de cana-de-açúcar, cultivar RB92579, inoculadas individualmente e em mistura, ou não com bactéria diazotróficas endofíticas, em três anos consecutivos de cultivo na Estação Experimental do IPA-Itapirema(Goiana-PE).

Tratamento	MSPA (Mg.ha <sup>-1</sup> )		
	Cana Planta	Soca	Ressoca
IPA-CC9	22,17±2,81 aB	34,37±1,79 aA	19,26±1,26 aB
IPA-CC33	21,12±1,28 aB	32,04±2,39 aA	20,14±0,72 aB
IPA-CF65	25,65±2,21 aB	35,12±2,84 aA	21,88±1,09 aB
IPA-CC9 + IPA-CC33	24,09±1,45 aB	33,40±1,86 aA	19,29±1,41 aB
IPA-CC9+IPA-CF65	21,72±1,87 aB	33,89±0,77 aA	20,42±0,39 aB
IPA-CC33+IPA-CF65	25,68±3,45 aAB	32,58±3,53 aA	20,03±0,81 aB
IPA-CC9+IPA-CC33+IPA-CF65	20,49±2,01 aB	33,36±2,59 aA	18,11±1,73 aB
EMBRAPA	22,55±1,38 aB	34,84±3,53 aA	19,97±1,08 aB
TN	22,12±0,68 aB	30,26±2,26 aA	19,11±2,16 aB
TA	25,17±3,13 aB	38,23±3,45 aA	18,26±1,14 aB
CV(%)	19,2		
Tratamento	NAFV (Kg.ha <sup>-1</sup> de N total)		
	Cana Planta	Soca	Ressoca
IPA-CC9	55,62±7,45 aA	27,26±1,69 aB	23,55±2,59 aB
IPA-CC33	51,70±3,92 aA	29,68±1,02 aB	29,29±1,21 aB
IPA-CF65	56,67±6,89 aA	38,25±8,63 aAB	27,20±3,45 aB
IPA-CC9 + IPA-CC33	61,80±4,19 aA	29,41±3,04 aB	26,00±2,85 aB
IPA-CC9+IPA-CF65	55,61±4,28 aA	29,14±3,06 aB	23,90±3,31 aB
IPA-CC33+IPA-CF65	67,32±3,11 aA	30,06±4,88 aB	22,36±1,30 aB
IPA-CC9+IPA-CC33+IPA-CF65	53,39±3,66 aA	24,58±1,64 aB	24,56±4,70 aB
EMBRAPA	50,51±4,65 aA	33,85±5,10 aB	26,04±2,02 aB
TN	58,47±5,49 aA	33,74±3,74 aB	20,78±2,71 aB
TA	62,44±10,31 aA	32,71±2,70 aB	23,03±3,44 aB
CV(%)	16,57		
Tratamento	Produtividade Colmo fresco (Mg.ha <sup>-1</sup> )		
	Cana Planta	Soca	Ressoca
IPA-CC9	74,75±8,87 aA	86,75±2,84 aA	37,50±1,84 aB
IPA-CC33	71,25±9,44 aA	76,50±4,64 aA	38,50±1,50 aB
IPA-CF65	83,75±9,80 aA	86,75±4,64 aA	44,75±2,95 aB
IPA-CC9 + IPA-CC33	77,75±7,27 aA	80,50±4,50 aA	41,25±2,66 aB
IPA-CC9+IPA-CF65	67,25±4,73 aA	83,75±3,61 aA	37,75±3,72 aB
IPA-CC33+IPA-CF65	79,56±11,81 aA	82,75±9,88 aA	38,75±2,86 aB
IPA-CC9+IPA-CC33+IPA-CF65	63,02±8,44 aA	77,75±3,32 aA	37,50±3,09 aB
EMBRAPA	77,50±7,41 aA	80,00±7,92 aA	37,50±2,32 aB
TN	72,75±1,03 aA	72,25±5,93 aA	39,00±4,35 aB
TA	78,75±8,05 aA	84,25±6,02 aA	36,00±3,32 aB
CV(%)	23,02		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas para cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropedicae*), IPA-CC33 (*Pseudomonas* sp.), IPA-CF65 (*Bacillus megaterium*), EMBRAPA (BR1140 (*Azospirillum amazonense*), BR11175 (*H. seropedicae*), BR11192 (*H. rubrisubalbicans*), BR11284 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e BR11364 (*Burkholderia tropica*); TN (Testemunha nitrogenada- sem inoculação e com adubação nitrogenada); TA (Testemunha absoluta- sem inoculação e sem adubação nitrogenada).

Em relação ao acúmulo de nitrogênio nas folhas verdes (NAFV), observa-se que houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) apenas entre os cultivos (Tabela 4), porém para os tratamentos dentro de cada cultivo não foi observado efeito significativo. O maior acúmulo de N foi observado para o tratamento IPA-CC33+IPA-CF65 (*Pseudomonas* sp.+ *Bacillus megaterium*), com 67,32 Kg.ha<sup>-1</sup> de N na cana-planta, representando um ganho de quase 15% em relação à testemunha nitrogenada (TN) e 33% em relação ao tratamento com inoculação com a mistura da EMBRAPA. Na cana-soca, a inoculação com a estirpe IPA-CF65 proporcionou maior acúmulo de N, com 38,25 Kg.ha<sup>-1</sup> de N. Para cana-ressoca, o acúmulo máximo de N (29,29 Kg.ha<sup>-1</sup>) foi observado para a cana inoculada com a estirpe IPA-CC33. Os maiores valores de N observado para cana-planta, pode ter sido pelo tipo de inoculação, em que os toletes-sementes permaneceram imersos no inoculante proporcionado maior contato e absorção do produto, diferente para cana-soca que foi pulverizado com jato direcionado no corte imediatamente após a colheita.

Mesmo não mostrando diferenças significativas nos teores de N nas folhas verdes da cana-de-açúcar, para os tratamentos que receberam os inoculantes comparando com a TN que recebeu 60 Kg.ha<sup>-1</sup> de N, os isolados aplicados individualmente ou em misturas foram capazes de contribuir com a nutrição mineral da cana. Resultados semelhantes foram observados por Oliver (2014), estudando a interação de bactérias diazotróficas e doses de N-fertilizante na cultura de cana-de-açúcar, que constataram que doses de 0, 60 e 90 Kg.ha<sup>-1</sup> de N promoveram incrementos não significativos no acúmulo de N na parte aérea da cana-de-açúcar. Silva et al. (2009), ao avaliarem o efeito da utilização de inoculantes compostos pela mistura de estirpes de bactérias diazotróficas com polímeros na fixação de nitrogênio em cana-de-açúcar observaram incrementos não significativos no acúmulo de N na parte aérea de cana-de-açúcar inoculadas com o inoculante composto de cinco estirpes de bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) na ausência de adubação nitrogenada.

Pereira et al. (2013) constataram aumento significativo no teor de N do ponteiro na variedade RB72454 em relação aos tratamentos, testemunha absoluta (sem inoculação e sem adubação com N) e adubação nitrogenada, quando inoculada com o mix com cinco estirpes e com *Herbaspirillum seropedicae*. Esses mesmo autores, obtiveram resultados semelhantes, de não significância, ao descrito nesse estudo em relação à inoculação utilizando a cultivar RB92579.

Em relação à produtividade do colmo fresco, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para o potencial de resposta à inoculação dos tratamentos contendo as bactérias e as testemunhas, e nem entre os três cultivos (Tabela 2), porém com alguns incrementos. Para cana-planta, o tratamento IPA-CF65 promoveu aumento de 20, 11 e 5  $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de colmo fresco em relação aos tratamentos composto pela tríplice inoculação, IPA-CC9+IPA-CC33+IPA-CF65, testemunha nitrogenada (TN) e testemunha absoluta (TA), respectivamente. Na cana-soca e cana-ressoca o tratamento IPA-CF65 manteve o maior rendimento do colmo com 86,75  $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$  e 44,75  $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$  respectivamente, para os dois cultivos sucessivos. Resultados semelhantes foram observados por Pereira et al. (2013), utilizando essa mesma variedade de cana-de-açúcar inoculada com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas, incluindo as cinco estirpes proposta pela EMBRAPA, que também não observaram respostas a inoculação e nem a adubação nitrogenada para a produtividade de colmo fresco.

Lima et al. (2011), estudando a aplicação de inoculantes contendo micro-organismos diazotróficos na produção de cana-de-açúcar, assim como por Schultz et al. (2012), utilizando a variedade de cana-de-açúcar RB72454, verificaram que a inoculação e a adubação nitrogenada não influenciaram a produtividade de colmo para essa variedade.

Oliveira et al. (2003), observaram respostas não significativas, porém com pequenos aumentos na produtividade, à inoculação com bactérias diazotróficas na variedade de cana SP 701143 de origem micropropagada.

Pereira (2011), avaliando a produtividade de colmos de sete variedades de cana-de-açúcar com e sem inoculação, verificaram que a aplicação do inoculante promoveu ganhos significativos de 12,8  $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$  em apenas uma variedade (RB724540) em relação ao tratamento não inoculado. Não foi verificado incrementos significativos de colmos para a variedade RB92579, a mesma utilizada nesse estudo.

Os resultados mostram que a cana-de-açúcar não precisou de adubação nitrogenada nem da inoculação com bactérias capazes de realizarem a FBN *in vitro*. Possivelmente, já havia uma população de bactérias endofíticas nos colmos utilizados como sementes e essa população foi eficiente para suprir as necessidades de N das plantas, seja por meio da FBN ou pelo aumento da capacidade da planta de absorver N do solo.

Observando a produtividade de colmos para os três cultivos, cana-planta e cana-soca mantiveram relativamente a mesma produtividade, seguido de um declínio significativo para a cana-ressoca, que não respondeu à reinoculação e nem à adubação nitrogenada. As plantas inoculadas com a estirpe IPA-CF65 apresentaram a maior produtividade para esse cultivo,



mas não diferindo estatisticamente entre os tratamentos. Em parte, esses resultados corroboram os resultados obtidos por Schultz et al. (2014) para a variedade de cana RB72454, que observaram que a inoculação propiciou incrementos na cana-panta e cana-soca com um declínio de produção de colmo na segunda soca.

Pereira et al. (2013), estudando a resposta de seis variedades de cana-de-açúcar à inoculação com diferentes bactérias diazotróficas, observaram resposta significativa para apenas uma variedade, RB72454, sendo que a testemunha nitrogenada e todos os tratamentos com os inoculantes proporcionaram resposta significativamente maior que a testemunha sem inoculação e sem N.

A inoculação individual e em misturas, assim como o mix de bactérias diazotróficas nos três ciclos de cultivo não promoveram aumento de produtividade de colmos na variedade em estudo (RB92579), podendo haver alguma especificidade entre essa variedade e as bactérias. Reis et al. (2006) relatam que a resposta significativa para a inoculação depende do genótipo de plantas. Tem sido relatado também que a resposta dos genótipos de cana-de-açúcar à inoculação com bactérias diazotróficas, sofre influência direta do ambiente de produção. Oliveira et al. (2006) ao avaliarem a inoculação de bactérias diazotróficas em duas variedades de cana-de-açúcar (SP70-1143 e SP81-3250), verificaram que o rendimento de colmos e a contribuição da FBN foram influenciados tanto pela combinação de estirpes utilizadas, quanto pelo genótipo da planta, tipo de solo e adubação nitrogenada.

Mesmo não havendo diferenças significativas entre os tratamentos, ganhos de até 20  $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , proporcionado pela estirpe IPA-CF65, é bem interessante ao produtor pois tratando-se de uma cultura cultivada em grandes áreas esse ganho em produtividade é bem significativo para melhor rendimento do produtor.

A possível redução da eficiência da inoculação observada na cana-ressoca nos parâmetros até aqui apresentados pode estar associada à redução de N no solo, conforme descrito por Schultz et al. (2014). Esses autores que relatam que o benefício da inoculação está relacionado com a maior eficiência do uso do N disponível no solo pelas plantas, e que o estoque de N no solo diminui à medida que as culturas são colhidas, diminuindo assim a eficiência da inoculação ao longo dos anos. Schultz et al. (2012), avaliando a resposta de duas variedades de cana-de-açúcar (RB72454 e RB867515) à inoculação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada, demonstraram que a inoculação não exerceu nenhuma influência sobre a FBN nas duas variedades de cana estudadas. Os aumentos de rendimentos observados na cana-soca após inoculação pode estar associado aos diferentes efeitos de promoção de crescimento sobre o sistema radicular da cultura (SARAVANAN et al., 2007;

VIDEIRA et al., 2012). Outro possível fator do declínio observado na produtividade do colmo fresco observado para cana-ressoca pode ter ocorrido por períodos de déficit hídrico na fase de crescimento da cultura, uma vez que, nesse ciclo, as plantas dependeram exclusivamente da precipitação pluviométrica.

Um fato interessante é que o acúmulo de N nas folhas verdes, verificado na cana-planta, refletiu em maior produtividade na cana-soca, fato este indo em desacordo com a maioria dos trabalhos com cana-de-açúcar onde relatam que a cana-soca tende a ter menor produção de colmo que a cana-planta.

A possibilidade de se substituir parte do fertilizante nitrogenado pela fixação de nitrogênio por bactérias diazotróficas deve ser considerada, pois esta é econômica e ambientalmente vantajosa (REIS JUNIOR et al., 2000). A não resposta à adubação nitrogenada observada neste estudo, pode sinalizar uma possível redução do uso do adubo nitrogenado na cana-de-açúcar, revertendo-se em lucro para o produtor. Além dessa economia, deve-se considerar o ganho ambiental pela diminuição de N adicionado ao sistema solo-planta, que pode acarretar em poluição por nitrato.

Para o rendimento de açúcar (TPH), a cana-ressoca apresentou valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ) em relação a cana-planta e cana-soca. As plantas inoculadas com a mistura IPA-CC9 + IPA-CC33 produziram 36 % mais açúcar que as plantas da testemunha absoluta (TA) (Tabela 5) que não receberam adubação nitrogenada e nem inoculação, superando as plantas inoculadas com o mix da EMBRAPA em 35 %. No cultivo da cana-planta, o tratamento IPA-CF65, apesar de não diferir significativamente dos demais, proporcionou um ganho de 20 % em relação à testemunha nitrogenada (TA). Essa diferença de  $2 \text{ Mg.pol.ha}^{-1}$  entre esses tratamentos é expressiva, pois em se tratando de uma cultura que é cultivada em grandes áreas, esse ganho resulta em mais lucro para o produtor, podendo até substituir a adubação nitrogenada pela inoculação proposta. Para cana-soca, o tratamento IPA-CC33+IPACF65 promoveu maior produção de açúcar com  $14,23 \text{ Mg.pol.ha}^{-1}$ , representando um ganho de 20% em relação à TN.

Resultados semelhantes foram encontrados por Pereira (2011) que, avaliando a eficiência da inoculação com bactérias diazotróficas quanto a produtividade de colmos e qualidade tecnológica em sete cultivares de cana-de-açúcar, verificou que o tratamento inoculado produziu incrementos na produtividade do açúcar de  $0,8 \text{ Mg.pol.ha}^{-1}$ , para a mesma variedade de cana utilizada neste estudo, porém não diferindo estatisticamente.

Para o teor aparente de sólidos solúveis totais presente no caldo ( $^{\circ}\text{Brix}$ ), para o ano cana-planta os tratamentos IPA-CC9+IPA-CC33, IPA-CC9+IPA-CF65, IPA-CC9+IPA-

CC33+IPA-CF65 e TA apresentaram os maiores valores ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5). Na cana-soca destacou-se o tratamento IPA-CC9+IPA-CF65 e em ressoca não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. O tratamento IPA-CC9+IPA-CF65 apresentou maior média de °Brix com 22,46% na cana-soca, no entanto, não diferenciando significativamente de cana-planta. Segundo Fernandes (1985), o valor ideal para a colheita e estágio de maturação da cana em relação ao °Brix é a partir de 18% durante todo o decorrer da safra. Desta forma, todos os tratamentos nos três cultivos apresentaram médias acima de 20% indicando que foram colhidos maduros e com bom teor de sacarose.

Oliveira (2003) encontrou também resposta significativa no acúmulo de sacarose na variedade de cana-de-açúcar SP70-1011, quando inoculada com mistura de bactérias diazotróficas. Este autor sugeriu que outros mecanismos estão envolvidos na promoção do crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar, além da FBN. Souza et al. (2011), avaliaram o efeito de bactérias diazotróficas nos componentes de produção da cana-de-açúcar e relataram que a inoculação conjunta proporcionou uma maior produtividade devido a uma provável ação da mistura de bactérias, pela competição por espaço, oxigênio e nutrientes com o patógeno.

Resultados positivos da utilização de inoculantes mistos têm sido relatados. Oliveira et al. (2002) testaram a inoculação de sete diferentes combinações de inóculos, usando cinco espécies de bactérias diazotróficas endofíticas (*G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *Burkholderia* sp.) em cana-de-açúcar.

Os teores de fibra variaram com os tratamentos e com os ciclos de cultivo da cana-de-açúcar. Para as plantas que receberam as inoculações com os tratamentos IPA-CC33 (13,34%), IPA-CF65 (13,17%), IPA-CC9+IPA-CC33 (13,21%), IPA-CC9+IPA-CC33+IPA-CF65 (13,62%) e EMBRAPA (12,80%), assim com a TA (13,08%), os teores de fibra foram menores na cana-planta que na ressoca. No primeiro ciclo de cultivo não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as inoculações e/ou adubações, mas na soca as plantas que receberam o mix da EMBRAPA produziram menos fibras que todas as demais. Já na ressoca, esse comportamento foi observado nas canas inoculadas com o isolado IPA-CC9 com teor de fibra de 14,03%.

Mesmo a diferença não sendo significativa entre os tratamentos, o teor de fibra foi acima da média nacional que é de 12,5 % de acordo com o CONSECAN (2006). Resultados semelhantes, de não significância, foram encontrados por Souza et al. (2011) ao avaliarem o efeito de bactérias diazotróficas nos componentes de produção de cana-de-açúcar infectadas pelo raquitismo das soqueiras.

A redução no teor de fibras na cana-de-açúcar é interessante industrialmente se a planta for destinada principalmente à produção de açúcar ou álcool, pois há um maior rendimento na moagem dos colmos. Já para a indústria que usa a biomassa energética para queima, a procura de matérias com maiores quantidades de fibra é mais interessante. Entretanto, segundo Lavanholi (2008), do ponto de vista agrícola, as variedades mais ricas em fibras têm maior resistência ao tombamento, mesmo quando submetidas a despalha a fogo, e geralmente são mais resistentes a penetração de pragas do colmo.

De acordo com Pereira (2011), existe relação indireta entre o °Brix e o teor de fibras, quanto maior o °Brix, menor o teor de fibras. Entretanto, isso não foi observado neste estudo, pois os tratamentos que receberam inoculação, não promoveram a redução do Brix e no teor de fibras, quando comparado a TA.

**Tabela 5.** Tonelada de pol por hectare/ produtividade de açúcar (TPH), sólidos solúveis totais (°Brix) e teores médios de fibra (Fibra) de cana-de-açúcar, cultivar RB92579, inoculadas (individualmente e em mistura) ou não com bactéria diazotróficas endofítica, em três anos consecutivos de cultivo na Estação Experimental do IPA-Itapirema( Goiana-PE).

Tratamento	TPH (Mg. pol. ha <sup>-1</sup> )		
	Cana Planta	Soca	Ressoca
IPA-CC9	11,51±1,30aA	13,75±0,31aA	6,87±0,45abB
IPA-CC33	10,69±1,51aA	12,71±1,04aA	6,72±0,28abB
IPA-CF65	13,11±1,44aA	13,85±0,71aA	8,14±0,61abB
IPA-CC9 + IPA-CC33	12,96±1,32aA	12,97±0,84aA	8,60±0,79aB
IPA-CC9+IPA-CF65	10,90±1,25aB	14,23±0,59aA	6,69±0,59abC
IPA-CC33+IPA-CF65	12,50±1,91aA	13,66±1,54aA	7,21±0,42abB
IPA-CC9+IPA- CC33+IPA-CF65	10,32±1,74aA	12,61±0,49aA	6,65±0,62abB
EMBRAPA	12,34±1,27aA	12,97±1,30aA	6,40±0,35bB
TN	10,90±0,30aA	11,85±1,06aA	6,91±0,78abB
TA	12,55±1,24aA	14,06±0,99aA	6,33±0,73bB
CV(%)	19,17		
Tratamento	°Brix (%)		
	Cana Planta	Soca	Ressoca
IPA-CC9	21,05±0,32 abA	21,20±0,57 bA	20,78±0,27 aA
IPA-CC33	20,16±0,46 bB	21,83±0,48 abA	21,04±0,14 aAb
IPA-CF65	20,87±0,30 abA	21,15±0,21 bA	21,59±0,22 aA
IPA-CC9 + IPA-CC33	21,85±0,20 aA	21,15±0,27 bB	21,47±0,11 aAB
IPA-CC9+IPA-CF65	21,59±0,12 aAB	22,46±0,09 aA	20,94±0,76 aB
IPA-CC33+IPA-CF65	20,99±0,59 abA	21,60±0,20 abA	21,94±0,21 aA
IPA-CC9+IPA- CC33+IPA-CF65	21,73±0,60 aA	21,38±0,27 bA	21,54±0,44 aA
EMBRAPA	21,05±0,30 abA	21,30±0,17 bA	20,96±0,40 aA
TN	20,72±0,37 abA	21,42±0,38 bA	21,07±0,25 aA
TA	21,55±0,16 aA	22,17±0,22 abA	20,76±0,29 aB
CV(%)	3,24		
Tratamento	Fibra (%)		
	Cana Planta	Soca	Ressoca
IPA-CC9	13,57±0,32 aA	13,91±0,16 abA	14,03±0,80 bA
IPA-CC33	13,34±0,29 aB	13,99±0,29 abAB	15,02±0,38 aA
IPA-CF65	13,17±0,35 aB	14,38±0,38 abAB	15,04±0,80 aA
IPA-CC9 + IPA-CC33	13,21±0,21 aB	13,94±0,33 abB	15,28±0,32 aA
IPA-CC9+IPA-CF65	13,36±0,22 aA	14,08±0,29 abA	13,63±0,22 aA
IPA-CC33+IPA-CF65	13,24±0,22 aA	14,22±0,12 abA	14,32±0,73 aA
IPA-CC9+IPA- CC33+IPA-CF65	13,62±0,27 aB	14,67±0,34 aAB	15,64±0,76 aA
EMBRAPA	12,80±0,18 aB	13,58±0,24 bB	15,11±0,86 aA
TN	13,18±0,45 aA	14,00±0,15 abA	14,37±0,75 aA
TA	13,08±0,30 aB	14,01±0,32 abAB	14,59±0,55 aA
CV(%)	6,28		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas para cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropedicae*), IPA-CC33 (*Pseudomonas* sp.), IPA-CF65 (*Bacillus megaterium*), EMBRAPA (BR1140 (*Azospirillum amazonense*), BR11175 (*H. seropedicae*), BR11192 (*H. rubrisubalbicans*), BR11284 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e BR11364 (*Burkholderia tropica*); TN (Testemunha nitrogenada- sem inoculação e com adubação nitrogenada); TA (Testemunha absoluta- sem inoculação e sem adubação nitrogenada).

Na avaliação do rendimento de açúcares totais recuperáveis por tonelada de cana de açúcar (ATR) (Tabela 6) foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos com inoculantes e os cultivos, diferenciando estatisticamente em relação a testemunha absoluta (TA) no ciclo da cana-ressoca. Para os cultivos cana-planta e cana-soca não foram verificadas diferenças entre os tratamentos e as duas testemunhas. O tratamento IPA-CC9+IPA-CC33, em cana-planta, proporcionou maior rendimento ATR, com  $157,9 \text{ Kg.Mg}^{-1} \cdot \text{colmo}$  com quase 10% de ganho em relação ao tratamento IPA-CC33 que apresentou menor média. Para cana-soca o tratamento IPA-CC9+IPA-CC65 proporcionou ganho de 7% em relação ao tratamento IPA-CC9 com menor média observada. Para cana-ressoca, as maiores quantidades de açúcar recuperável foi proporcionada pelo tratamento IPA-CC33+IPA-CF65 com  $174,32 \text{ Kg.Mg}^{-1} \cdot \text{colmo}$ , com ganho de quase  $12 \text{ Kg.Mg}^{-1} \cdot \text{colmo}$  em relação a TA e  $14 \text{ Kg.Mg}^{-1} \cdot \text{colmo}$  em relação ao tratamento EMBRAPA. Estes resultados podem indicar que as vias de síntese de açúcares provavelmente sofreram influência dos tratamentos com o inoculante. Resultado contrário foi observado por Shultz (2012), onde descreve que a inoculação com cinco estirpes de bactérias diazotróficas nos ciclos da cana-planta, cana-soca e ressoca não afetou a síntese dos açúcares, não mostrando diferença entre a inoculação e as testemunhas.

A ATR é o parâmetro, usualmente, utilizado no sistema de pagamento pelas usinas ao produtor. Então há necessidade sempre de conciliar a produtividade com o elevado teor de sacarose na colheita. Este índice é importante para Pernambuco, pois quase 80% da produção é destinada a fabricação de açúcar. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2015), os valores de ATR encontrados nesse trabalho são superiores à média nacional, que foi de  $131,3 \text{ Kg.Mg}^{-1} \cdot \text{colmo}$  para a safra de 2014/2015.

**Tabela 6.** Açúcar total recuperável (ATR) de cana-de-açúcar, cultivar RB92579, inoculadas individualmente e em mistura, ou não com bactéria diazotróficas endofítica, em três anos consecutivos de cultivo na Estação Experimental do IPA-Itapirema( Goiana-PE).

Tratamento	ATR (kg.Mg <sup>-1</sup> .colmos)		
	Cana Planta	Soca	Ressoca
IPA-CC9	148,99±2,08 abcB	164,58±7,10 bA	169,21±3,67 abA
IPA-CC33	144,25±4,04 cB	172,58±4,07 abA	163,60±2,51 abA
IPA-CF65	150,19±2,70 abcB	166,01±1,21 abA	169,27±1,00 abA
IPA-CC9 + IPA-CC33	157,90±1,46 aB	166,89±3,00 abA	168,19±1,09 abA
IPA-CC9+IPA-CF65	155,23±1,71 abB	176,37±0,30 aA	166,24±5,55 abA
IPA-CC33+IPA-CF65	150,49±4,77abcB	173,94±2,54 abA	174,32±4,16 aA
IPA-CC9+IPA- CC33+IPA-CF65	154,69±5,27 abcB	170,81±2,05 abA	166,23±4,21 abAB
EMBRAPA	152,19±3,06 abcC	168,94±2,47 abA	160,58±1,27 bB
TN	146,09±2,05 bcB	170,90±2,37 abA	165,27±1,71 abA
TA	153,69±2,24 abcC	172,90±1,40 abA	162,90±4,09 bB
CV(%)	3,92		

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula nas linhas para cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropedicae*), IPA-CC33 (*Pseudomonas sp.*), IPA-CF65 (*Bacillus megaterium*), EMBRAPA (BR1140 (*Azospirillum amazonense*), BR11175 (*H. seropedicae*), BR11192 (*H. rubrisubalbicans*), BR11284 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e BR11364 (*Burkholderia tropica*); TN (Testemunha nitrogenada- sem inoculação e com adubação nitrogenada); TA (Testemunha absoluta- sem inoculação e sem adubação nitrogenada).

Estudos sobre a influência da inoculação em relação às características tecnológicas da cana-de-açúcar ainda são pouco discutidos. Essas diferenças precisam ser melhor exploradas para melhoria das discussões futuras, como já sinalizada por Schultz (2012).

Em todo o Brasil, a cana-de-açúcar tem sido remunerada por seus índices qualitativos, de modo que, quanto melhor a qualidade da matéria prima, maior é o preço pago por tonelada de colmos (FARIAS et al., 2009). Para os parâmetros tecnológicos utilizados neste trabalho foi observado que a inoculação com bactérias diazotróficas promoveu ganhos mesmo que não significativos.

De uma maneira geral, para o ciclo da cana-planta, tanto as plantas espontâneas colhidas no experimento, como o girassol coletado no experimento contíguo, apresentaram valores de <sup>15</sup>N maiores que as plantas de cana-de-açúcar. Em geral, essas plantas utilizadas como controle para estimativa da FBN apresentaram enriquecimento maior que 2 ‰ em relação às canas, atendendo a uma das exigências para utilização da técnica de abundância natural para estimar a contribuição da FBN, como descrito por Högberg (1997). Não foi possível a coleta das plantas controle em todos os blocos, o que impossibilitou uma comparação estatística entre os sinais das plantas referência e os sinais da cana nos diferentes tratamentos. Entretanto, a análise isotópica da abundância natural de <sup>15</sup>N nas folhas da cana-de-açúcar, aos 11 meses, demonstrou que não houve diferenças significativas (p>0,05) entre os tratamentos (Tabela 7).

A principal restrição ao uso da metodologia da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  para estimativa da FBN em cana-de-açúcar é a dificuldade em encontrar uma planta referência apropriada. A planta referência é utilizada para estimar o sinal isotópico do N do solo disponível para as plantas. Desta forma, é importante selecionar uma planta controle que explore um volume de solo e absorva nutrientes em num padrão de tempo semelhante ao da planta alvo (espécie fixadora), ou seja, é importante que as plantas controle e alvo tenham fenologias e hábitos de crescimento semelhantes (FREITAS et al., 2010). Sendo assim, essa condição é dificilmente atendida em estudos com cana-de-açúcar. Por essa razão, foram feitas várias simulações de cálculo do % Ndda, utilizando cada espécie referência separadamente e também a média de  $\delta^{15}\text{N}$  de todas (Tabela 7).

**Tabela 7.** Valores de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) de folhas +3 (folhas verde) de cana-de-açúcar, cultivar RB92579, e de plantas não fixadoras de N e estimativas da proporção de N derivado da atmosfera (%Ndda) em cana-de-açúcar inoculada ou não com bactérias diazotróficas endofíticas cultivada na Estação Experimental do IPA-Itapirema Goiana-PE), aos 11 meses após o plantio durante o ciclo da cana-planta.

TRATAMENTO	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)*	%Ndda <sup>1</sup>	%Ndda <sup>2</sup>	%Ndda <sup>3</sup>	%Ndda <sup>4</sup>
IPA-CC9	2,64 a	46,08	26,15	54,56	42,26
IPA-CC33	2,76 a	43,63	22,80	52,50	39,64
IPA-CF65	2,96 a	39,54	17,20	49,09	35,27
IPA-CC9+IPA-CC33	3,17 a	35,25	11,33	45,44	30,67
IPA-CC9+IPA-CF65	2,78 a	43,22	22,24	52,15	39,20
IPA-CC33+IPA-CF65	2,93 a	40,16	18,04	49,57	35,92
IPA-CC9+IPA-CC33+IPA-CF65	2,48 a	49,35	30,63	57,31	45,76
EMBRAPA	3,41 a	30,35	4,62	41,31	25,42
TN	2,58 a	47,30	27,83	55,59	43,58
TA	2,49 a	49,14	30,35	57,14	45,54
Jurubeba ( <i>Solanum paniculatum</i> ) - Solanaceae	4,90	-	-	-	-
Xanana ( <i>Tumera ulmifolia</i> ) - Tumeraceae-	3,58	-	-	-	-
Girassol ( <i>Helianthus annuus</i> ) - Asteraceae	5,81	-	-	-	-
CV	27,12 %				

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> Calculado utilizando *S. paniculatum* como planta referência

<sup>2</sup> Calculado utilizando *T. ulmifolia* como planta referência

<sup>3</sup> Calculado utilizando girassol como planta referência

<sup>4</sup> Calculado utilizando a média das referências

Os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  nas plantas controle variaram entre 3,58 e 5,81 ‰, que são valores típicos para plantas não fixadoras em solos da Zona da Mata de Pernambuco (FREITAS et al, 2015). Comparando os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  da cana-de-açúcar com os valores de



*Tumera ulmifolia*, verifica-se que a contribuição da FBN variou entre 4,6%, para as canas que receberam inoculação com o coquetel da EMBRAPA, a 30,63% para aquelas que receberam a tríplice inoculação (tratamento, IPA-CC9+IPPA-CC33+IPACF65). Utilizando o girassol como referência, as estimativas da FBN na cana são mais elevadas, variando entre 41,31 % a 57,31 %. As simulações utilizando como planta referência *Solanum paniculatum*, assim como utilizando a média de todas as referências se situaram entre esses valores extremos. Nenhuma das espécies referência é gramínea, significando que apresentam um sistema radicular bastante diferente do sistema de raízes fasciculadas da cana-de-açúcar, explorando de maneira diferenciada o solo e podendo apresentar sinal isotópico que não representa exatamente o sinal do N do solo disponível para a cana. Além disso, são espécies que não apresentam ciclo de vida tão longo quanto a cana. Esses fatos podem ocasionar que as estimativas de % N<sub>dda</sub> apresentadas estejam subestimando a FBN na cana, já que essa espécie deve estar explorando camadas de solo mais profundas que as espécies referência e essas camadas são enriquecidas isotopicamente (MARTINELLI et al., 2009). É provável que as simulações utilizando o girassol se aproximem mais do valor real da contribuição da FBN para a nutrição nitrogenada da cana, pois essa espécie é a que tem o maior porte e raízes mais profundas.

Mesmo utilizando os valores de %N<sub>dda</sub> obtidos da média das plantas referência, que podem ser considerados bastante conservadores, observa-se que os mesmos estão dentro da faixa de valores comumente relatados para a cana-de-açúcar cultivada no Brasil, que se situaram em torno de 40 % (XAVIER, 2006). Mesmo sem diferença estatística entre os tratamentos, é bastante consistente o comportamento das plantas inoculadas com o coquetel IPA-CC9+IPPA-CC33+IPACF65, que apresentou os maiores valores de FBN, e daquelas inoculadas com o coquetel da EMBRAPA, com as menores contribuições de N atmosférico. Além disso, mais uma vez a cana se mostrou insensível à adubação nitrogenada, que, se por um lado não propiciou melhor desenvolvimento da planta, por outro também não afetou negativamente a atividade diazotróficas das bactérias associadas.

#### 4 CONCLUSÕES

A estirpe IPA-CC33 (*Pseudomonas* sp.) promoveu aumento significativo no diâmetro do colmo, para cana-ressoca.

A dupla inoculação com o tratamento IPA-CC9+IPACF-65 (*Herbaspirillum seropedicae* + *Bacillus megaterium*) promoveu ganhos significativos para o rendimento de açúcar na cana-ressoca.

O tratamento IPA-CF65 (*Bacillus megaterium*), promoveu os maiores ganhos de produtividade nos três cultivos (cana-planta, cana-soca e cana-ressoca), apesar de não diferir estatisticamente dos outros tratamentos. Esse incremento na produtividade na cultura da cana-de-açúcar pode representar uma economia significativa para o produtor, assim como trazendo benefícios ao meio ambiente.

A dose de 60 kg.ha<sup>-1</sup> de N aplicada do fertilizante nitrogenado não contribuiu na otimização da cana em nenhum parâmetro avaliado, inferindo baixo custo econômico e ecológico com a aplicação dos inoculantes bacterianos.

Os aumentos de rendimentos observados na cana-soca após inoculação pode estar associado aos diferentes efeitos de promoção de crescimento sobre o sistema radicular da cultura

Os valores de açúcar total recuperável (ATR) encontrados foi superior a média nacional (131,3 Kg.Mg<sup>-1</sup>.colmo) para a safra de 2014/2015.

Futuras pesquisas deverão ser realizadas para avaliar o efeito dessas bactérias diazotróficas endofíticas em combinação com outros genótipos de cana-de-açúcar. Isso propiciará bactérias candidatas para a formulação de inoculantes microbianos e uma melhor compreensão das inter-relações solo-planta-bactérias.

## 5 REFERÊNCIAS

ALVAREZ, A. A.; CASTRO, P. R. C. Crescimento da parte aérea de cana crua e queimada. *Scientia Agrícola*, v.56, n.4, p.1069-1079, suplemento, 1999.

BALASUBRAMANIAN, V.; ALVES, B.; AULAKH, M.; BEKUNDA, M.; CAI, Z.; DRINKWATER, L.; MUGENDI, D.; KESSEL, C. VAN; OENEMA O. Crop, environmental, and management factors affecting nitrogen use efficiency. In: MOSIER, A.R.; SYERS, J.K.; FRENEY, J. (Ed.). **Agriculture and the nitrogen cycle**. Washington: Scientific Committee on Problems of the Environment, p.19-33, 2004.

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

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol Biochem*, v. 29, p.911–922, 1997.

BALDANI, J.I.; TEIXEIRA, K.R.S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F.L.; HEMERLY, A.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; NOGUEIRA, E.M.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDOTTO, L.E. B.; SOARES, L.H.B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V.L.D.; CARVALHO, T.L.G.; ALVES, B.J.R.; JAMES, E.K.; JANTALIA, C.P.; FERREIRA, P.C.G.; VIDAL, M.S.; BODDEY, R.M. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família da Poaceae (antiga Gramineae). In: RIBEIRO, M.R.; NASCIMENTO, C.W.; RIBEIRO FILHO, M.R.; CANTALICE, J.R.B., eds. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v.6, p.203-271, 2009.

BAPTISTA, R.B.; DE MORAIS, R. F.; LEITE, J.M.; SCHULTZ, N.; ALVES, B.J. R.; BOBBEY, R.M.; URQUIAGA, S. Variations in the <sup>15</sup>N natural abundance of plant-available N with soil depth: Their influence on estimates of contributions of biological N<sub>2</sub> fixation to sugarcane. *Applied Soil Ecology*, v.73, p.124-129, 2014.

BARBOSA, G. V. S.; SOUSA, A. J. R.; ROCHA, A. M. C.; SANTOS, A. V. P.; BARRETO, C. G. R.; MOURA FILHO, E. J. S.; SOUZA, G. J. L.; FERREIRA, J. L. C.; SOARES, L.; CRUZ, M. M.; FERREIRA, P. V.; SILVA, W. C. M. **Três novas variedades RB de cana-de-açúcar**. Boletim Técnico, PMGCA, n. 2, Alagoas, 2003, 18 p.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L.M.P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. *Applied Soil Ecolog*, v.63, p.94–104, 2013.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, v. 252, p. 139-149, 2004.

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of <sup>15</sup>N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation

to sugar cane and others grasses. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.28, p.889-895, 2001.

BOLOGNA-CAMPBELL, I. **Balanço de nitrogênio e enxofre no sistema solocana-de-açúcar no ciclo de cana-planta**. 2007. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

FARIAS, C.H.A.; FERNANDES, P.D.; GHEYI, H.R.; NETO J.D. Qualidade industrial de cana-de-açúcar sob irrigação e adubação com zinco, em Tabuleiro Costeiro paraibano. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.13, n.4, p.419-428, 2009

CAVALCANTI, F. J. A. (Coord.). **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco: 2ª aproximação**. 3 ed. Recife: Instituto Agrônomo de Pernambuco- IPA, 212 p, 2008.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da Cana-de-açúcar**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004, 307p.

CHAVES, V. A.; SANTOS, S.G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R.C.; REIS, V. M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.39, p 1595-1602, 2015.

CLEYET-MAREL, J.C.; LARCHER, M.; BERTRAND, H.; RAPIOR, S.; PINOCHET, X. Plant growth enhancement by rhizobacteria. In: Morot-Gaudry J.F (ed.) **Nitrogen assimilation by plants**. Physiological, biochemical and molecular aspects. Plymouth: Science Publishers, 184-197p, 2001.

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

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>> Acesso em: 17 dezembro de 2015.

CONSECANA. Conselho dos produtores de cana-de-açúcar, açúcar e álcool do estado de São Paulo. **Manual de instruções**. 5ed. Consecana-SP, Piracicaba, 112p, 2006.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107 – 149, 2003.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília: Embrapa Produção da Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999, 412p.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Manual de Métodos de Análise de Solo**. 2 ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1997, 212p.

FERNANDES, A. C. Autorização da colheita da cana-de-açúcar. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA “JAIME ROCHA DE ALMEIDA”, **Anais**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, p.12-21, 1985

FIGUEIREDO, M. V. B.; ANTUNES, J.E.L. ; RODRIGUES, A. C. ; GOUVEIA, C. K. ; MORAES, R. L. C. DE ; OLIVEIRA, JOSÉ DE PAULA ; et. al. Fixação biológica de nitrogênio (FBN): bactérias diazotróficas para uma agricultura sustentável. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; GOMES, E.W.F. ; ROSA, R. C. T. et al. (Org.). **Manual de práticas laboratoriais: um guia para pesquisa**. 1ed. Recife: CCS Gráfica e Editora, v. 1, p. 33-88, 2013.

FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, E.C.A.; TRIVELIN, P.C.O. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, v. 121, p. 29-41, 2011.

FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OTTO, R. Aproveitamento pela cana-de-açúcar da adubação nitrogenada de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. especial, p. 2763-2770, 2008.

FREITAS, A.D. S., SAMPAIO, E.V.S.B., SANTOS, C.E.R.S. Abundância natural do  $^{15}\text{N}$  para quantificação da fixação biológica do nitrogênio em plantas, in: Figueiredo, M.V.B., Burity, H.M., Oliveira, J.P., Santos, C.E.R.S, Stamford, N.P. (Eds.), **Biotecnologia Aplicada à Agricultura - Textos de Apoio e Protocolos Experimentais**. Embrapa Informação Tecnológica; Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Brasília, 2010, 505-517p.

FREITAS, A.D.S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; RAMOS, A. P. S.; BARBOSA, M. R. V.; LYRA, R. P.; ARAÚJO, E. L. Nitrogen isotopic patterns in tropical forests along a rainfall gradient in Northeast Brazil. **Plant and Soil**, v.391, p.109-122, 2015.

HÖGBERG, P.  $^{15}\text{N}$  natural abundance in soil-plant systems. **New Phytologist**, v.137, p.179-203, 1997.

LANDELL, M. G. A.; SILVA, M. A. As estratégias de seleção da cana em desenvolvimento no Brasil. **Visão agrícola**. Piracicaba: USP - Esalq, v.jan.-jun., 2004, 18-23p.

LANDELL, M. G. A.; SILVA, M. A. **Manual do experimentador: melhoramento da cana-de-açúcar**. In: **Metodologia de Experimentação: ensaios de competição em cana-de-açúcar**. Pindorama: Instituto Agrônomo, 1995.

LAVANHOLI, M. G. D. P. Qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de açúcar e álcool. In: DINARDO-MIRANDA, L. L. D.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. (Ed.). **Canade-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, p. 697-722, 2008.

LIMA, R.C.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; JUNIOR, R.A.; FONSECA, L. Caracterização Fenotípica de Bactérias Diazotróficas Endofíticas Isoladas de Cana de Açúcar. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, Medellín, v.64, p.5803-5813, 2011.

LUGTENBERG, B., KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63: p.541-556. 2009

MARTINELLI, L.A.; OMETTO, J.P.H.B.; FERRAZ, E.S.; VICTORIA, R.L.; CAMARGO, P.B.; MOREIRA, M.Z. **Desvendando Questões Ambientais com Isótopos Estáveis**. Oficina de Textos. 2009, 114p.

MORAIS, R. F.; QUESADA, D. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant and Soil**, v.349, p.1-12, 2012.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI. Diazotrophic associations in sugar cane cultivation in South India. **Tropical Agriculture**, v. 76, n.3, p. 171-178, 1999.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de laboratório: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos-SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005, p.313.

NUNES JUNIOR, D.; PINTO, R.S.A.; TRENTO, F.E.; ELIAS, A.I. **Indicadores agrícolas do setor canavieiro: safra 2003/2004**. Ribeirão Preto: Idea, 2005. 111p.

OLIVEIRA, A. L. M. **Inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em duas variedades de cana-de-açúcar sob condições de campo**. 2003,123 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo), UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2003.

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

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

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

OLIVEIRA, R.A.; DAROS, E.; ZAMBON, J.L.C.; WEBER, H.; IDO, O.T.; BESPALHOK-FILHO, J.C.; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C.; SILVA, D.K.T. Área foliar em três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.37, n.2, p.71-76, 2007.

OLIVER, R. **Interação entre bactérias diazotróficas e doses de n-fertilizante na cultura da cana-de-açúcar**.2014, 61f .Dissertação, (Mestrado em Agronomia) Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP. São Paulo. Botucatu, 2014.

ORLANDO FILHO, J.; HAAG, H.P.; ZAMBELLO JR, E. Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função de idade em solos do Estado de São Paulo. **Boletim Técnico Planalsucar**, Piracicaba, v.2, n.1, p.1-128, 1980.

PEREIRA, W. **Produtividade e Qualidade Tecnológica da Cana-de-açúcar Inoculada com Bactérias Diazotróficas**. 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em agronomia). UFRRJ. Rio de Janeiro. Seropédica, 2011

PEREIRA, W.; LEITE, J.M.; HIPÓLITO, G.S.; SANTOS, C.L.R.; REIS, V.M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, n.2, p.363-370,2013.

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

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. **Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana de açúcar**. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2009b. 4p. (Circular Técnica 30).

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Org.) **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. Cap. 6, p. 153-174.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

ROSSETTO, R.; CANTARELLA, H.; DIAS, F.L.F.; VITTI, A.C.; TAVARES, S. Canade-açúcar. In: PROCHNOW, L.I.; CASARIN, V.; STIPP, S.R. Boas práticas para uso eficientes de fertilizantes. Piracicaba: **International Plant Nutrition Institute**, p. 161-230, 2010.

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

SARTORI, R.H. **Eficiência do uso de nitrogênio e enxofre pela cana-de-açúcar (primeira e segunda rebrota) em sistema conservacionista (sem queima)**. 2010. 112 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

**SAS Institute**. User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC. 2001.

SCHULTZ, N. **Fixação Biológica de nitrogênio associada à cultura de cana de açúcar: eficiência e contribuição da inoculação com bactérias diazotróficas**. 2012. 119f. Tese (Doutorado em Agronomia Ciência do solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

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

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F. DA; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.38, n.2, p. 407-414, 2014.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N<sub>2</sub>-Fixation in Field Settings - Estimations Based on Natural N-15 Abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.13, n.6, p.699-756, 1986.

SHUKLA, S.K.; YADAV, R.L.; SUMAN, A.; SINGH, P.N. Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in *udic ustochrept* soil. **Soil and Tillage Research**, v.99, p.158-168, 2008.

SILVA, M. F.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; REIS, V. M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 11, p. 1437-1443, 2009.

SIMÕES NETO, D. E.; MELO, L. J.O. T. **Lançamentos de novas variedades RB de cana-de-açúcar**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. 28p.

SOUZA, S.R.; DAROS, E.; FRAGOSO, R. B.; RUARO, L. Efeito de bactérias diazotróficas nos componentes de produção de cana-de-açúcar infectadas pelo raquitismo das soqueiras. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, n.4, p.21-27, 2011.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. **Advances in Botanical Research** v.51, p. 283-320, 2009.

SUMAN, A.; SHASANY, A.K.; SINGH, M.; SHAHI, H.N.; GAUR, A.; KHANUJA, S.P.S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.39-45, 2001.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of Nitrogen Fixation to Sugar Cane: Nitrogen-15 and Nitrogen-Balance Estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v.56, p.105-114, 1992

URQUIAGA, S.; XAVIER, R.P.; MORAIS, R.F.; BATISTA, R.B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J.M.; SÁ, J.M.; BARBOSA, K.P.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data for the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v.356, p.5-21, 2012

VIDEIRA, S.S.; OLIVEIRA, D.M.; MORAIS, R.F.; BORGES, W.L.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, v.356, p.51-66, 2012.

XAVIER, R. P.. **Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio na Produção Sustentável da Cultura de Cana-de-Açúcar**. Tese 2006,83f. (Doutorado em Fitotecnia) Instituto De Agronomia, UFRR. Rio de Janeiro, Seropédica 2006.



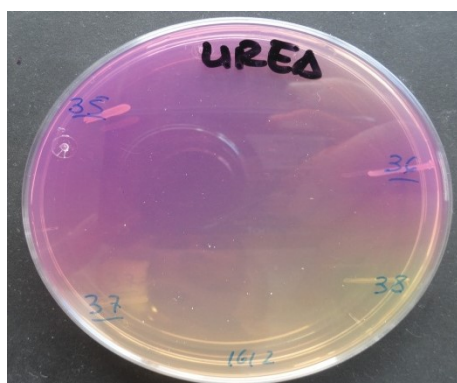
## APÊNDICES

**APÊNDICE A** – Local de isolamento, meio de cultura utilizado no isolamento, meio de purificação e tempo de crescimento dos isolados bacterianos de cana-de-açúcar.

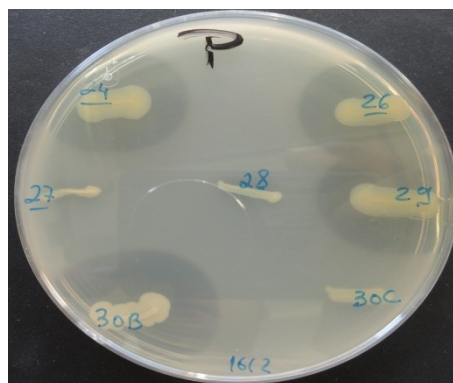
Isolado	Local de isolamento C = colmo; F = folha	Meio de cultura	Meio de Purificação – (pH)	Tempo de Crescimento (horas)
IPA-CC1A	C	JNFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CC1B	C	JNFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CC3A	C	JNFb	Batata – 6,74	48h
IPA-CC3B	C	JNFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC4	C	JNFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC6	C	JNFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CC7	C	JNFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC8	C	JNFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC9	C	JNFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC10	C	JNFb	Batata – 6,73	72h
IPA-CC11	C	JNFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CF13A	F	JNFb	Batata – 6,73	72h
IPA-CF14	F	JNFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CF16	F	JNFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CF18	F	JNFb	Batata – 6,73	72h
IPA-CF19	F	JNFb	Batata – 6,73	96h
IPA-CF20	F	JNFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CF21	F	JNFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC22A	C	NFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CC22B	C	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC23	C	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC24	C	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC25	C	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC26	C	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC27	C	NFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CC28	C	NFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CC29	C	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC30B	C	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC30C	C	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC31	C	NFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CC32	C	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC33	C	NFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CC34	C	NFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CC35	C	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC36	C	NFb	Batata – 6,73	168h
IPA-CC37	C	NFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CC38	C	NFb	Batata – 6,73	96h
IPA-CF39	F	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CF41	F	NFb	Batata – 6,73	24h

continua...

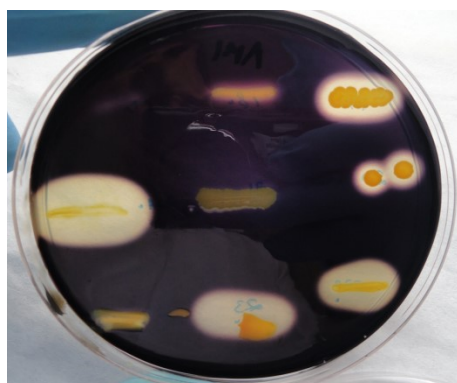
<b>Isolado</b>	<b>Local de isolamento</b> C = colmo; F = folha	<b>Meio de cultura</b>	<b>Meio de Purificação – (pH)</b>	<b>Tempo de Crescimento (horas)</b>
IPA-CF42	F	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CF43	F	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CF44	F	NFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CF45A	F	NFb	Batata – 6,73	48h
IPA-CF45B	F	NFb	Batata – 6,74	48h
IPA-CF46	F	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CF47	F	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CF48	F	NFb	Batata – 6,73	24h
IPA-CC49	C	LGI-P	Batata-P – 5,5	24h
IPA-CC51	C	LGI-P	Batata-P – 5,5	24h
IPA-CC52	C	LGI-P	Batata-P – 5,5	24h
IPA-CC55	C	LGI-P	Batata-P – 5,5	48h
IPA-CC56	C	LGI-P	Batata-P – 5,5	24h
IPA-CF61	F	LGI-P	Batata-P – 5,5	48h
IPA-CF62	F	LGI-P	Batata-P – 5,5	216h
IPA-CF65	F	LGI-P	Batata-P – 5,5	24h
IPA-CF66	F	NFb	Batata – 6,73	24h



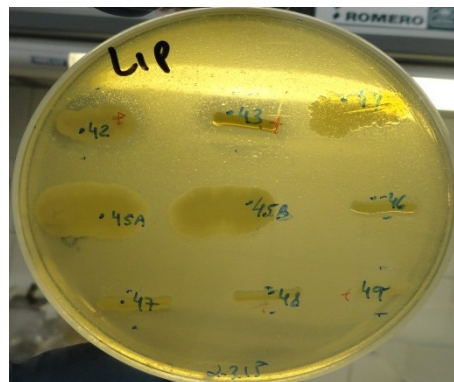
**APÊNDICE B** – Teste de Urease –  
Presença de halo róseo ao redor da colônia, indica a positividade do teste.



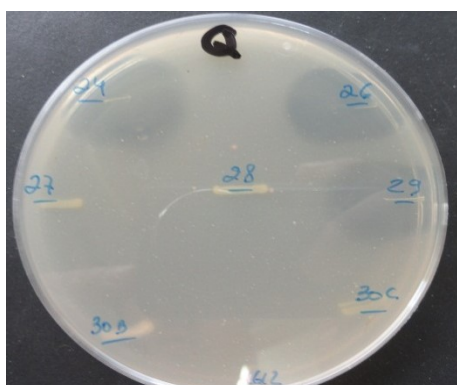
**APÊNDICE C** – Teste de Protease –  
Presença de halo transparente ao redor da colônia indica a positividade do teste.



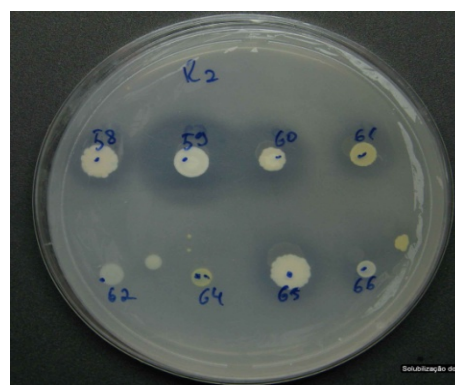
**APÊNDICE D** – Teste de Amilase –  
Presença de halo transparente ao redor da colônia, após revelação com lugol, indica teste positivo.



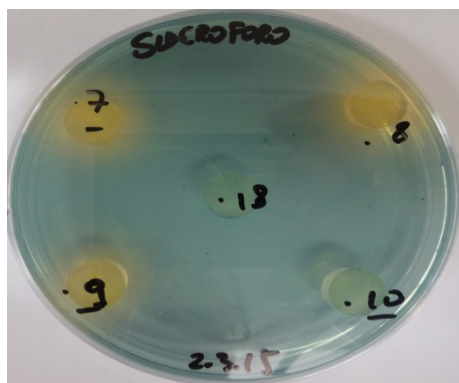
**APÊNDICE E** – Teste de Lipase –  
Presença de halo transparente ao redor da colônia, indica teste positivo.



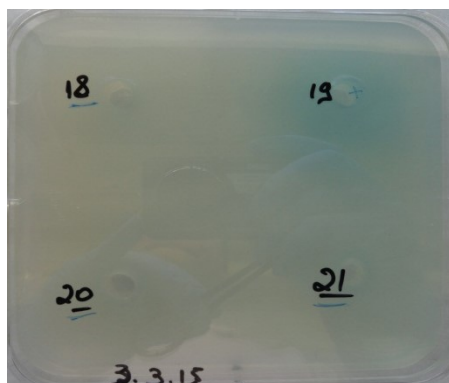
**APÊNDICE F** – Teste de degradação da Quitina – Presença de halo transparente ao redor da colônia, indica teste positivo.



**APÊNDICE G** - Teste de solubilização do fosfato. Presença de halo transparente ao redor das colônias indica teste positivo.



**APÊNDICE H** - Teste de sideróforo. Presença de halo amarelo ao redor da colônia, indica teste positivo.



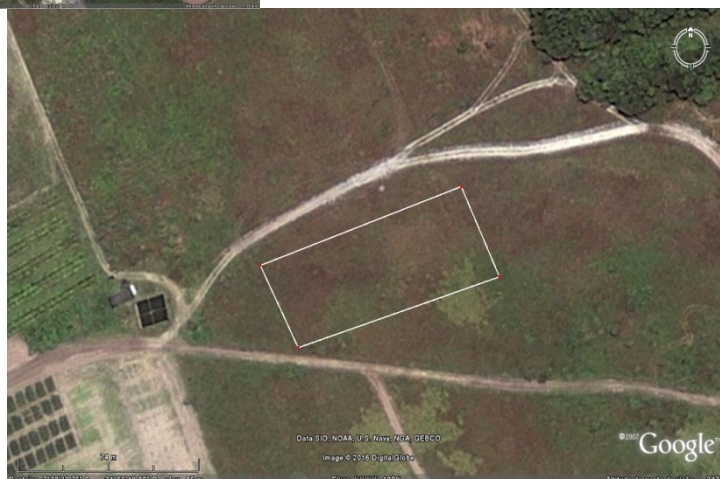
**APÊNDICE I** - Teste de AHL. Presença de halo azul ao redor do poço contendo o isolado, indica teste positivo.



**APÊNDICE J** - Teste de catalase, a formação de bolhas no detalhe da foto indica teste positivo.



**APÊNDICE K** - Teste de gelatinase. Para os dois primeiros tubos, teste negativo, para o último tubo no inferior da figura, teste positivo.



APÊNDICE L – Vista do local do experimento de campo. Estação Experimental de Itapirema do Instituto Agrônômico de Pernambuco, Goiana-PE. Fonte Google Earth.



CROQUI COM SORTEIO DAS PARCELAS



1. IPA-CC9 (*Herbaspirillum seropedicae*);
2. IPA-CC33 (*Pseudomonas* sp.);
3. IPA-CF65 (*Bacillus megaterium*);
4. Mistura: IPA-CC9 + IPA-CC33 (*H. seropedicae* + *Pseudomonas* sp.);
5. Mistura: IPA-CC9 + IPA-CF65 (*H. seropedicae* + *B. megaterium*);
6. Mistura: IPA-CC33 + IPA-CF65 (*Pseudomonas* sp. + *B. megaterium*);
7. Mistura: IPA-CC9 + IPA-CC33 + IPA-CF65 (*H. seropedicae* + *Pseudomonas* sp. + *B. megaterium*);
8. Mistura EMBRAPA: *Azospirillum amazonense* (BR1140), *H. seropedicae* (BR11175), *H. rubrisubalbicans* (BR11192), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11284), *Burkholderia tropica* (BR11364);
9. TN (testemunha nitrogenada) – sem inoculação e com adubação nitrogenada
10. TA (testemunha absoluta) – sem inoculação e sem adubação nitrogenada.

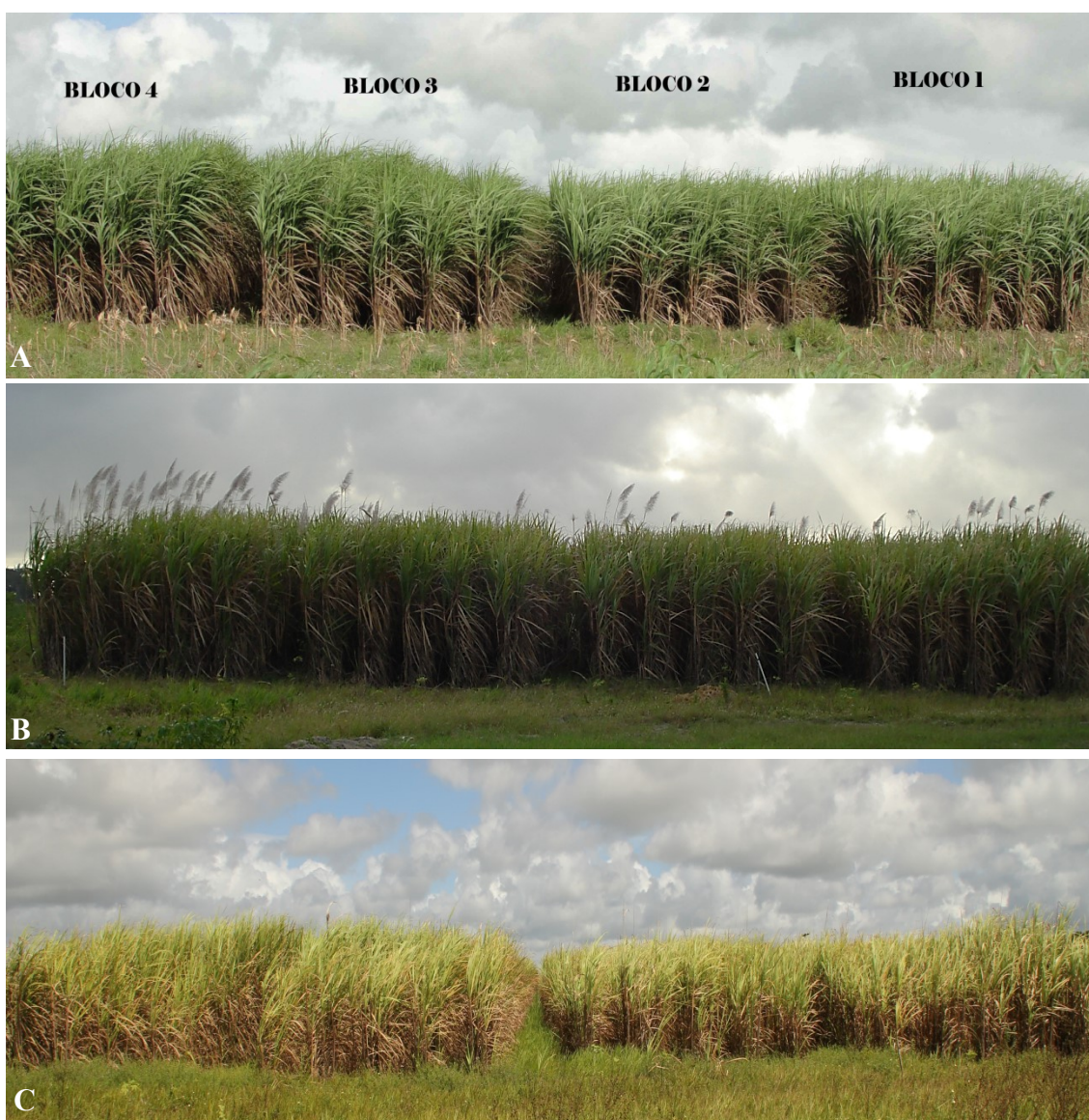
APÊNDICE M – Croqui do experimento, mostrando os blocos e os dez tratamentos, totalizando 40 parcelas.



**APÊNDICE N** – Área a ser implantada o experimento(a); marcação dos tratamentos(b); toletes sementes com 3 a 5 gemas para serem plantados(c); aplicação do inoculante turboso na água para inocular a cana-de-açúcar(d)(e); toletes em sacos de ráfias mergulhados nos oitos tratamentos contendo inoculantes, cada tratamento em um reservatório(f).



**APÊNDICE O** – Distribuição dos toletes de cana-de-açúcar inoculada nos tratamentos(a); toletes de cana-de-açúcar sendo cobertos após o semeio (b); vista do experimento aos 31 dias após o plantio (DAP)(c); vista do experimento aos 90 DAP(d); vista do experimento aos 150 DAP(e); vista do experimento aos 240 DAP(f).



**APÊNDICE P** – Visão do experimento aos 8 meses. A – cana-planta; B-cana-soca; C – cana-ressoca.



**APÊNDICE Q** – Visão lateral do bloco 4 aos 10 meses para cana planta.





**APÊNDICE R** – Coleta de cana-planta aos 11 meses após o plantio(a); peso das folhas verdes/ponteiro (b); corte dos colmos(c); pesagem dos colmos(d); inoculante líquido(e); reinoculação da soqueira, com inoculante líquido, com ajuda de um pulverizador manual com jato direcionado no corte do colmo (f).

### Ficha catalográfica

C837a Antunes, Jadson Emanuel Lopes  
Bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar:  
estratégia para uma agricultura sustentável / Jadson Emanuel  
Lopes Antunes. – Recife, 2016.  
156 f. : il.

Orientadora: Márcia do Vale Barreto Figueiredo.  
Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia,  
Recife, 2016.  
Referências.

1. Fixação biológica do nitrogênio 2. Inoculantes microbianos  
3. <sup>15</sup>N 4. Sequenciamento 5. Gene 16S rRNA 6. *Saccharum* spp.  
I. Figueiredo, Márcia do Vale Barreto, orientador II. Título

CDD 631.4