

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Sueide Karina da Silva

**RIZÓBIOS ASSOCIADOS À CANA-DE-AÇÚCAR (RB 92579)  
CONSORCIADA COM FEIJÃO-CAUPI EM SOLO COM LONGO  
HISTÓRICO DE EXPLORAÇÃO CANAVIEIRA**

**RECIFE**

**2022**

Sueide Karina da Silva

Engenheira Agrônoma

**Rizóbios associados à cana-de-açúcar (RB 92579) consorciada com feijão-caupi em solo com longo histórico de exploração canavieira**

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

Orientadora: Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

Coorientadores:

Dr. Luc Felicianus Marie Rouws

Dr. Jakson Leite

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S586r Silva, Sueide Karina da  
RIZÓBIOS ASSOCIADOS À CANA-DE-AÇÚCAR (RB 92579) CONSORCIADA COM FEIJÃO-CAUPI EM SOLO  
COM LONGO HISTÓRICO DE EXPLORAÇÃO CANAVIEIRA / Sueide Karina da Silva. - 2022.  
119 f. : il.

Orientadora: Ana Dolores Santiago de Freitas.  
Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo,  
Recife, 2022.

1. Bactérias endofíticas. 2. Culturas energéticas. 3. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. 4.  
Saccharum spp.. I. Freitas, Ana Dolores Santiago de, orient. II. Título

CDD 631.4

---

SUEIDE KARINA DA SILVA

**Rizóbios associados à cana-de-açúcar (RB 92579) consorciada com feijão-caupi em solo com longo histórico de exploração canavieira**

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

Aprovada em 01 de agosto de 2022

---

Dra Ana Dolores Santiago de Freitas  
Orientadora  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Felipe José Cury Fracetto  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dra Emilia Cristina Pereira de Arruda  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Jakson Leite  
Instituto Federal do Pará

---

Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior  
Embrapa Semiárido

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, pela força, saúde e por todas as realizações que tenho conseguido.

Tudo é graças a Ele.

Ao meu esposo, José Sales, e a minha filha, Eloá, vocês são minha base.

Aos meus pais, Soledade e José Ailton, pelo incentivo e apoio, e à minha irmã Sulene Cássia, por toda ajuda cuidando de Eloá enquanto eu me dedicava às atividades do doutorado.

À minha orientadora, Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas, pela orientação, apoio, carinho, incentivo e ensinamentos. Sou muito grata por tudo.

Aos meus coorientadores, Dr. Jakson Leite e Dr. Luc Rouws.

Ao pesquisador Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior.

À professora Emília Arruda, pela preciosa contribuição no trabalho.

À Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), representada pelo coordenador Dr. Djalma Simões Neto e pelo técnico Evanilson Silva, pelo apoio durante as coletas.

Aos colegas do grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio (GFBN)

A todos os meus colegas de pós-graduação em Ciência do Solo da UFRPE, que participaram de momentos no dia a dia das disciplinas ou das análises em laboratório, em especial a Adriana, Leandro, Petrônio e Emanuelle.

A todos os professores do programa, pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os funcionários da UFRPE, em especial a Maria do Socorro Santana, por toda sua simpatia, paciência e ajuda.

Aos membros da banca examinadora, pelas valiosas contribuições.

Aos meus colegas, que tanto me ajudaram nessa caminhada, pelo convívio, conversas e alegrias, que tornam toda essa caminhada mais fácil.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização dessa pesquisa.

Muito obrigada!



## Rizóbios endofíticos em cana-de-açúcar (RB92579) consorciada a leguminosas de grãos em solo com longo histórico de exploração canavieira

### RESUMO GERAL

Rizóbios são bactérias conhecidas por infectar raízes de leguminosas, formando nódulos onde fixam o N atmosférico de maneira mais eficiente que as bactérias diazotróficas que colonizam as gramíneas. Diversos trabalhos relatam a presença de rizóbios no interior das raízes de gramíneas, assim como a cana-de-açúcar. Não se sabe se esses organismos exercem funções benéficas para as plantas, mas, se forem capazes de atuar como bactérias promotoras de crescimento, essa associação rizóbios-gramíneas pode representar uma possibilidade de desenvolvimento de tecnologias baseadas em bioinsumos, ou em manejos mais independentes de fertilizantes químicos. Os resultados obtidos até o momento sugerem que rizóbios e outras bactérias não nodulantes filogeneticamente relacionadas com eles representam um grupo de micro-organismos que deve ser mais bem estudado no sentido da sua aplicação para culturas da família Poaceae. O objetivo deste trabalho foi prospectar e caracterizar populações de rizóbios associados à variedade de cana-de-açúcar RB 92579, a mais utilizada no Nordeste do Brasil, cultivada em solo com longo histórico de exploração canavieira, e avaliar o efeito do consórcio dessa gramínea com leguminosas nodulantes sobre essas populações, por meio de isolamento, seguido de caracterização genética e funcional. Foi montado um experimento no município de Carpina-PE, Zona da Mata de Pernambuco, com tratamentos distribuídos em blocos casualizados com quatro repetições, representando o cultivo solteiro e o consórcio da cana-de-açúcar com diferentes espécies de leguminosas produtoras de grãos (feijão-caupi, amendoim e soja). Aos 5 meses após o plantio da cana foi realizada a coleta de raízes jovens, que foram maceradas em solução salina, onde o produto suspenso foi utilizado como inoculante em ensaios de plantas iscas, utilizando as mesmas leguminosas dos consórcios. Os isolados obtidos a partir dos nódulos formados foram caracterizados geneticamente, por meio do sequenciamento do 16S rRNA, e fenotipicamente em meio Yeast mannitol agar (YMA). Os isolados foram testados quanto à capacidade de promoção de crescimento, produção de biomassa e de alterar parâmetros morfoanatômicos de raízes da cana-de-açúcar, em experimento de inoculação de mudas pre-brotadas. Também foi testada a capacidade dos isolados em promover a promoção de crescimento de leguminosas, em experimento em casa-de-vegetação. No primeiro ensaio com plantas-iscas, só houve formação de nódulos em feijão-caupi inoculado com a suspensão preparada a partir das raízes de cana cultivada em consórcio com esta leguminosa. Este resultado indica a inexistência de populações de rizóbios com capacidade de nodular a soja e o amendoim nos tecidos da cana, além da necessidade do cultivo do feijão-caupi para estimular a presença de seus microssimbiontes nas raízes da gramínea, provavelmente por estimular as populações naturalmente estabelecidas no solo. Esses nódulos geraram uma coleção de 20 rizóbios autenticados, com baixa diversidade fenotípica e genética, sendo 4 isolados classificados como *Bradyrhizobium* e 7 como *Rhizobium*. Entre todos os isolados da coleção, 55% solubilizaram fosfato de cálcio e todos foram capazes de produzir ácido indolacético. A espessura do velame, do córtex e do sistema vascular, bem como a densidade e comprimento de pêlos radiculares da raiz da cana-de-açúcar foram influenciados positivamente com a inoculação. Dessa forma, a inoculação com rizóbios provenientes de raiz de cana-de-açúcar é promissora para um cultivo mais sustentável da cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** Bactérias endofíticas. Culturas energéticas. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. *Saccharum* spp.

## **Endophytic rhizobia in sugarcane (RB92579) intercropped with grain legumes in soil with a long history of sugarcane exploitation**

### **GENERAL ABSTRACT**

Rhizobia are bacteria known to infect legume roots, forming nodules, where these organisms can fix atmospheric nitrogen more efficiently than the diazotrophic bacteria that colonize grasses. Several works report the presence of rhizobia inside the roots of grasses, as well as occur in sugarcane. It is not known whether these organisms have beneficial functions for plants, but if they can act as growth-promoting bacteria, the association with grassy rhizobia may represent a great possibility for the development of technologies based on bioinputs, or on more independent management of chemical fertilizers for the culture. The results obtained so far suggest that rhizobia and other non-nodulating bacteria phylogenetically related to them represent a group of microorganisms that should be better studied, regarding their application to cultures of the Poaceae family. The objective of this work was to prospect and characterize populations of rhizobia associated with the most used variety of sugarcane in Northeast Brazil, cultivated in soil with a long history of sugarcane exploitation, and to evaluate the effect of intercropping with nodulating legumes on these populations, through isolation, followed by genetic and functional characterization. An experiment was set up in the municipality of Carpina-PE, Zona da Mata de Pernambuco. The treatments were distributed in randomized blocks with four replications, representing by single crop and the intercropping of sugarcane with different species of grain-producing legumes (cowpea, peanut, and soybean). At 5 months after sugarcane planting, non-lignified roots were collected, which were macerated in saline solution and the suspension product was used as an inoculant in bait plant trials, using the same legumes of the consortia. The isolates obtained from the formed nodules were genetically characterized, through 16S rRNA sequencing, and phenotypically in YMA medium. The isolates were tested for their ability to promote growth and biomass production and to change morphoanatomical parameters of sugarcane roots, in a pre-sprouted seedling inoculation experiment of legume growth in a greenhouse experiment. In the first trial with bait plants, nodules were only formed in cowpea inoculated with the suspension prepared from the roots of sugarcane cultivated in consortium with that legume. Results indicated the lack of rhizobia populations capable of nodulating soybeans and peanuts in sugarcane tissues, as well as demonstrating that cowpea cultivation was necessary to stimulate the presence of their microsymbionts in grass roots, probably by stimulating populations naturally established into the soil. These nodules generated a collection of 20 authenticated rhizobia, with low phenotypic and genetic diversity, with 4 isolates classified as *Bradyrhizobium* and 7 as *Rhizobium*. Among all the isolates in the collection, 55% solubilized calcium phosphate and all were capable of producing AIA. The thickness of the canopy, cortex, and vascular system, as well as the density and length of root hairs in the sugarcane root were positively influenced by inoculation.

**Keywords:** Endophytic bacteria. Energy crops. Plant growth-promoting, Rhizobacteria. *Saccharum* spp

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1:** Cultivos consorciados de cana-de-açúcar com amendoim (A), soja (B) e feijão-caupi (C) cultivados em campo na Estação Experimental de açúcar do Carpina (EECAC).....45
- Figura 2:** Parcela experimental do manejo consorciado de cana-de-açúcar com leguminosas: área total e espaçamento entre fileiras da cana (A) e área útil da parcela (B).....46
- Figura 3:** Coleta das raízes de cana-de-açúcar em consórcio com leguminosas.....47
- Figura 4:** Obtenção do extrato após maceração de raiz da cana-de-açúcar .....48
- Figura 5:** Inoculação das plantulas com o extrato de raiz da cana (A), planta de feijão-caupi inoculada (B) e colônias provenientes do nódulo (C).....49
- Figura 6:** Experimento de autenticação dos isolados com feijão-caupi.....50
- Figura 7:** Caracterização dos isolados autenticados em placa de Petri.....51
- Figura 8:** Utilização de feijão-caupi com planta isca para obtenção de nódulos dos extratos de raiz de cana-de-açúcar .....54
- Figura 9:** Isolados obtidos após a autenticação.....55
- Figura 10:** Tratamento 13 com duas colônias distintas (A) e Caracterização morfológica das bactérias que acidificam (amarela), neutralizam (verde) ou alcalinizam (azul) o meio (B).....56
- Figura 11:** Fenograma de similaridade por agrupamento dos isolados obtidos de raiz de cana-de-açúcar cultivada em consórcio com feijão-caupi. PAST 4.03.....57
- Figura 12–** Análise da qualidade da sequência parcial do gene 16S rRNA do isolado 13B por meio do programa Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems) com 963 bases contínuas (parte em azul indica leitura contínua com QV>20).....58
- Figura 13–** Árvore filogenética construída com base em sequências parciais do gene 16S rRNA de 11 sequências de bactérias isoladas de nódulos radiculares de feijão-caupi e de 26 estirpes tipo utilizadas como referências.....60
- Figura 14:** Dendograma concatenado com os marcadores BOX PCR e GTG5 dos isolados obtidos de raiz de cana-de-açúcar consorciada com feijão-caupi.....61

### CAPÍTULO 2

<b>Figura 1:</b> Inoculação nas sementes de soja (A) e Experimento completo em casa de vegetação (B).....	73
<b>Figura 2-</b> Frequência da solubilização de fosfato de cálcio pelos isolados obtidos da raiz de cana-de-açúcar. De acordo com o IS obtido: ( - ) não solubiliza; IS < 2 baixo; IS 2 - 4 médio e IS > 4 alto.....	75
<b>Figura 3:</b> Experimento com feijão-caupi: inoculação (A) e Experimento montado (B).....	78
<b>Figura 4:</b> Comparação entre plantas (A), sistema radicular (B) e nódulos (C) de plantas inoculadas com a BR 3267 e o isolado 16B.....	82
<b>Figura 5:</b> Nódulos inativos (brancos) e ativos (róseos) de uma mesma planta de feijão-caupi inoculada com a BR3267.....	83

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 1:</b> Montagem de mini rebolos em caixa de brotação (A) e mudas de cana com 17 dias (B).....	94
<b>Figura 2:</b> Experimento em casa de vegetação após montagem.....	95
<b>Figura 3:</b> Coleta do experimento com 70 dias: medição do comprimento da raiz (A) e amostras de raízes conservadas em etanol 70% (B).....	96
<b>Figura 4:</b> A-E: sequencia de montagem das lâminas: A - seccionamento; B- coleta de cortes; C-início da montagem de lâminas; D-distensão de cortes .....	97
<b>Figura 5:</b> Micrótomo rotativo Leica RM 2125RT.....	98
<b>Figura 6:</b> Sistema radicular (A) e plantas em casa de vegetação (B) no momento da coleta aos 30 dias após inoculação.....	99
<b>Figura 7.</b> Cortes transversais das raízes dos indivíduos de <i>Saccharum</i> spp. submetidas a diferentes tratamentos com bactérias.....	105
<b>Figura 8.</b> Cortes transversais detalhados das raízes dos indivíduos de <i>Saccharum</i> spp. submetidas a diferentes tratamentos com bactérias. ....	106
<b>Figura 9:</b> Corte transversal da raiz.....	107
<b>Figura 10:</b> Variação da densidade de pêlos radiculares em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com rizóbios provenientes da raiz de cana-de-açúcar cultivada em consórcio com feijão-caupi.....	109
<b>Figura 11.</b> A-E. Cortes paradérmicos das raízes destacando a presença dos pêlos radiculares (setas). A. Tratamento T6. B. Tratamento T5. C. Tratamento T12B. D. Tratamento 5 . E. Tratamento T0.....	110

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Caracterização química e física de amostras de solo da área experimental antes do preparo do solo para plantio da Estação Experimental do Carpina, Pernambuco.....44
- Tabela 2:** Descrição das características em meio de cultivo YMA com azul de bromotimol de rizóbios isolados de raízes de cana de açúcar .....56
- Tabela 3:** Identificação dos isolados de cana-de-açúcar por meio da comparação de sequências do gene 16S com as estirpes “tipo” disponíveis no banco de dados GenBank....59

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1:** Solubilização de P-Ca, produção de AIA e identificação dos isolados com base no 16S RNA.....76
- Tabela 2:** Biometria das plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp cv. IPA 206) inoculadas com rizóbios em casa-de-vegetação.....79
- Tabela 3:** Identificação dos isolados de cana-de-açúcar por meio da comparação de sequências do gene 16S com as estirpes “tipo” disponíveis no banco de dados GenBank.....81

### CAPÍTULO 3

- Tabela 01:** Biométrie de MPBs de cana-de-açúcar inoculadas com rizóbios em casa-de-vegetação aos 30 dias após inoculação.....100
- Tabela 2:** Coeficiente de Correlação de Pearson (r) aos 30 dias após inoculação.....101
- Tabela 3.** Biometria de MPBs de cana-de-açúcar inoculadas com rizóbios em casa-de-vegetação aos 70 dias após inoculação.....102
- Tabela 4:** Coeficiente de Correlação de Pearson (r) aos 70 dias após inoculação.....103
- Tabela 5.** Valores médios da espessura do velame, espessura do córtex e área do sistema vascular das raízes medidos em secções transversais. ....108
- Tabela 6.** Medições de comprimento e densidade de pêlos radiculares de plantas de cana-de-açúcar inoculadas.....111

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPCP – Bactérias promotoras de crescimento de plantas

BSPA – Biomassa seca da parte aérea

BSN – Biomassa seca de nódulos

BSR – Biomassa seca da raiz

DAI – Dias após a inoculação

DIA - Diâmetro

DNA – ácido desoxirribonucléico

FBN – Fixação biológica de nitrogênio

FNVL - fixação de N<sub>2</sub> de vida livre

MPBs – Mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar

Método UPGMA – do inglês Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages é um simples método estatístico de agrupamento hierárquico

NCBI – Nacional Center for Biotechnology Information

NN- Número de nódulos

PGPR – plant growth promoting rhizobacteria

rpm – rotações por minuto

µm – micrometro

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1 Hipóteses.....	15
1.2 Objetivos.....	15
1.2.1 Objetivo Geral.....	15
1.2.2 Objetivos Específicos.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Aspectos gerais da cultura da cana-de-açúcar.....	17
2.2 Nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar.....	18
2.3 Micro-organismos associados e bactérias promotoras de crescimento de plantas.....	20
2.4 Características metabólicas de BPCPs responsáveis pela modulação e alterações positivas.....	21
2.4.1 Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar.....	23
2.4.2 Diversidade de rizóbios.....	25
2.4.3 A ocorrência de rizóbios em não leguminosas, com ênfase na cana-de-açúcar.....	26
2.5 Técnicas moleculares para acessar a diversidade de rizóbios.....	28
REFERÊNCIAS.....	31

## CAPÍTULO 1

3. PROSPECÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE RIZÓBIOS ASSOCIADOS À RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADA SOLTEIRA OU EM CONSÓRCIO COM LEGUMINOSAS	
3.1 Introdução.....	42
3.2 Material e Métodos.....	43
3.2.1 Coleta de raízes de cana-de-açúcar cultivada em consórcio com leguminosas.....	43
3.2.2 Isolamento usando leguminosas como planta isca.....	48
3.2.3 Autenticação e purificação dos isolados.....	50
3.2.4. Caracterização morfofocultural dos isolados.....	52
3.2.5 Identidade taxonômica dos isolados.....	52
3.2.5.1 Extração de DNA.....	52
3.2.5.2 Sequenciamento do gene 16SrRNA.....	52
3.2.5.3 Fingerprinting molecular por BOX-PCR e GTG 5.....	52
3.2.6 Tratamento estatístico dos dados.....	53
3.3 Resultados e Discussão.....	53
3.3.1 Isolamento, autenticação e purificação dos rizóbios.....	53
3.3.2 Caracterização fenotípica dos isolados.....	55
3.3.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	58
3.3.4 Fingerprinting molecular por BOX-PCR e GTG5.....	61
4. Conclusões.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

## CAPÍTULO 2

4. CAPACIDADE DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE RAÍZES DE CANA DE AÇÚCAR DE PROMOVER O CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS: AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	
4.1 Introdução.....	69
4.2 Material e Métodos.....	71
4.2.1 Potencial dos isolados de produzir substâncias promotoras de crescimento em plantas.....	71
4.2.1.1 Solubilização de fosfato de cálcio e alumínio .....	71
4.2.1.2 Produção de ácido indol acético (AIA).....	72
4.2.3 Experimento em casa de vegetação com leguminosas.....	72
4.2.3.1 Delineamento experimental.....	72
4.2.3.2 Preparo do inoculante.....	73
4.2.3.3 Instalação do experimento .....	73
4.2.2.4 Parâmetros avaliados.....	74
4.2.2.5 Análise estatística .....	74
4.3 Resultados e Discussão.....	74
4.3.1 Produção de substâncias promotoras de crescimento.....	74
4.3.1.1 Solubilização de fosfato.....	74
4.3.1.2 Produção de Ácido-Indol-Acético .....	75
4.3.1.4 Experimentos em casa de vegetação com leguminosas.....	77
4.4 Conclusões.....	83
REFERÊNCIAS .....	85

## CAPÍTULO 3

5. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E HISTOLÓGICOS DE MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM RIZÓBIOS	
5.1 Introdução.....	92
5.2 Material e Métodos.....	93
5.2.1 Experimento em casa de vegetação .....	93
5.2.1.1 Delineamento experimental.....	93
5.2.1.2 Preparo do inoculante.....	93
5.2.1.3 Produção das mudas pré-brotadas e instalação do experimento.....	94
5.2.1.4 Parâmetros avaliados.....	95
5.2.1.5 Análise estatística .....	99
5.3 Resultados e Discussão.....	99
5.3.1. Parâmetros biométricos de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar em casa de vegetação.....	99
5.3.1.1 Coleta aos 30 dias após inoculação (DAI).....	99
5.3.1.2. Coleta aos 70 dias após inoculação.....	101
5.3.2 Análise morfoanatômica das raízes de cana-de-açúcar .....	103
5.4 Conclusões.....	113
REFERÊNCIAS.....	114
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil hoje é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo responsável por 654,5 milhões de toneladas destinados a produção de 41,2 milhões de toneladas de açúcar e 29,7 bilhões de litros de etanol. Para atingir esses altos quantitativos, é necessário ter uma grande área plantada com a cultura e uma aplicação de um grande volume de fertilizantes para obter um aumento na produtividade. No Nordeste, a variedade RB 92579 apresenta bons desempenhos, sendo firmada, atualmente, como a variedade mais cultivada na região, podendo atingir produtividades superiores a 140 Mg ha<sup>-1</sup>.

O nitrogênio é um dos nutrientes mais exigidos pela cultura de cana-de-açúcar e é responsável por promover alongamento dos entrenós, aumentar o perfilhamento e área foliar, provocando conseqüentemente um maior acúmulo de matéria seca, além de constituir papel importante na formação da clorofila e na síntese de biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. Por outro lado, a utilização de altas doses de nitrogênio aumenta a contaminação dos recursos hídricos pela eutrofização, utiliza recursos não-renováveis para sua produção e gera custo ao produtor, necessitando assim a utilização de um manejo mais sustentável.

A utilização de micro-organismos que possuam a capacidade de captar o N<sub>2</sub> atmosférico e convertê-lo em formas assimiláveis pelas plantas é uma solução bastante eficaz e sustentável para esse problema. Esses organismos podem estar presentes em diversos compartimentos, dentre eles o solo e mais especificamente, dentro da raiz das plantas. Conhecidas como diazotróficas, essas bactérias possuem um complexo enzimático chamado nitrogenase, responsável pela redução do nitrogênio. Algumas dessas bactérias quando associadas às leguminosas, possuem capacidade de induzir a formação na raiz da planta uma estrutura denominada nódulo, local onde ocorre o processo de fixação e recebem o nome de rizóbio. A eficiência dessa simbiose rizóbio-leguminosa é bastante conhecida e pode chegar a substituir 100% da adubação nitrogenada, como é o caso da soja.

Diversos trabalhos relatam a presença de rizóbios no interior da raiz de gramíneas, assim como a cana-de-açúcar. Não se sabe se esses organismos exercem funções benéficas para as plantas, mas, se forem capazes de atuar como bactérias promotoras de crescimento, essa associação rizóbios gramíneas pode representar uma grande possibilidade de desenvolvimento de tecnologias baseadas em bioinsumos ou em manejos mais independentes de fertilizantes químicos para a cultura. Na cana-de-açúcar a inoculação com rizóbios pode promover modificações anatômicas e morfológicas em suas raízes. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi realizar uma prospecção da ocorrência, características, efeitos e condições que afetam populações de rizóbios endofíticos em raízes de

cana-de-açúcar utilizando uma variedade tipicamente utilizada nos solos de Pernambuco. Esses solos têm um longo histórico de cultivo com cana-de-açúcar, o que condicionou populações de micro-organismos bastante específicas e, provavelmente, diferentes das existentes em solos com cultivos mais recentes.

## **1.1 Hipóteses**

- 1) A variedade de cana-de-açúcar RB92579 cultivada em solo com longo histórico de exploração canavieira abriga populações de rizóbios em suas raízes.
- 2) O cultivo de cana-de-açúcar consorciado com diferentes leguminosas nodulantes estimula a associação com diferentes populações de rizóbios na variedade RB92579.
- 3) A cana-de-açúcar de variedade RB 92579 possui relação associativa com rizóbios que possuem potencial de produzir substâncias promotoras de crescimento em plantas.
- 4) A inoculação da variedade RB 92579 de cana-de-açúcar com rizóbios provoca modificações em características morfoanatômicas e histológicas das raízes, propiciando um melhor desenvolvimento das plantas.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Prospectar e caracterizar populações de rizóbios associados à variedade de cana-de-açúcar RB 92579, a mais utilizada no Nordeste do Brasil, cultivada em solo com longo histórico de exploração canavieira, e avaliar o efeito do consórcio com leguminosas nodulantes sobre essas populações, por meio de isolamento seguido de caracterização genética e funcional.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Isolar rizóbios de raízes de cana solteira e em consórcio com leguminosas utilizando ensaios com plantas iscas com diferentes espectros de especificidade para microsimbiontes;
- Caracterizar geneticamente os membros da coleção por meio de sequenciamento de genes 16S rRNA e avaliar sua diversidade genética por BOX-PCR e GTG-5;
- Investigar o potencial de isolados em produzir substâncias promotoras de crescimento de plantas;

- Verificar a capacidade dos isolados em promover o crescimento de mudas de plantas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar da cultivar RB 92579 em casa-de-vegetação;
- Verificar a capacidade dos isolados de nodular e promover o crescimento de espécies de leguminosas;
- A inoculação da variedade RB92579 de cana-de-açúcar com rizóbios provoca modificações em características morfoanatômicas e histológicas das raízes propiciando um melhor desenvolvimento das plantas

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea cultivada em larga escala no país e é considerada uma das mais importantes para a economia mundial, pois é responsável pelo fornecimento de matéria-prima para produção de diversos subprodutos, dentre eles, o açúcar e o etanol. Devido à alta quantidade disponibilizada dessa matéria-prima para a produção de biocombustíveis, a cultura pode ser considerada como sua principal fonte de biomassa. Além disso, por ser uma planta C4, possui uma alta taxa de conversão fotossintética, proporcionando maior acúmulo de biomassa.

O cultivo da cana-de-açúcar sob manejo convencional segue um padrão caracterizado pelo uso extensivo do solo e de fertilizantes químicos. Atualmente, existe uma maior preocupação dos produtores com o meio ambiente, o que motivou a adoção de um manejo mais sustentável. Em relação à necessidade de adubação nitrogenada, a cana-de-açúcar requer a aplicação de altas quantidades de fertilizantes para que apresente a produtividade esperada. Esses altos volumes podem ser minimizados com a utilização de micro-organismos que forneçam o nutriente à planta. Fatores como práticas de cultivo, monocultura ou rotação de cultivos, tipo de fertilização, entre outros, podem afetar o microbioma associado ao solo e às plantas, afetando a densidade populacional e automaticamente os benefícios que essa população traz para o solo e para a cultura.

Os micro-organismos que fazem parte do microbioma podem desempenhar funções diversas, como: alívio do estresse abiótico do hospedeiro; defender os hospedeiros do estresse biótico (patógenos); e auxiliar o hospedeiro nutricionalmente através do aumento do nitrogênio, fósforo, ferro, e outros nutrientes. Essas funções podem ser consideradas como mecanismos diretos e indiretos. Os mecanismos diretos de promoção de crescimento vegetal são baseados em traços funcionais como: síntese de fitohormônios como o ácido 3-indol acético, nitrogênio atmosférico catalisada pela enzima nitrogenase e solubilização de nutrientes insolúveis como os fosfatos. Já os

mecanismos indiretos estão envolvidos no estabelecimento destas relações simbióticas, como a proteção do hospedeiro contra pragas e fitopatógenos e estresses abióticos, como metais pesados e salinidade.

Dessa forma, é de fundamental importância o estudo de comunidades de micro-organismos que desempenhem algum tipo de mecanismo de promoção de crescimento que possa auxiliar no desenvolvimento da cana-de-açúcar e conseguir minimizar a quantidade de fertilizante nitrogenado utilizado na cultura. Nesse trabalho, foi estudada a comunidade de rizóbios associados à cana-de-açúcar endofiticamente, bem como alguns mecanismos diretos de promoção de crescimento e a influência dos isolados na produtividade da cana-de-açúcar.

## 2.1 Aspectos gerais da cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea de metabolismo fotossintético C4 (Poaceae) originária do continente asiático. No Brasil, as primeiras mudas foram plantadas nas Capitânicas de São Vicente e Pernambuco, em 1522 e trazidas da Ilha da Madeira, por Martim Afonso de Souza. A escolha desta planta pelos portugueses está relacionada ao fato de que apresenta crescimento rápido (em 1 ano ocorre o primeiro corte) e à adaptação às condições edafoclimáticas do nordeste brasileiro (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

Gramíneas de metabolismo fotossintético C4 evoluíram primariamente nos trópicos e se adaptaram a elevadas intensidades luminosas e altas temperaturas. Devido à utilização mais eficiente do CO<sub>2</sub>, realizam a mesma taxa de fotossíntese das plantas C3, porém com uma menor abertura estomática, podendo ser duas a três vezes mais eficientes em relação ao desenvolvimento vegetativo. Por esse motivo, apresentam potencial de alta produção de biomassa (MACKINDER, 2018; WANG et al., 2019). Além da importância na alimentação humana e de animais, apresentam grande interesse para utilização como culturas energéticas (LIMA et al., 2014) e são matérias-primas ideais para produção de etanol e outros biomateriais combustíveis. No Brasil, este potencial já vem sendo bem utilizado desde a crise do petróleo com o cultivo da cana-de-açúcar para produção de etanol.

Em termos regionais, o Brasil apresenta dois períodos distintos de safra de cana-de-açúcar: de setembro a março no Norte-Nordeste e de abril a novembro no Centro-Sul, produzindo, assim, etanol durante praticamente o ano todo. Contudo, é necessário que essa produção leve em conta os temas ambientais e sociais como parte das pautas de desenvolvimento. Queimadas, uso da água e uso intensivo de agroquímicos, são questões que devem ser discutidas e analisadas, a fim de que sejam geradas medidas que possam mitigar os impactos da expansão da cultura canavieira. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, além da produção de etanol e açúcar, as unidades de

produção têm buscado operar com maior eficiência, até mesmo com geração de energia elétrica, auxiliando na redução de custos e contribuindo para a sustentabilidade da atividade (IEA, 2022).

Atualmente, a produtividade média da cultura da cana-de-açúcar no Brasil está por volta de 68,78 toneladas de colmos frescos por hectare e a adição média de fertilizantes nitrogenados é de 60 kg de nitrogênio por hectare (CONAB, 2021). Para a safra 2021/22, estima-se 568,43 milhões de toneladas, apresentando redução de 13,2% em relação à safra anterior. A área colhida está estimada em 8,26 milhões de hectares, queda de 4,1% se comparada com a safra 2020/21. Na Região Nordeste há uma redução de 13,6% na área a ser colhida, com um estimativa de aumento de 4,6% na produtividade, o que deverá resultar em uma produção de 43,7 milhões de toneladas, 9,7% menor que àquela observada na última safra e também há perspectiva de redução na área em produção entre essas duas últimas temporadas, devendo sair de 849,7 mil hectares em 2020/21 para 733,8 mil hectares nesta safra (CONAB, 2021).

Para que se possa obter uma alta produtividade de cana-de-açúcar no campo é necessário um alto volume de mudas e um aumento no uso de máquinas para plantio, manejo e colheita. Na mesma proporção que isso se intensifica no campo, a ocorrência de falhas se torna mais frequente, aumentando o risco de difusão de pragas e doenças e potencializando a competição por água e nutrientes em áreas comerciais (LANDELL et al. 2012). Para que o setor se mantenha produtivo, é necessário inovar e buscar alternativas que aumentem a produtividade e a longevidade dos canaviais, porém que reduzam os custos. A partir destas necessidades, surgiu um novo sistema de produção de mudas prébrotadas (MPB) de cana-de-açúcar, desenvolvido pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), que consiste em brotar mini-toletes com gemas, extraídos de colmos-semente, provenientes de viveiros base com plantas de 6 a 10 meses de idade. Segundo LANDELL et al. (2013), MPB de cana-de-açúcar é um sistema de multiplicação que contribuirá para a rápida produção de mudas, associando elevado padrão de fitossanidade, vigor e uniformidade de plantio. Esse sistema melhora a uniformidade nas linhas de plantio e, conseqüentemente, a redução de falhas, por conta da padronização das mudas em viveiros comerciais.

## **2.2 Nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar**

O nitrogênio é um dos nutrientes que estão diretamente relacionados com a produtividade das culturas, sendo absorvido em maior quantidade pela cana-de-açúcar nas formas iônicas de nitrato e amônio ( $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ ), tendo baixa disponibilidade principalmente em solos tropicais e subtropicais. Sua deficiência causa clorose nas folhas mais velhas e a diminuição da atividade meristemática da parte aérea, perfilhamento da área foliar e longevidade das folhas (DO VALE et

al., 2011). Além disso, em situações de deficiência de N, decresce o teor de umidade da planta, diminuindo a qualidade do caldo, aumentando o teor de fibra e diminuindo a concentração de sacarose no colmo, pois ocorre acúmulo de açúcares nas folhas e aumento da relação folha: colmo. Sob excesso de N, ocorre seu acúmulo no colmo, piora a qualidade do caldo e atrasa a maturação (CARNAÚBA, 1990).

O suprimento do N via fertilizante é um dos itens mais significativos dentro do custo total de produção da cana-de-açúcar. Esse fato é especialmente crítico no Brasil, onde há forte dependência das importações de fertilizantes nitrogenados, sendo que, no caso da uréia, a expectativa, segundo o Ministério da Agricultura, é que as importações poderão chegar a 2 milhões de toneladas ao ano, sendo atualmente, o montante importado de 600 mil toneladas por ano (MAPA, 2022). No Brasil, a cana-de-açúcar é cultivada com doses relativamente baixas de N ( $90-120 \text{ kg ha}^{-1}$ ) enquanto que em outros países produtores, como a China, as quantidades aplicadas na cultura podem ser 300% superiores ( $350 \text{ kg ha}^{-1}$ ) às doses empregadas no Brasil (DONG et al., 2018). Mesmo assim, no país a cana-de-açúcar é responsável pelo consumo de 14% dos fertilizantes usados na agricultura brasileira, incluindo os fertilizantes nitrogenados, que apresentam baixa eficiência de utilização, geralmente não ultrapassando 40% das doses aplicadas (PEREIRA, 2011).

A queima da palhada, os colmos retirados, perdas do fertilizante nitrogenado em processos como lixiviação, desnitrificação e volatilização da amônia, são formas em que o nitrogênio é retirado do campo. Em variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena em Pernambuco, a cana-planta acumula, em média,  $179 \text{ kg ha}^{-1}$  de N, sendo a exportação média pelo colmo de  $92 \text{ kg ha}^{-1}$ , correspondendo a 51% de todo o nutriente extraído na parte aérea (OLIVEIRA et al., 2010). Como resultado da expressão genética, influenciada pela deficiência ou toxicidade dos nutrientes, cada variedade de cana-de-açúcar pode apresentar eficiências nutricionais distintas, com maior ou menor resposta a determinados nutrientes e, conseqüentemente, influenciar a conversão de matéria seca (DO VALE et al., 2011). Segundo algumas pesquisas, a relação percentual entre quantidade exportada e extraída pode variar de 18 a 70% (OLIVEIRA et al., 2010).

Nesse contexto de alta demanda de N pela cana-de-açúcar, estudos pioneiros sobre a associação de bactérias fixadoras de  $\text{N}_2$  nesta cultura ganharam alta relevância científica desde seu descobrimento (DÖBEREINER e ALVAHYDO, 1959). Considerando todo o potencial de benefício econômico na redução do uso de fertilizantes nitrogenados na cana-de-açúcar, vários esforços da pesquisa científica têm sido direcionados para se obter uma melhor eficiência da fixação biológica de N (FBN) para essa cultura.

## 2.3 Micro-organismos associados e bactérias promotoras de crescimento de plantas

Os micro-organismos associados às plantas estabelecem diferentes tipos de relações, desde mutualistas até o parasitismo. Essas relações podem ocorrer como simbiose ou endossimbiose com diferentes graus de proximidade com as raízes e outros tecidos das plantas (CAVALCANTI et al., 2020; PORTO et al., 2020).

As relações mutualistas, onde há um benefício mútuo entre a planta e os micro-organismos associados, têm sido bastante estudadas e constituem foco de diversos trabalhos. Em muitos casos, o sucesso de uma cultura pode estar vinculado diretamente a estes tipos de relações (BATISTA et al., 2018).

É na rizosfera onde ocorre a maioria das interações entre o solo e os micro-organismos. Essa região é composta por três unidades que interagem entre si: a planta, o solo e os micro-organismos e é um *hotspot* considerado o ecossistema mais complexo do planeta. Devido a gama de compostos que são liberados pelas plantas, os exsudados, a rizosfera apresenta um habitat ideal para os micro-organismos, que os utilizam em seu metabolismo e crescimento microbiano. Nela existe uma comunidade complexa de micróbios que são distintos do solo circundante e estima-se que existam centenas de milhares de espécies diferentes (SALEEM et al., 2018; HANEY et al., 2018).

A interação dos micro-organismos com as plantas pode ocorrer de diferentes formas: micro-organismos de vida livre localizados na matriz do solo rizosférico; associados à superfície da raiz da planta ou rizopiano; e os que se encontram dentro dos tecidos da raiz, nos espaços intercelulares ou intracelulares. Este último grupo de micro-organismos é conhecido como endofíticos (SANTOYO et al., 2016; RHO et al., 2017).

Grande parte destes micro-organismos apresenta genes que conferem capacidade metabólica para realizar reações complexas de forma espontânea, como é o caso dos micro-organismos diazotróficos, que, ao serem utilizados na agricultura, contribuem para a redução no uso dos fertilizantes químicos em diversas culturas (CAVALCANTI et al., 2020; JENSEN et al., 2020).

Os micro-organismos associados às plantas podem promover uma série de benefícios. No caso das bactérias benéficas, são referidas na literatura como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). As BPCP são fundamentais para o desenvolvimento vegetal e podem atuar para benefício das plantas de diversas formas, direta ou indiretamente, seja favorecendo a obtenção de nutrientes, sintetizando compostos, atenuando e prevenindo as plantas de doença ou mesmo aliviando efeitos adversos provenientes de seca e salinidade do solo (KUMAR et al., 2020; ABDELAAL et al., 2021).

As BPCP podem ser classificadas dependendo de sua localização na planta e nas células do hospedeiro em dois tipos: um primeiro grupo de BPCP são as presentes no ambiente extracelular, encontradas na rizosfera e rizoplano ou nos espaços intercelulares das células do córtex radicular (PGPR, na sigla em inglês para “plant growth promoting rhizobacteria”) e um segundo grupo são as encontradas em estruturas especializadas da raiz, como no caso dos nódulos de leguminosas (HERRIDGE et al., 2022).

Essas bactérias apresentam uma série de características ou traços metabólicos que são responsáveis pela modulação e alterações positivas na fisiologia da planta. No tópico a seguir serão apresentados alguns traços de promoção de crescimento vegetal.

## **2.4 Características metabólicas de BPCPs responsáveis pela modulação e alterações positivas**

### **Fixação biológica de nitrogênio**

O nitrogênio é um nutriente fundamental para todas as culturas, necessário para a síntese de biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. Embora constitua maior parte dos gases da atmosfera, o  $N_2$  não é assimilável pelas plantas sendo necessária a quebra de sua tripla ligação e conversão à amônia. Para impedir a deficiência e garantir altas produtividades no campo, é comum o uso de fertilizantes químicos contendo este elemento (OLIVEIRA et al., 2018). No entanto, BPCP diazotróficas realizam a FBN, processo que converte o  $N_2$  em sua forma amoniacal ( $NH_3$ ), sendo este disponível para a absorção vegetal (ZGADZAJ et al., 2016). O processo de FBN é catalizado pela enzima nitrogenase, composta por proteínas codificadas por genes *nif* (ANGEL et al., 2018). Outro grupo de genes relacionados à FBN, os genes *nod*, estão presentes em bactérias diazotróficas conhecidas como rizóbio, que possuem a capacidade de, ao se associar com plantas da família *Fabaceae*, induzirem a formação de uma estrutura especializada denominada de nódulo. Essa relação simbiótica entre rizóbio e leguminosa será mais detalhada adiante, já que é um dos temas estruturais do presente trabalho.

### **Solubilização de fosfatos**

No Brasil, o fósforo é um nutriente limitante para o desenvolvimento das plantas, devido à sua característica de se fixar na matriz do solo, ficando indisponível para absorção. O elemento é requerido em grandes quantidades pelas culturas, pois faz parte da estrutura dos ácidos nucléicos e

fosfolipídios, está presente na molécula de ATP, além de ser um elemento chave para diversas reações metabólicas (SARABIA et al., 2018; QIAO et al., 2019). Alguns micro-organismos são capazes de transformar o fósforo insolúvel em íons absorvíveis pelas plantas, por meio de processos de solubilização do fósforo inorgânico e mineralização do fósforo orgânico presente no solo. As BPCP solubilizadoras de fósforo realizam este processo através da secreção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999). A mineralização, por sua vez, ocorre após a decomposição da matéria orgânica presente no solo, da qual restará uma série de moléculas orgânicas contendo o P, as quais são desfosforiladas por BPCP produtoras de fosfatases (LIMA et al., 2021; ALEMNEH et al., 2021; ANTUNES et al., 2022).

### **Produção de sideróforos**

Quando o ferro está em baixa concentração no solo, as BPCP desempenham um importante papel, pois disponibilizam o ferro para as plantas. Elas secretam moléculas chamadas de sideróforos, que possuem baixo peso molecular e alta afinidade com íons de ferro, que sequestram íons férricos ( $\text{Fe}^{+3}$ ) presentes no solo, e após serem transportadas para o interior celular, são reduzidos a íons ferrosos ( $\text{Fe}^{+2}$ ), tornando-se disponíveis para a absorção vegetal (DIMKPA, 2016; LI et al., 2016).

### **Produção de fitormônios**

Os reguladores de crescimento vegetal são classificados em grupos, sendo os mais comuns: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (BAETZ & MARTINOIA, 2014). As auxinas participam dos processos de tropismo, dominância apical, diferenciação tecidual, formação de raízes epêlos radiculares. O composto mais conhecido é o ácido indol-3-acético (AIA), sintetizado naturalmente por plantas e bactérias e está envolvido diretamente no desenvolvimento vegetal, podendo estimular processos de alongamento, divisão e diferenciação celular e sua produção está associada à resposta aos exsudados, fontes de triptofano, produzidos pela rizosfera vegetal (COMPANT et al., 2019; GOUDA et al., 2018; KUMAR et al., 2020; LIMA et al., 2021; ANTUNES et al., 2022). A produção de AIA é o principal mecanismo em relação aos efeitos das BPCP (SILVEIRA et al., 2016). Acredita-se que as BPCP produtoras de AIA são facilmente isoladas do solo para utilização na agricultura como biofertilizantes (VISHWAKARMA et al., 2020). Genes relacionados à produção de giberelinas e citocininas também são encontrados em BPCP; porém, o papel destes compostos e os mecanismos dessa produção ainda não são totalmente compreendidos (ABHILASH et al., 2016). Nesse quesito, também encontramos trabalhos com resultados positivos em relação à produção de giberelina por bactérias do gênero *Sphingomonas*, em

que foi constatado aumento significativo no tamanho de brotos, raízes e conteúdo clorofílico de tomateiros (KHAN et al., 2014) e através da inoculação de *Bacillus subtilis* em alface, que evidenciaram um aumento de concentração endógena de citocinina, além de um maior tamanho dos brotos e raízes das plantas inoculadas (ARKHIPOVA et al., 2005).

### **Indução de resistência sistêmica**

Os benefícios das BPCP não se limitam apenas às bactérias. Em um trabalho desenvolvido por Sharma e Sharma (2017), usou-se uma combinação do fungo *Rhizophagus irregularis* e bactérias promotoras de crescimento *Pseudomonas jessenii* cepa R62 e *Pseudomonas synxantha* cepa R81 em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. PT-3). Avaliando as trocas bioquímicas e fisiológicas durante a infecção com o nematóide fitopatogênico *Meloidogyne incognita*, verificou-se uma melhor tolerância e diminuição dos efeitos da infecção e um aumento na produção de enzimas peroxidase, polifeniloxidase e superóxido dismutase, com papel na defesa da planta.

## **2.4.1 Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar**

A taxa de N usada nos canaviais brasileiros, que varia de 60 a 100 kg ha<sup>-1</sup>, tende a ser menor do que às aplicadas em outros países, como 150 a 400 kg ha<sup>-1</sup> na Índia e 100 a 755 kg ha<sup>-1</sup> na China (ROBINSON et al., 2011). Sem o uso de fertilizantes, especialmente os nitrogenados, a produção agrícola atual seria drasticamente reduzida (ULLAH et al., 2020).

O nitrogênio é o segundo elemento requerido em maior quantidade para a cana-de-açúcar, perdendo apenas para o potássio (CHERUBIN et al., 2018; OTTO et al., 2019). Atualmente, o Brasil é responsável por cerca de 8% do consumo global de fertilizantes, sendo o quarto do mundo, atrás apenas de China, Índia e Estados Unidos. O principal nutriente aplicado no Brasil é o potássio, com 38%, seguido por cálcio, com 33%, e nitrogênio, com 29% (PALÁCIO DO PLANALTO, 2022).

Os fertilizantes nitrogenados aplicados na cana-de-açúcar são produzidos a partir da fixação industrial do N atmosférico, pelo processo de Haber-Bosch (RIBEIRO, 2013), dependente de energia fóssil para suprir a demanda energética necessária à quebra da tripla ligação da molécula de N<sub>2</sub>. Porém, considerando os ecossistemas naturais e culturas como a soja, entre outras, pode-se afirmar que a Fixação biológica de nitrogênio (FBN) é responsável pela maior parte da fixação de

N. A FBN é de extrema importância para a agricultura, pois tem o potencial de reduzir o uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados, resultando em economia para o produtor e mitigação dos impactos negativos sobre o meio ambiente. Além disso, é a principal possibilidade de aporte de N em sistemas agrícolas de baixo uso de insumos, comuns em diversas áreas do Nordeste do Brasil. Estima-se, na cultura da cana-de-açúcar, que mais de 50% do nitrogênio utilizado na cultura sejam provenientes da FBN (LIMA et al., 2021).

No que se refere à cana-de-açúcar, trabalhos realizaram isolamento de bactérias focando em traços de promoção de crescimento vegetal como, por exemplo, a capacidade de fixação de nitrogênio, entre outros (CHAVES et al., 2015; MARTINS et al., 2020; LIMA et al., 2021; ANTUNES et al., 2022). Estes trabalhos têm em comum a busca permanente por isolados de BPCP para recomendação de inoculação da cultura.

Na busca por soluções ecologicamente viáveis e sustentáveis, que possuam baixa utilização de insumos, gastos financeiros e não comprometam a produtividade, a utilização de inoculantes contendo bactérias diazotróficas tem sido cada vez mais presente na agricultura. No Brasil, a Embrapa Agrobiologia iniciou em 1982 os estudos direcionados ao desenvolvimento de um inoculante para a cana (FERREIRA, 2017). Estes estudos resultaram no desenvolvimento de um inoculante microbiológico líquido, específico para o cultivo da cana-de-açúcar, a partir da bactéria *Nitrospirillum amazonense*, anteriormente classificada como *Azospirillum amazonense*, que é uma bactéria fixadora de nitrogênio e promotora de crescimento vegetal (MATOSO, 2020).

Com o nome comercial de Aprinza e após mais de cinco anos de teste em vários tipos de solo e clima, o inoculante foi lançado ao mercado no ano de 2018, em uma parceria da Embrapa Agrobiologia e a Basf e de acordo com estudos realizados pelos pesquisadores responsáveis os ganhos de produtividade na cana-de-açúcar podem chegar a até 18% (EMBRAPA, 2018).

As respostas à inoculação dependem da variedade da cana, devido a características ligadas ao genótipo, como eficiência fotossintética, exigências nutricionais e resistência às condições adversas, além das estirpes bacterianas inoculadas (PEREIRA et al., 2013; CHAVES et al., 2015). A estimativa de economia, para substituir metade da dose recomendada ( $60 \text{ kg N ha}^{-1}$ ) é 150.000 toneladas de N. Algumas pesquisas mostram que é possível substituir 100% do N-fertilizante na variedade de RB867515 no primeiro ano de cultivo, sem redução da produtividade (REIS et al., 2009; BARRETO et al., 2019).

Além dos benefícios devidos à FBN, a cana-de-açúcar pode ser beneficiada pelas BPCP de diversas formas, pela solubilização de fosfatos e zinco (ANTUNES et al., 2022); pela produção de sideróforos e reguladores de crescimento como auxinas, giberelinas e citocininas (LIN et al., 2012; SANTI et al., 2013), obtendo assim ganhos na produtividade e possível redução da adubação nitrogenada (PEREIRA, et al., 2019). O uso de inoculantes também pode auxiliar na

biorremediação, redução da poluição por pesticidas, do escoamento de nitrogênio e fósforo, da eutrofização associada a massas de água e as emissões de gases de efeito estufa do solo. Quando inoculados, esses micro-organismos produzem aumento da biomassa vegetal acima e abaixo do solo, que é vital para a retenção de água, controle de erosão e produção de bioenergia em sistemas convencionais e agroflorestais (ABHILASH et al., 2016).

Entre as gramíneas tropicais, as tentativas de comprovação da FBN através de técnicas isotópicas são mais abundantes para a cana-de-açúcar, mas os resultados são variáveis, sugerindo forte influência de fatores ambientais e/ou do genótipo da planta. Por exemplo, resultados demonstram que algumas variedades cultivadas no Brasil (BAPTISTA et al., 2014; URQUIAGA et al., 2012) e no Uruguai (TAULÉ et al., 2012) podem obter quantidades consideráveis de N atmosférico, mas para a cana-de-açúcar cultivada em outros locais, como na Austrália (BIGGS et al., 2002) e na África do Sul (HOEFSLOOT et al., 2005), não foram encontradas evidências de FBN.

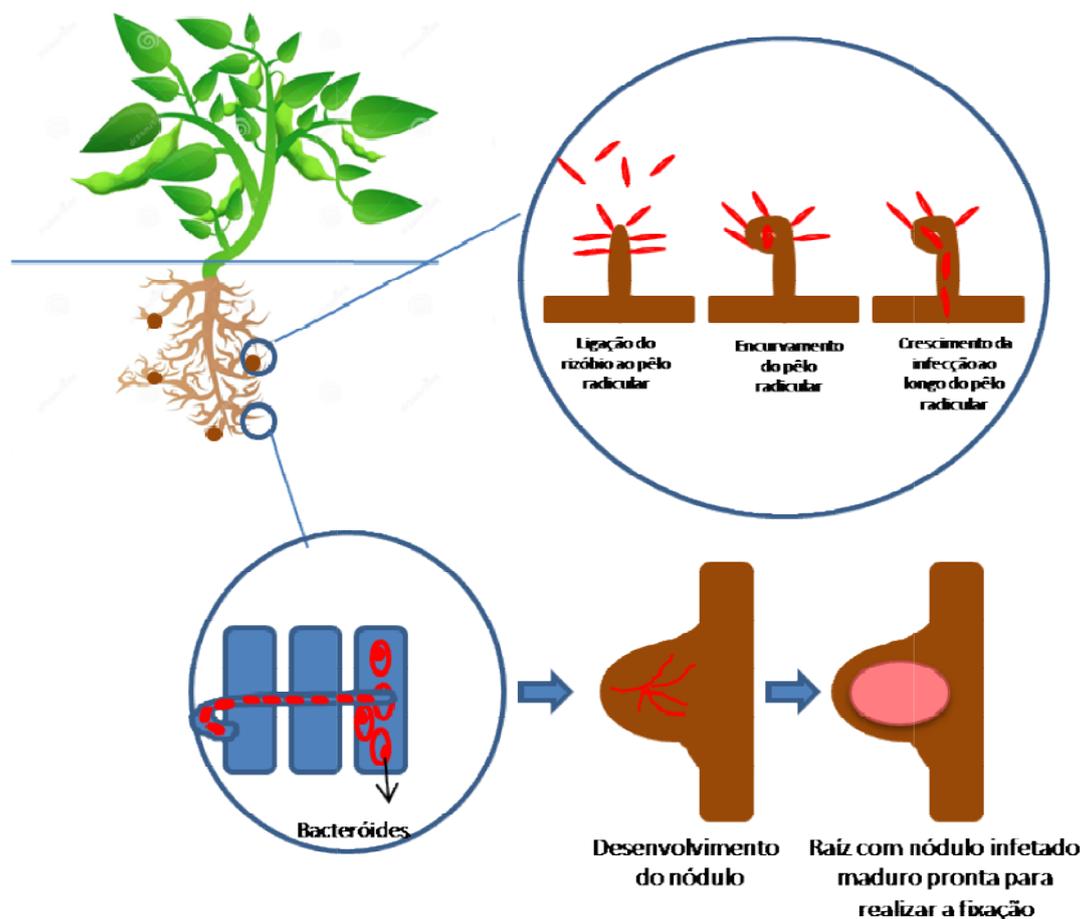
## 2.4.2 Diversidade de rizóbios

Rizóbio é um nome genérico para um grupo diverso de espécies de bactérias há longa data conhecido (desde o século 19) como microssimbiontes de plantas leguminosas, como soja, ervilha e feijões, por exemplo. Essas bactérias induzem nas raízes dessas culturas a formação de um novo tipo de órgão, chamado de nódulo, no qual as bactérias se estabelecem na forma de bacteróide e onde fixam nitrogênio molecular da atmosfera em formas minerais que podem ser utilizadas pelas plantas hospedeiras (Figura 1). A maioria dos rizóbios pertence à classe das alfaproteobactérias, com gêneros como *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*, dentre outros. Tem sido observada uma maior abundância do gênero *Bradyrhizobium*, em relação aos outros gêneros de bactérias que possuem habilidade para induzir a formação de nódulos de plantas leguminosas, em diferentes condições em solos brasileiros (PERRINEAU et al., 2011), norte-americanos (UROZ, et al., 2010; VANINSBERGHE et al., 2015; JONES et al., 2016), solos do Reino Unido (DELMONT et al., 2012; ZHALNINA et al., 2013), entre outros.

Mais recentemente, descobriu-se que algumas espécies da classe betaproteobactérias, dos gêneros *Burkholderia* (atualmente denominadas de *Paraburkholderia*) e *Cupriavidus*, também podem nodular determinadas leguminosas, sendo estas bactérias conhecidas como betarizóbios (SUARÉZ-MORENO et al., 2012; ANDREWS; ANDREWS, 2017). A capacidade de formar nódulos com rizóbios representa um benefício importante para as leguminosas, que podem obter

uma parte importante do N necessário para o crescimento por meio da FBN simbiótica. Os rizóbios se estabelecem nódulos radiculares, que possuem baixa concentração de oxigênio, condição necessária para o processo de FBN, uma vez que o oxigênio é um conhecido inibidor da nitrogenase (AHMAD et al., 2012; ROSENBLUETH et al., 2018).

**Figura 1:** Processo de nodulação de rizóbios em leguminosa.



Adaptado de CNIDUS, 2009

Os alfa e betarizóbios são os habitantes mais conhecidos e os mais estudados dos nódulos de leguminosas (GYANESHWAR et al., 2011). Embora sejam divergentes evolutivos, seus genes simbióticos (*nod* e *nif*) são muito semelhantes, sugerindo transferência lateral (BONTEMPS et al. 2010; DE MEYER et al. 2016).

### 2.4.3 A ocorrência de rizóbios em não leguminosas, com ênfase na cana-de-açúcar

A maior parte das espécies vegetais não é capaz de se associar simbioticamente com rizóbios. Entretanto, há alguns anos, estudiosos sugeriram que rizóbios, principalmente dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, poderiam ser responsáveis por uma parte importante da FBN associada à cana-de-açúcar, mesmo que ainda não tivessem realizado isolamento de membros do gênero *Bradyrhizobium* na cultura (THAWEENUT et al., 2011; BURBANO et al., 2011; FISCHER et al., 2012). Um estudo avaliou o microbioma bacteriano e fúngico associado a plantas de cana-de-açúcar no Brasil e confirmou que a ordem Rhizobiales (que engloba os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*) representa uma parte considerável da população microbiana associada à cultura (SOUZA et al., 2016).

Previamente, bradyrizóbios fotossintetizantes foram isolados de arroz selvagem (*Oryza breviligulata*) na África e na ocasião essas bactérias também foram encontradas em nódulos da leguminosa selvagem *Aeschynomene sensitiva* encontrada nas proximidades do arroz alagado, o que mostrou que leguminosas e não-leguminosas podem compartilhar bactérias simbióticas/associativas (CHARENTREUIL et al. 2000). No delta do Nilo no Egito, a rotação de arroz com trevo é uma prática secular que reduz a necessidade de fertilização da cultura de arroz com N mineral. Embora parte do efeito benéfico do trevo possa ser explicada pelo N fixado por essa cultura em simbiose com *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, o plantio de trevo também enriquece o solo em rizóbios os quais colonizam as plantas de arroz e beneficiam o seu crescimento diretamente (YANNI et al. 1997). Por outro lado, o estudo de Hernández et al. (2021), investigaram rizóbios endofíticos (*Rhizobium* sp. cepa Rpd16) capazes de promover o crescimento de arroz de uma cultivar cubana submetida à monocultura intensiva, sem rotação com leguminosas e sem história prévia de inoculação de rizóbios.

Os resultados obtidos até o momento sugerem que rizóbios e outras bactérias não nodulantes filogeneticamente relacionadas com eles representam um grupo de micro-organismos que deve ser mais bem estudado no sentido da sua aplicação para culturas da família Poaceae, como a cana-de-açúcar. Com base nisso, estratégias novas de cultivo para isolamento de rizóbios de cana-de-açúcar foram aplicadas, o que culminou na obtenção de uma coleção diversa de isolados de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* de raízes de cana-de-açúcar cultivada na área experimental da Embrapa Agrobiologia (ROUWS et al. 2014). A coleção engloba rizóbios clássicos, com capacidade genética de nodular leguminosas, e outras bactérias não nodulantes.

No entanto, foi interessante observar que vários isolados filogeneticamente relacionados com rizóbios puderam ser obtidos pelo cultivo diretamente em meio de cultura, sem o uso de planta isca; vários dos quais sem capacidade nodulífera. Esse tipo de organismo muitas vezes é despercebido nos estudos clássicos com rizóbios que focam em bactérias nodulíferas e merece ser estudado. Bactérias não nodulantes com alto nível de similaridade filogenética com rizóbios

também têm sido encontradas em outros ambientes, como por exemplo, em solos de floresta norteamericanos (VANISBERGHE et al., 2015). Além disso, Rouws et al. (2014), identificaram que o *Bradyrhizobium* foi o melhor gênero de rizóbio encontrado nas três espécies de cana-de-açúcar utilizadas no estudo e que as bactérias deste gênero apresentaram atividade de nitrogenase em ensaio de redução de acetileno, sugerindo que não necessitam de ambiente nodular para fixação de nitrogênio.

Pesquisas vêm evidenciando cada vez mais a importância de rizóbios e espécies relacionadas em nichos diferentes do nódulo de leguminosas, incluindo solo (rizosfera), líquens, endofiticamente, e até em ecossistemas marinhos (OSÓRIO FILHO et al., 2016) e o aumento crescente das espécies de bradyrizóbios descobertas com o tempo (GRONEMEYER; REINHOLD-HUREK, 2018). A presença de rizóbios como bactérias promotoras de crescimento em tecidos internos de várias espécies de gramíneas, como arroz (HERNÁNDEZ et al., 2021) e cana-de-açúcar (MATOS et al., 2017) indicam um potencial biotecnológico desse grupo de micro-organismos para a agricultura que necessita ser explorado.

Embora rizóbios já tenham sido isolados e estudados para cana-de-açúcar em Seropédica, no Rio de Janeiro, (ROUWS et al., 2014; MATOS et al., 2017), ainda falta uma investigação da ocorrência e relevância dessas bactérias em sistemas de produção de cana-de-açúcar em regiões produtoras, como o Nordeste brasileiro, em que a cultura tem grande importância econômica e social.

## **2.5 Técnicas moleculares para acessar a diversidade de rizóbios**

Atualmente, o avanço da tecnologia tem proporcionado que a diversidade de isolados rizobianos seja acessada por meio de técnicas que envolvem o estudo do DNA microbiano. Descrita por Kary Mullis (1983), essas técnicas são embasadas nas reações de PCR (do inglês, polymerase chain reaction, reação em cadeia da polimerase) e proporcionam consideráveis avanços no conhecimento da diversidade e taxonomia dos rizóbios, permitindo uma vasta quantidade de cópias de um determinado gene, ou uma região de interesse, com a amplificação de fragmentos de tamanhos diferentes e não apenas um amplicom. A amplificação de determinadas sequências do DNA de micro-organismos ocorre com o uso de iniciadores (primers) que complementam aquelas localizadas em locais de interesse do genoma. A técnica é usada para diferenciar isolados bacterianos filogeneticamente próximos sendo aplicada para análise genotípica de bactérias diazotróficas de maneira eficiente e para distinguir os isolados abaixo do nível de espécie (MENNA et al., 2009).

Os estudos envolvendo essa técnica são diversos. Como exemplo, Antunes et al. (2017) em estudo da diversidade bacteriana associada à cana-de-açúcar, com o objetivo de auxiliar na obtenção de bactérias eficientes para promoção de crescimento das plantas, fizeram isolamento de bactérias diazotróficas de folhas e colmos de cana-de-açúcar das variedades RB867515; RB1011 e RB92579, para análises bioquímicas e moleculares, visando à formulação de inoculantes microbianos com potencial de promover crescimento vegetal.

A amplificação de fragmento do gene *nifH*, foi proposto primeiramente por Mothapo et al. (2013), indicando a presença da capacidade de FBN em bactérias. Como faz parte de um conjunto de genes responsáveis pelo processo da fixação biológica, é bastante utilizado nos estudos de relações filogenéticas entre bactérias diazotróficas, já que apresenta a vantagem de ser um gene funcional e permite a correlação entre a estrutura e a função da comunidade microbiana estudada. Por esse motivo, o gene *nifH* tem sido largamente estudado por diversos pesquisadores, de forma independente, buscando uma melhor compreensão de rizóbios (OROSCO-MOSQUEDA et al., 2018). Dong et al. (2018), por exemplo, amostraram raízes de quatro espécies ancestrais de cana-de-açúcar (dois genótipos por espécie) e duas cultivares, utilizando sequenciamento do gene 16S rRNA e *nifH* para caracterizar as comunidades bacterianas endofíticas radiculares e a diversidade diazotrófica e os resultados demonstram a diversidade das comunidades microbianas em diferentes germoplasmas e auxiliam no esclarecimento do mecanismo de FBN na cana-de-açúcar.

Lima et al. (2021) realizou trabalho com objetivo avaliar a diversidade genética da comunidade bacteriana associada a diferentes genótipos de cana-de-açúcar utilizando os genes 16S rRNA e *nifH* e conseguiram identificar os gêneros *Burkholderia* sp., *Pantoea* sp., *Erwinia* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. na variedade RB 867515 e os gêneros *Bacillus* sp. e *Dyella* sp. apenas na variedade RB92579. Ainda na cultura da cana-de-açúcar, Matos et al. (2021) realizaram uma abordagem filogenômica para estudar peculiaridades de cepas de *Bradyrhizobium* em relação ao conteúdo do gene *nifH* a fim de revelar características genéticas que possibilitem fixação de N<sub>2</sub> de vida livre (FNVL) em *Bradyrhizobium* spp. e observaram que todas as cepas avaliadas carregam um agrupamento de genes *nif* ancestral ‘não simbiótico’. E o *Bradyrhizobium sacchari* também contém um segundo cluster de genes *nif* ‘simbiótico’, característica observada em apenas três dos 156 genomas avaliados. Os dados sugerem que as raízes da cana-de-açúcar abrigam diversos *Bradyrhizobium* spp. que são geneticamente adaptados a um ambiente dinâmico onde plantas hospedeiras leguminosas e não leguminosas estão disponíveis alternadamente.

A utilização de análises com genes housekeeping está presente em estudos envolvendo diversas culturas: de gramíneas como cana (AVONTUUR et al., 2022) e de leguminosas como soja (AYUBA et al., 2021), fava (ZHANG et al., 2022) e feijão-comum (MOURA et al., 2022). Esses

trabalhos corroboram a importância do uso de técnicas que envolvem o estudo do DNA microbiano para proporcionar o conhecimento da diversidade de isolados rizobianos no solo adjacente, rizosfera ou de dentro dos tecidos da planta.

A inoculação com bactérias promotoras de crescimento também pode promover aumento na produtividade das culturas por modificar a anatomia e morfologia dos tecidos das raízes das plantas, como observado por Rondina et al. (2020), que avaliando tratamentos sem inoculação, com inoculação e com coinoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* em soja, perceberam que houve aumento do comprimento e densidade de da raiz, incidência e comprimento de pêlos radiculares nos tratamentos com coinoculação ou inoculados com *Bradyrhizobium* spp. e nos tratamentos onde não havia inoculação as médias foram sempre menores em relação aos parâmetros avaliados, mostrando assim que a inoculação provoca modificações no tecido da planta que permitem uma maior absorção de nutrientes e conseqüentemente eleva a produtividade da cultura.

## REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P. C. ; DUBEY, R.K. TRIPATHI, V.; GUPTA, V.K.; SINGH, H.B. Plant Growth-Promoting Microorganisms for Environmental Sustainability. **Trends in Biotechnology**, 34, 847–850,2016a.
- ABHILASH, P.C. *et al.* Sustainability of crop production from polluted lands. **Energy Ecology and Environment**, v.1, p. 54–65, 2016b. <https://doi.org/10.1007/s40974-016-0007-x>
- AHMAD, N.; YASMEEN, R.; REHMAN, A.; SALEEM, M.; REHMAN, A; ULLAH, H. Effect of *Grewia oppositifolia* leaves and conventional oil cakes as feed supplement on cell wall intake, digestibility and nitrogen retention in sheep. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 28, n. 1, p. 69-74, 2012.
- ALEMNEH, A.A.; CAWTHRAY, G.R.; ZHOU, Y.; RYDER, M. H.; DENTON, M. D. Ability to produce indole acetic acid is associated with improved phosphate solubilising activity of rhizobacteria. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 3825–3837, 2021  
<https://doi.org/10.1007/s00203-021-02364-w>
- ANDREWS, M. ; ANDREWS, M. E. Specificity in Legume-Rhizobia Symbioses. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, n. 4, p. 705, 2017.  
<https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
- ANGEL, R. *et al.* Evaluation of Primers Targeting the Diazotroph Evaluation of Primers Targeting the Diazotroph Functional Gene and Development of NifMAP – A Bioinformatics Pipeline for Analyzing *nifH* Amplicon Data. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, n.703,p. 1-15, 2018.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00703>
- ANTUNES, J. E . *et al.* Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Genetics and Molecular Research**. v.6, p. 1-10, 2017.
- ANTUNES, J. E. *et al.* Isolation and Characterization of Plant Growth-Promotion Diazotrophic Endophytic Bacteria Associated to Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Grown in Paraíba, Brazil.**Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 65, 2022. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2022200439>
- ARKHIPOVA, T.N.; VESELOV, S.U.; MELENTIEV, A.I.; MARTYENENKO, E. V.; KUDOYAROVA, G. R. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. **Plant and Soil**, v. 272, p. 201–209, 2005. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5047-x>
- AVONTUUR, J.R. *et al.* *Bradyrhizobium altum* sp. nov., *Bradyrhizobium oropedii* sp. nov. and *Bradyrhizobium acaciae* sp. nov. from South Africa show locally restricted and pantropical nodA phylogeographic patterns. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.167, 2022.  
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107338>
- AYUBA, J.; JAISWAL, S.K.; MOHAMMED, M.; DENWAR, N. N.; DAKORA, F. D. Adaptability to local conditions and phylogenetic differentiation of microsymbionts of TGxsoybean genotypes in the semi-arid environments of Ghana and South Africa, **Systematic and Applied Microbiology**, v. 44. n. 6, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126264>

BAPTISTA, R. B. *et al.* Variations in the  $^{15}\text{N}$  natural abundance of plant-available N with soil depth: Their influence on estimates of contributions of biological  $\text{N}_2$  fixation to sugar cane. **Applied Soil Ecology**, v. 73, p. 124–129, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.08.008>

BARRETO, M. C. *et al.* Inoculation of endophytic diazotrophic bacteria in micropropagated seedlings of sugarcane (*Saccharum officinarum* sp.) **Environmental Sustainability**, v. 2, n.1, p. 5-12, 2019. <https://doi.org/10.1007/s42398-019-00044-6>

BATISTA, B.D. *et al.* Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v. 20, p. 33–42, 2018.

BIGGS, I. M.; STEWART, G. R.; WILSON, J. R.; CRITCHLEY, C. N natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. **Plant and Soil**, v. 238, n. 1, p. 21–30, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:10142804207795>

CARNAÚBA, B. A. O nitrogênio e a cana-de-açúcar. **STAB- Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 8, n. 3/4, p. 24-41, 1990.

CAVALCANTI, M.I. *et al.* Maize growth and yield promoting endophytes isolated into a legume root nodule by a cross-over approach. **Rhizosphere**, v. 15, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100211>

CHARENTREUIL, C. *et al.* Photosynthetic Bradyrhizobia Are Natural Endophytes of the African Wild Rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.12, p. 5437-5447, 2000. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5437-5447.2000>

CHAVES, V. A. *et al.* 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. <https://doi.org/10.1590/01000683rbc20151144>

CHERUBIN, M.R. *et al.* Crop residue harvest for bioenergy production and its implications on soil functioning and plant growth: A review. **Scientia Agricola**, v.75, p. 255–272, 2018.

CNIDUS. Endosimbiosis (2): *Rhizobium*, a mediacamino de organelas celulares. **La ciência y sus demônios**, 2009.

Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 26 mai. 2022.

COMPANT, S.; SAMAD, A.; FAIST, H. ; SESSITSCH, A. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application, **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 29-37, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>.

DE MEYER, S. E. *et al.* Symbiotic Burkholderia species show diverse arrangements of nif/fix and nod genes, and lack typical high affinity cytochrome cbb3 oxidase genes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 29, p. 609-619, 2016. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-16-0091-R>

DO VALE, D. W.; PADRO, R DE M.; AVALHÃES, C. C.; HOJO, R. H. Omissão de macronutrientes na nutrição e no crescimento da cana-de-açúcar cultivada em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6, n. 2, p.189-196, 2011.

DÖBEREINER, J.; ALVAHYDO, R. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II-Influência das diversas partes do vegetal. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 19, p. 251–258, 1959.

DOBERMANN, A. Nutrient use efficiency measurement and management. In: International Fertilizer Industry Association (Ed.). Fertilizer best management practices: general principles, strategy for their adoption and voluntary initiatives vs regulation, p. 1-28, 2007.

DONG, M.; YANG, Z.; CHENG, G.; PENG, L. XUL. Q.; XUL, J. Diversity of the Bacterial Microbiome in the Roots of Four *Saccharum* Species: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, and *S. officinarum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 26, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00267>

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Inoculante para fixação de nitrogênio para cana é lançado pela Basf e Embrapa - Notícias, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/39688081/inoculante-para-fixacao-de-nitrogenio-para-cana-e-lancado-pela-basf-e-embrapa>. Acesso em: 27 mai. 2022.

FERREIRA, T. E. **Decomposição da palha de cana-de-açúcar em área de recolhimento variável sob adubação nitrogenada mineral ou inoculação com bactérias diazotróficas**. 2017. 90 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2017.

GOMES, M, F; FERREIRA, L, J. Políticas Públicas e os objetivos do desenvolvimento sustentável. **Revista Direito e Desenvolvimento**, v. 9, n. 2, p. 155-178, 2018

GOUDA, S.; KERRY, R. G.; DAS, G.; PARAMITHIOTIS, S.; SHIN, H.; PATRA, J. K. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, v. 206, p. 131–140, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>.

GRONEMEYER, J. L.; REINHOLD-HUREK, B. Diversity of Bradyrhizobia in Sub Sahara Africa: A Rich Resource. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, p. 2194, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02194>

GYANESHWAR, P. *et al.* Legume-nodulating betaproteobactéria: diversity, host range and future prospects. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, p. 1276-1288, 2011. <https://doi.org/10.1094/mpmi-06-11-0172>>

HANEY, R. L.; HANEY, E.B.; SMITH, D. R.; HARMEL, R. D.; WHITE, M. J. The soil health tool—Theory and initial broad-scale application, **Applied Soil Ecology**, v. 125, p. 162-168, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.07.035>

HARTMAN, K.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; WITWER, R. A.; BANERJEE, S.; WALSER, J. C.; SCHLAEPPI, K. Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. **Microbiome**, v. 6, p. 1–15, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0389-9>

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. 277, n. 1–2, p. 85–96, 2005.

<https://doi.org/10.1007/s11104-005-2581-0>

HERRIDGE, D.F.; GILLER, K.E.; JENSEN, E.S. Quantifying country-to-global scale nitrogen fixation for grain legumes II. Coefficients, templates and estimates for soybean, groundnut and pulses. **Plant and Soil**, v. 474, p. 1-15, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11104-021-05166-7>

IEA- INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Disponível em:

<http://www.iea.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=15925>. Acesso em: 16 mar. 2022.

JENSEN, E.S.; CARLSSON, G. ; HAUGGAARD-NIELSEN, H. Intercropping of grain legumes and cereals improves the use of soil N resources and reduces the requirement for synthetic fertilizer N: A global-scale analysis. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 40, p. 5, 2020.

<https://doi.org/10.1007/s13593-020-0607-x>

JONES, F. P.; CLARK, I. M.; KING, R.; SHAW, L.J.; WOODWARD, M. J.; HIRSCH, P. R. Novel European free-living, non diazotrophic *Bradyrhizobium* isolates from contrasting soils that lack nodulation and nitrogen fixation genes – a genome comparison. **Scientific Reports**, v. 6, p. 25858, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep25858>

KHAN, A.L.; WAQAS, M.; KANG, S.M. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, p. 689–695, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-4002-7>

KARY B. MULLIS- AUTOBIOGRAPHY. (1993). Disponível em: Nobelprize org.

<http://nobelprizeorg/chemistry/laureate/1993/mullis-aubio.hnnJ>. Acesso em: 09 jun. 2022.

KUMAR, A.; SINGH, S.; GAURAV, A.K.; SRIVASTAVA, S; VERMA, J.P. Plant growth-promoting bacteria: Biological tools for the mitigation of salinity stress in plants. **Frontiers of Microbiology**, v. 11, p. 1216, 2020.

LANDELL, M.G. *et al.* Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. **Instituto Agrônomo de Campinas**, 17p. (IAC. Documentos, 109), 2012.

LANDELL, M.G.; CAMPANA, M.P.; FIGUEIREDO, P. Sistema de Multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. **Instituto Agrônomo**, 2ª rev., 2013. 16p. (Documentos IAC, 109), 2013.

LI, Y. *et al.* Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for the dimorphic fungus *Nomuraea rileyi* conidiation, dimorphism transition, resistance to oxidative stress, pigmented microsclerotium formation, and virulence. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 931, 2016.

LIMA, D.R. *et al.* Genetic diversity of N-fixing and plant growth-promoting bacterial community in different sugarcane genotypes, association habitat and phenological phase of the crop. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 1089–1105, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02103-7>

- LIOTTI, R. G. ; FIGUEIREDO, M. I. ; SILVA, G. F.; MENDONÇA, E. A. ; SOARES, M. A. Diversity of cultivable bacterial endophytes in *Paullinia cupana* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. **Microbiological Research**, v. 207, n. 1, p. 8-18, 2018.
- MACKINDER, L. C. M. The Chlamydomonas CO<sub>2</sub>: concentrating mechanism and its potential for engineering photosynthesis in plants. **New Phytologist**, v. 217, n.1, p. 54-61, 2018.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/ira-podera-triplicar-exportacao-de-ureia-para-o-brasil>. Acesso em: 16 mar. 2022.
- MARTINS, D.S.; REIS, V.M.; SCHULTZ, N. Both the contribution of soil nitrogen and of biological N<sub>2</sub> fixation to sugarcane can increase with the inoculation of diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 454, p. 155–169, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04621-1>
- MATOS, G. F. *et al.* *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov., a legume nodulating bacterium isolated from sugarcane roots. **Archives of Microbiology**, v. 199, p. 1251–1258, 2017. <https://doi.org/10.1007 / s00203-017-1398-6>
- MATOS, G.F., ROUWS, L.F., SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; BALDANI, J.I. Evolution and function of nitrogen fixation gene clusters in sugarcane associated *Bradyrhizobium* strains. **Environmental Microbiology**, v. 23, p. 6148–6162, 2021. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15533>
- MATOSO, E. S. **Potencial da mistura de cinco bactérias diazotróficas no desenvolvimento e produção de cana-de-açúcar**. 2020. 178 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.
- MELO, H. F. *et al.* Comparison of water and osmotic potentials on *Vigna unguiculata* stress response. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 44, 2020.
- MOTHAPO, N.; GROSSMAN, J. M.; MAUL, J. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch genotypes, **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 201-213, 2013.
- MOURA, F.T.; RIBEIRO, R.A.; HELENE, L.C.F.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. So many rhizobial partners, so little nitrogen fixed: The intriguing symbiotic promiscuity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Symbiosis**, v. 86, p. 169–185, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13199-022-00831-6>
- OLIVEIRA, M. W.; MACÊDO, G. A. R.; MARTINS, J. A.; SILVA, V. S. G; OLIVEIRA, A. B. Mineral nutrition and fertilization of sugarcane. In: OLIVEIRA, A. B. Sugarcane: Technology and research. **INTECH – Open Science**, p. 169-191, 2018.
- OROZCO-MOSQUEDA, M.; DEL, C.; DEL CARMEN ROCHA-GRANADOS, M.; GLICK, B. R.; SANTOYO, G. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. **Microbiology Research**, v. 208, p. 25–31, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.005>
- OSÓRIO FILHO, B. D.; BINZ, A.; LIMA, R. F.; GIONGO, A; SÁ, E. L. S. Promoção de crescimento de arroz por rizóbios em diferentes níveis de adubação nitrogenada. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 478-485, 2016. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141066>

OTTO, R. *et al.* Effect of previous soil management on sugarcane response to nitrogen fertilization. **Scientia Agricola**, v. 76, p. 72–81, 2019.

PALÁCIO DO PLANALTO. Produção nacional de fertilizantes. Disponível em: [https://www.gov.br/planalto/pt-br/assuntos/assuntos-estrategicos/documentos/estudos-estrategicos/sae\\_publicacao\\_fertilizantes\\_v10.pdf/@download/file/SAE\\_Publicacao\\_Fertilizantes\\_V12.pdf](https://www.gov.br/planalto/pt-br/assuntos/assuntos-estrategicos/documentos/estudos-estrategicos/sae_publicacao_fertilizantes_v10.pdf/@download/file/SAE_Publicacao_Fertilizantes_V12.pdf). Acesso em : 05 abr. 2022

PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; SCHULTZ, N.; REIS, V. M. Sugarcane Productivity as a Function of Nitrogen Fertilization and Inoculation with Diazotrophic Plant Growth-Promoting Bacteria. **Sugar Technology**, v. 21, n. 1, p. 71-82, 2019. <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0638-7>

PERRINEAU, M. M. ; ROUX, C. LE, FARIA, S. M. DE; BALIEIRO, F. C.; GALIANA, G.; PRIN, Y.; BÉNA, G. Genetic diversity of symbiotic *Bradyrhizobium elkanii* populations recovered from inoculated and non-inoculated *Acacia mangium* field trials in Brazil. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 34, n. 5, p. 376-384, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2011.03.003>>

PIETRO SOUZA, W. *et al.* Mercury resistance and bioremediation mediated by endophytic fungi. **Chemosphere**, v. 240, p. 1-42, 2020.

PORTO, L. S.; COSTA, R. R. G. F.; SILVA, F. V.; ROCHA, F. S. Micro-organismos eficazes e *Azospirillum* brasileiro: efeitos sobre a produtividade do milho. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, v. 9, n. 2, p. 11-21, 2020.

REZKI, S.; CAMPION, C.; SIMONEAU, P.; JACQUES, M-A; SHADE, A.; BARRET, M. Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. **Plant Soil**, v. 422, p. 67-79, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3451-2>

RHO, H.. KANDELL, S., CANTILLO, J., DOTYL, S. L.; KIML, S. Do endophytes promote growth of host plants under stress? A meta- analysis on plant stress mitigation by endophytes. **Microbial ecology**, v. 75, n. 2, p. 407-418, 2018.

RIBEIRO, D. Processo de Haber-Bosch. **Revista de Ciência Elementar**, v.1, n.1, 2013

ROSENBLUETH, M., MARTINEZ, J., RAMIREZ-PUEBLA, S., VERA-PONCE DE LEÓN, A., ROSAS-PEREZ, T., BUSTAMANTE-BRIT, R. Endosymbiotic microorganisms of scalein sects. **TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 21, p. 53–69, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.08.006>

ROUWS, L. F. *et al.* Endophytic *Bradyrhizobium* spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. **Environmental Microbiology Reports**, v. 6, n. 4, p. 354–363, 2014. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12122>

SALEEM, M.; ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; SHAHID, M. Impact of lead tolerant plant growth promoting rhizobacteria on growth, physiology, antioxidant activities, yield and lead content in sunflower in lead contaminated soil, **Chemosphere**, v. 195, p. 606-614, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.117>

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, p. 743-767, 2013. <https://doi.org/10.1093/aob/mct048>

- SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. D.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes, **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>
- SARABIA, L.D. *et al.* High-mass-resolution MALDI mass spectrometry imaging reveals detailed spatial distribution of metabolites and lipids in roots of barley seedlings in response to salinity stress. **Metabolomics**, v.14, p.63, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1359-3>
- SHARMA, I.P.; SHARMA, A.K. Physiological and biochemical changes in tomato cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot nematode. **Symbiosis**, v.5, n. 71, p. 175–183, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13199-016-0423-x>
- SILVA; S. P. ; COSTA, A. D. ; SANTOS, S. L. ; LAIA, M. L. A Importância da biomassa na matriz energética brasileira. **Pensar Acadêmico** , v.19, n. 2, p. 557-583, 2021.
- SILVEIRA, A.P., SALA, V.M., CARDOSO, E.J., LABANCA, E.G.; CIPRIANO, M.A. Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation. **Applied Soil Ecology**, v. 107, p. 313–319, 2016.
- SHAIKH, S., WANI, S.; SAYYED, R. Impact of interactions between rhizosphere and rhizobacteria: a review, **Journal of Bacteriology & Mycology**, v. 5, p. 1058, 2018.
- SOUZA, R. S. *et al.* Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome, **Scientific Reports**, v. 6, p. 28774, 2016. <https://doi.org/10.1038 / srep28774>
- TAULÉ, C. *et al.* 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, p. 35–49, 2012.
- ULLAH, S. *et al.* Substituting ecological intensification of agriculture for conventional agricultural practices increased yield and decreased nitrogen losses in North China, **Applied Soil Ecology**, v. 147, 2020.
- VISHWAKARMA, K.; KUMAR, N.; SHANDILYA, C.; MOHAPATRA, S.; BHAYANA, S.; VARMA, A. Revisiting plant–microbe interactions and microbial consortia application for enhancing sustainable agriculture: a review. **Frontiers in Microbiology**, v.11, p.1–21, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.560406>
- WANG, Y.; YIN, W.; ZENG, J. Global convergence of ADMM in Non convex non smooth optimization. **Journal of Scientific Computing**, v.78, p. 29-63, 2019.
- YANNI, Y. G. *et al.* Natural endophytic association 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. <https://doi.org/10.1023/A:1004269902246>
- ZHALNINA, K. *et al.* *Nitrososphaera* and *Bradyrhizobium* are inversely correlated and related to agricultural practices in long-term field experiments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 104–104, 2013. <https://doi.org/10.3389 / fmicb.2013.00104>
- ZHANG, J *et al.* *Rhizobium sophorae* is the dominant rhizobial symbiont of *Vicia faba* L. In North China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 45, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2021.126291>

ZUANAZZI, J.A.S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1421-1428, 2010.

**Capítulo I: PROSPECÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE RIZÓBIOS ASSOCIADOS À RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADA SOLTEIRA OU EM CONSÓRCIO COM LEGUMINOSAS**

## Capítulo 1: PROSPECÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE RIZÓBIOS ASSOCIADOS À RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADA SOLTEIRA OU EM CONSÓRCIO COM LEGUMINOSAS

### Resumo

Bactérias do grupo dos rizóbios são capazes de nodular e fixar nitrogênio em simbiose com leguminosas, mas pesquisas recentes mostraram sua presença em raízes de não leguminosas, como na cana-de-açúcar. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi realizar uma prospecção e caracterização de rizóbios endofíticos em raízes de cana-de-açúcar, da variedade RB92579, cultivada em solo com longo histórico de exploração canavieira, em cultivo solteiro ou em consórcio com leguminosas. Foi montado um experimento em campo na Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), em que os tratamentos corresponderam ao cultivo da cana-de-açúcar em consórcio com leguminosas (feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.); amendoim, *Arachis hypogaea* L., e soja, *Glycine max* (L.) Merr.), mais um controle de cultivo de cana solteira. Foram coletadas raízes brancas não-lignificadas de plantas jovens (5 a 6 meses) da cana-de-açúcar. Pedacinhos de raiz não danificados foram cuidadosamente lavados e depois desinfestados superficialmente. Extratos foram obtidos pela maceração de raízes em almofariz estéril. Foram utilizadas as leguminosas dos sistemas de consórcio como plantas isca para captura de rizóbios (feijão-caupi, amendoim e soja). Plântulas das leguminosas foram transferidas para tubos de 50 ml com solução de Norris agarizadainclinada e inoculadas com alíquotas de 1 ml da suspensão de raiz de cana-de-açúcar. Aos 35 dias após a inoculação, a ocorrência de nodulação foi avaliada e procedeu-se ao isolamento de bactérias de nódulos utilizando meio específico para rizóbios. Os isolados foram avaliados conforme características fenotípicas das colônias e construído o dendograma de similaridade por agrupamento e também testados quanto a capacidade de promoção de crescimento. Foram seqüenciados o gene 16S rRNA e avaliada a variabilidade genética dos isolados por meio de reação de BOX-PCR e GTG5. No primeiro ensaio com plantas isca, só houve formação de nódulos em feijão-caupi inoculado com a suspensão preparada a partir das raízes de cana cultivada em consórcio com esta leguminosa. Este resultado indica a inexistência de populações de rizóbios com capacidade de nodular a soja e o amendoim nos tecidos da cana, assim como demonstra que foi necessário o cultivo do feijão-caupi para estimular a presença de seus microssimbiontes nas raízes da gramínea, provavelmente por estimular as populações naturalmente estabelecidas no solo. Os nódulos obtidos geraram uma coleção de 20 rizóbios autenticados, sendo 4 isolados classificados como *Bradyrhizobium* e 7 como *Rhizobium* por meio do sequenciamento do gene 16SrRNA. Considerando uma similaridade de 100%, esses isolados podem ser agrupados em 8 grupos distintos. Com a realização da avaliação da variabilidade genética obtida por meio do BOX-PCR e GTG5, foi observado que os isolados possuem baixa diversidade genética. Dessa forma, a cana-de-açúcar cultivada em consórcio com feijão-caupi abriga populações de rizóbios provenientes desta leguminosa e que dependem dela para se estabelecerem no solo.

Palavras-chave: Bactérias endofíticas. Caracterização em meio de cultura. Gramínea C4. *Saccharum* spp.

## PROSPECTING AND CHARACTERISTICS OF RHIZOBIA ASSOCIATED WITH SUGARCANE ROOTS IN SINGLE GROWTH OR IN INTERCROPED WITH LEGUMES

### Abstract

Bacteria from the rhizobia group can nodulate and are based on non-legume plant bases, but recent research has shown their presence in non-legume roots, including sugarcane roots. In this context, the objective of this work was to carry out a prospection and characterization of endophytic rhizobia in sugarcane roots, of the variety RB92579, cultivated in soil with a long host of sugarcane exploration, in single crops or in consortia with legumes. A field experiment was carried out at the Carpina Sugarcane Experimental Station (EECAC), in which the treatments corresponding to the cultivation of sugarcane in consortium with legumes (cowpea, *Vigna unguiculata* (L.), peanut, *Arachis hypogaea* L., and soybean, *Glycine max* (L.) Merr.), plus a single sugarcane crop control. Non-lignified white roots of young plants (5 to 6 months) of sugarcane were collected. Undamaged root pieces were identified and then superficially disinfected. Extracts were obtained by steeping roots in sterile pestles and mortars. Legumes used in intercropping systems were used as bait plants to capture rhizobia (cowpea, peanut and soybean). Legume seedlings were transferred to 50 ml tubes with slanted Norris agarized solution and inoculated with 1 ml aliquots of the sugarcane root suspension. At 35 days after inoculation, the occurrence of nodulation was evaluated, and bacteria were isolated from nodules using specific medium for rhizobia. The isolates were evaluated according to the phenotypic characteristics of the colonies and the dendrogram of similarity by cluster was constructed and also tested for the ability to promote growth. The 16S rRNA gene was sequenced and the genetic variability of the isolates was evaluated by means of BOX-PCR and GTG5 reaction. In the first trial with bait plants, nodules were only formed in cowpea inoculated with the suspension prepared from the roots of sugarcane cultivated in consortium with this legume. This result indicates the lack of rhizobia populations capable of nodulating soybeans and peanuts in sugarcane tissues, as well as demonstrating that cowpea cultivation was necessary to stimulate the presence of their microsymbionts in grass roots, probably by stimulating populations naturally established in the soil. The obtained nodules generated a collection of 20 authenticated rhizobia, being 4 isolates classified as *Bradyrhizobium* and 7 as *Rhizobium* by sequencing the 16SrRNA gene. Considering a similarity of 100%, these isolates can be grouped into 8 distinct groups. With the evaluation of the genetic variability obtained through BOX-PCR and GTG5, it was observed that the isolates have low genetic diversity. Thus, sugarcane cultivated in consortium with cowpea harbors populations of rhizobia from this legume that depend on it to establish themselves in the soil.

**Keywords:** Endophytic bacteria. Characterization in culture medium. C4 grasses. *Saccharum* spp.

### 3.1 Introdução

Gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* são conhecidos por seu papel como microssimbiontes de diversas plantas da família Fabaceae, sendo responsáveis pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em nódulos formados por essas plantas (POOLE; RAMACHANDRAN; TERPOLILLI; 2018). Porém, diversos trabalhos mostram que essas bactérias também estão presentes em raízes de não leguminosas, como em arroz (YANNY et al; 1997 YANNY et al., 2001; HERNANDEZ et al., 2021) e na cana-de-açúcar (MENEZES-JUNIOR et al., 2019; ROUWS et al. 2014; SOUZA et al., 2016). Além disso, já foi determinado que algumas gramíneas até podem ser beneficiadas com a inoculação com rizóbios, como o arroz (OSORIO FILHO et al, 2014), o milho (HAHN et al, 2013) e o trigo (BÉCQUER et al., 2012). Alguns trabalhos mostraram que isolados de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* associados à cana-de-açúcar possuíam filotipos de DNA *nifH*, confirmando a capacidade de fixar nitrogênio dessas bactérias (BURBANO et al., 2011; THAWEENUT et al., 2011; FISCHER et al., 2012). Além disso, Rouws et al. (2014) identificaram que *Bradyrhizobium* foi o melhor gênero, em relação a promoção de crescimento de três espécies utilizadas em seu estudo, e que as bactérias deste gênero apresentaram atividade de nitrogenase *in vitro*, sugerindo que não necessitam de ambiente nodular para fixação de nitrogênio.

A composição da comunidade microbiana associada às raízes das plantas pode ser influenciada pelo genótipo do hospedeiro (BERENDSEN et al., 2012; BULGARELI et al., 2012). Na cana-de-açúcar, essas comunidades podem diferir entre espécies de *Saccharum* spp. No Nordeste do Brasil, região em que os solos são cultivados com cana-de-açúcar há praticamente 5 séculos, a variedade de cana de açúcar mais utilizada atualmente é a RB92579, que correspondente a 39,97% da área cultivada (RIDESA, 2015). É uma variedade com alta produtividade agrícolas e industrial, mas exigente em relação ao uso de insumos para atingir metas produtivas, o que torna importante a busca por tecnologias menos dependentes de fertilizante industriais, no cenário atual de necessidade de restrição ao uso de combustíveis fósseis (GARIBALDI et al., 2017).

Menezes-Junior et al., (2019), avaliando a comunidade de *Bradyrhizobium* sp. na endosfera e rizosfera de duas cultivares comerciais de cana-de-açúcar (RB867515 e IACSP95-5000) concluíram que havia presença de genótipos abundantes tanto na rizosfera quanto na endosfera de ambas as cultivares, confirmando a natural presença de diversas espécies de *Bradyrhizobium* spp. nos sistemas radiculares da cana-de-açúcar (principalmente na rizosfera) e indicando que certos filotipos desta bactéria têm uma afinidade especial para a colonização de raízes de cana-de-açúcar.

Diante disso, foi desenvolvida a hipótese de que o longo histórico de cultivo de cana-de-açúcar nos solos anteriormente ocupados pela floresta tropical úmida da Zona da Mata de

Pernambuco certamente condicionou as populações de micro-organismos presentes nestes solos, sendo possível que tais efeitos se estendam às populações de rizóbios. Além disso, como o consórcio com leguminosas de grãos vem chamando a atenção como forma de aumentar os aportes de N e de renda em cultivos de cana (SOLANKI et al., 2017; HE et al., 2018), também hipotetizou-se que a presença de leguminosas nodulantes nas entrelinhas da cana-de-açúcar irá estimular o aumento de determinadas populações de rizóbios, a depender do espectro de microssimbiontes de cada espécie vegetal. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi prospectar e caracterizar rizóbios endofíticos em raízes de cana-de-açúcar, da variedade RB92579, em cultivo solteiro ou em consórcio com leguminosas de grãos, cultivadas em solos com longo histórico de exploração canavieira.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Coleta de raízes de cana-de-açúcar cultivada em consórcio com leguminosas**

Foi montado um experimento em campo na Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), que está localizada no município de Carpina. O município de Carpina está localizado na região da Mata Norte de Pernambuco, com altitude de 180 m e com coordenadas geográficas de 7° 51' 04'' S e 35° 14' 27'' W. O clima de Carpina, de acordo com a classificação de Köppen, é do tipo "As", tropical chuvoso com estação seca de verão, temperatura média de 24,2 °C (BELTRÃO et al., 2005) e precipitação média anual de 1.400 mm (CPRM, 2005).

O solo da área experimental é classificado como argissolo vermelho amarelo distrocoeso com textura franca arenosa (SANTOS et al., 2013). A determinação de atributos químicos e da granulometria (Tabela 1) foram feitas em amostras coletadas nas camadas de 0 a 20, 20 a 40 e 40 a 60 cm de profundidade, seguindo a metodologia descrita em Embrapa (2017). O pH foi determinado em água (1:2,5);  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  foram extraídos com  $\text{KCl}$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  e determinados por titulação;  $\text{K}^{+}$  e  $\text{Na}^{+}$  foram extraídos com o extrator Mehlich 1 e determinados por fotometria de chama; P também foi extraído com o extrator Mehlich 1, sendo determinado por espectrofotometria; C orgânico foi extraído com dicromato de potássio e determinado por titulometria. Para determinação da composição granulométrica do solo, foram coletadas amostras deformadas na profundidade de 0-20 cm, em zig-zag, com o auxílio do trado. Nas amostras foi realizada a análise de granulometria do solo, quantificando as frações areia, silte e argila pelo método do densímetro, segundo a metodologia da Embrapa (2009).

A cana-de-açúcar, variedade RB92579, foi cultivada em um sistema de consórcio com leguminosas de grãos, utilizando como sementes rebolos com três gemas. O experimento foi conduzido em esquema fatorial 4x2, utilizando um delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. O primeiro fator correspondeu aos tratamentos de plantio da cana-de-açúcar em consórcio com três espécies de leguminosas (feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., variedade IPA 207; amendoim, *Arachis shypogaea* L., variedade BR1 e soja, *Glycine max* (L.) Merr., variedade Monsoy) mais um controle com cana-de-açúcar em cultivo solteiro (Figura 1). O segundo fator correspondeu à adubação nitrogenada, sendo um com N (adubação padrão) e outro sem N.

**Tabela 1.** Caracterização química e física de amostras de solo da área experimental antes do preparo do solo para plantio da Estação Experimental do Carpina, Pernambuco.

Determinações	Profundidade (cm)			Determinações	Profundidade (cm)		
	0-20	20-40	40-60		0-20	20-40	40-60
pH (H <sub>2</sub> O)	6,00	5,60	5,50	V(%)	47,06	40,88	24,12
M.O (%)	1,71	1,59	1,50	m(%)	0,00	0,00	0,00
P (mg/dm <sup>3</sup> )	14,00	13,00	6,00	Fe	100,76	98,12	125,95
K (mg/dm <sup>3</sup> )	0,04	0,02	0,01	Cu	0,36	0,57	0,67
Na (mg/dm <sup>3</sup> )	0,02	0,02	0,01	Zn	20,79	26,51	12,21
Al (mg/dm <sup>3</sup> )	0,00	0,00	0,00	Mn	10,89	9,13	1,82
Ca (mg/dm <sup>3</sup> )	2,30	2,50	0,90	Areia Total (%)	75,10	72,60	73,30
Mg	1,20	0,30	0,70	Areia Grossa (%)	55,02	51,60	56,52
H+Al	4,00	4,10	5,10	Areia Fina (%)	20,04	21,04	16,80
S.B.	3,56	2,84	1,62	Silte (%)	8,10	6,40	21,90
CTC	7,56	6,94	6,72	Argila (%)	16,80	21,00	24,80

**Figura 1:** Cultivos consorciados de cana-de-açúcar com amendoim (A), soja (B) e feijão-caupi (C) cultivados em campo na Estação Experimental de açúcar do Carpina (EECAC)



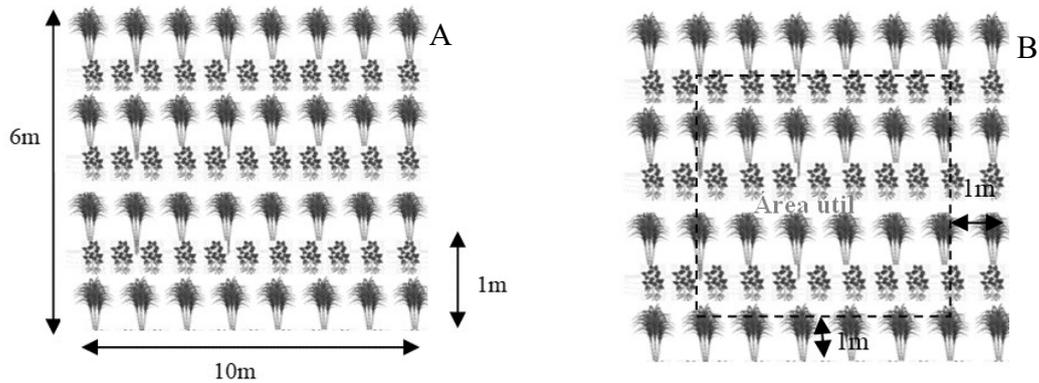
Fotos: Santana, 2019.

A parcela experimental correspondeu a uma área de 60 m<sup>2</sup> com 6 m de largura e 10 m de comprimento (Figura 2A), sendo a área útil delimitada excluindo 1 m de cada extremidade da parcela (Figura 2B). O espaçamento adotado para o cultivo da cana foi de 1 m entre fileiras (Figura 2A); e as leguminosas foram semeadas utilizando os espaçamentos recomendados para cada cultura.

Para o preparo do solo antes do plantio foi aplicado 1,3 t/ha de calcário incorporado ao solo e os sulcos abertos em seguida, com espaçamento de 1,2m entre eles.

O corte definitivo das leguminosas foi feito ao fim do ciclo de cada espécie (feijão caupi: 50-55 dias; amendoim: 90-100 dias e soja: 120 dias após o plantio), sendo a palhada deixada sobre o solo e os grãos retirados.

**Figura 2:** Parcela experimental do manejo consorciado de cana-de-açúcar com leguminosas: área total e espaçamento entre fileiras da cana (A) e área útil da parcela (B).



A coleta das raízes da cana ocorreu aos 5 meses após o plantio dos rebolos. Para a amostragem, em cada parcela experimental foram coletadas, em locais escolhidos ao acaso, três plantas para compor a subamostra de cada parcela. Foram coletadas raízes brancas jovens (SMITH et al., 2005), de plantas de cana-de-açúcar jovens da variedade RB92579 (Figura 3).

**Figura 3:** Coleta das raízes de cana-de-açúcar em consórcio com leguminosas.



Fotos da autora

Pedaços de raízes não danificados foram cuidadosamente lavados com água corrente para remover todo o solo aderente e depois desinfestados superficialmente por imersão sequencial em etanol a 70% por 30s, seguido de imersão em água sanitária comercial não diluída (2,5% de hipoclorito) sob agitação suave por oito minutos. Em seguida, as raízes foram lavadas seis vezes com água estéril. Extratos de raiz foram obtidos pela maceração de uma subamostra de 1g das amostras de tecido radicular superficialmente esterilizado em pistilo e gral estéreis, com 5 ml de solução salina (0,85% NaCl). Após a maceração, os extratos foram estocados em tubos de

polipropileno (com capacidade para 1,5 mL) contendo 1,0 mL de extrato e 0,33ml de glicerina (25%), em freezer a -12°C, para estudos subsequentes.

**Figura 4:** Obtenção do extrato após maceração de raiz da cana-de-açúcar



Foto da autora

### 3.2.2 Isolamento usando leguminosas como planta isca

Para obtenção de rizóbios a partir do tecido radicular da cana-de-açúcar, foram utilizadas as seguintes leguminosas como plantas isca: feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp., variedade IPA 206), amendoim (*Arachis hypogaea* L., variedade BR1) e soja (*Glycine max* (L.) Merr., variedade Monsoy 8349), por serem as espécies utilizadas nos cultivos consorciados e por apresentarem diferentes faixas hospedeiras (nodulam com alfa e beta-rizóbios de diversas espécies). Antes da semeadura, as sementes foram desinfestadas superficialmente por imersão em etanol (70%) e, depois, usando solução de hipoclorito ou de peróxido de hidrogênio. Após a lavagem rigorosa (mínimo de seis vezes) com água estéril, as sementes foram acondicionadas em placas contendo ágar água (0,8%) para permitir a germinação e a emissão de uma radícula de aproximadamente 3 cm a 28°C no escuro. Plântulas com sintomas de contaminação microbiana não foram utilizadas nos experimentos subsequentes.

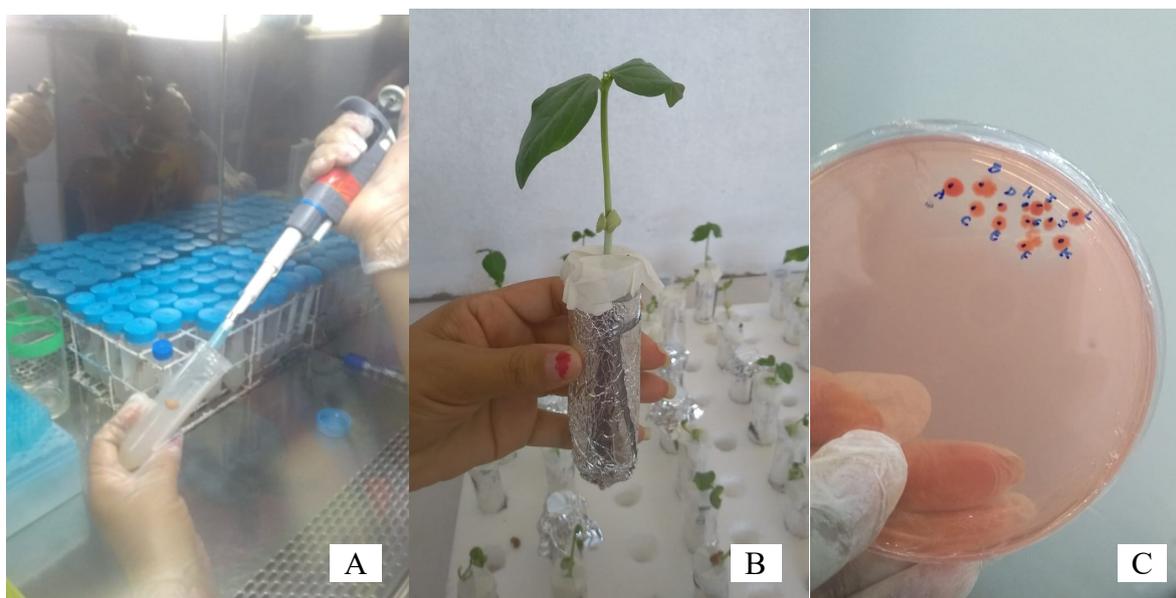
Plântulas de leguminosas sem contaminação aparente foram transferidas para tubos de 50 ml com solução de Norris (VINCENT, 1970) agarizada (30 mL/tubo) inclinada. As plântulas foram inoculadas com alíquotas de 1 ml das suspensões de raiz de cana-de-açúcar (Figura 5A), que foi estocada nos tubos de polipropileno. Os controles negativos receberam solução salina estéril e o controle positivo foi inoculado com uma suspensão de uma estirpe reconhecidamente eficaz para a

nodulação de cada espécie de leguminosa. Os tubos foram fechados com filme plástico com uma pequena abertura para evaporação e envolto em folha de alumínio para proteger as raízes da luz.

Quando as partes aéreas cresceram para fora dos tubos, o filme plástico foi trocado por fita crepe para permitir a passagem da parte aérea, mas mantendo o sistema radicular protegido contra contaminação (Figura 5B). As plantas foram cultivadas sob temperatura ambiente, com 12 horas de luz natural por dia. Água ou solução nutritiva estéreis foram adicionadas quando necessário. Aos 35 dias após a inoculação, a ocorrência de nodulação foi avaliada. Os nódulos foram coletados e desinfestados superficialmente por imersão em etanol (70%) por 2 min, seguido de tratamento com solução de hipoclorito (2,5%) por três minutos. Após lavagens rigorosas com água estéril, os nódulos foram esmagados em placas e a suspensão obtida espalhada em placas de petri com meio contendo extrato de levedura, manitol e ágar (YMA) (FRED; WAKSMAN, 1928) com indicador vermelho Congo e então incubadas a 28 ° C.

Para verificação da eficiência da desinfestação superficial, os nódulos foram rolados em placa de petri com meio de cultura antes de proceder com o isolamento. O crescimento das colônias foi observado aos 3, 7 e 10 dias e todas as colônias que surgiram foram repicadas e os isolados estocados para estudos posteriores (Figura 5C).

**Figura 5:** Inoculação das plantulas com o extrato de raiz da cana (A), planta de feijão-caupi inoculada (B) e colônias provenientes do nódulo (C)



Fotos da autora

### 3.2.3 Autenticação e purificação dos isolados

Todos os isolados obtidos foram autenticados por meio da confirmação da capacidade de nodulação do hospedeiro original (Figura 6), com a utilização de 3 plantas (repetições) por isolado. Após essa etapa e para garantir culturas puras, nos isolados que foram positivos na autenticação, foi realizada a purificação com uma diluição seriada até o nível de  $10^{-6}$  das culturas armazenadas correspondentes, retirado uma alíquota e riscados em placa contendo meio YMA com azul de bromotimol.

**Figura 6:** Experimento de autenticação dos isolados com feijão-caupi



Foto da autora

### 3.2.4. Caracterização morfocultural dos isolados

Após o processo de purificação, os isolados que não apresentaram contaminantes foram repicados novamente em placas contendo meio YMA com azul de bromotimol (FRED e WAKSMAN, 1928; VINCENT, 1970) e avaliados conforme características fenotípicas das colônias (Figura 7), em função do tempo de crescimento (rápido – colônias isoladas aparecem até três dias depois de repicadas; intermediário – colônias aparecem de quatro a seis dias; e lento – colônias

aparecem entre 7 a 10 dias); quanto a reação de pH em meio de cultura (AC: ácida; AL: alcalina; N: neutra, o azul de bromotimol deixa o meio esverdeado em pH 6,8. Se as bactérias acidificarem o meio, este adquirirá a cor amarelada, enquanto que se alcalinizarem o meio, a coloração ficará azulada); transparência da colônia (opaca - quando não possui o brilho; translúcida - quando permite a passagem da luz através da placa; e transparente – quando além de permitir a passagem da luz, percebe-se claramente o que tem do outro lado); tamanho da colônia (puntiforme - colônias com diâmetro menor que 1 mm; colônias com diâmetro entre 1-2 mm e colônias com diâmetro >2 mm); forma da colônia (circular ou irregular); cor das colônias; presença de muco (sim ou não); produção de muco (escasso, moderado ou abundante) e tipo de muco (seco, butírico ou floculoso).

**Figura 7:** Caracterização dos isolados autenticados em placa de Petri.



Foto da autora

As características do meio de cultivo foram tabuladas em uma planilha que foi transformada em uma matriz binária para a construção de dendograma de similaridade por agrupamento.

### **3.2.5 Identidade taxonômica dos isolados**

#### **3.2.5.1 Extração de DNA**

Os isolados foram cultivados em 5,0 mL de meio de cultura contendo extrato de levedura e manitol (YM) líquido e incubados a 28°C sob agitação de 150 rpm durante o tempo de crescimento de cada isolado. Uma alíquota de 1,0 mL da suspensão de células foi transferida para tubos de polipropileno de 1,5mL, sendo centrifugados por 3 min a 13.000 rpm (MARTINS et al., 2015). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi utilizado para extração do DNA genômico utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Nº A1125, Promega), conforme recomendação do fabricante.

#### **3.2.5.2 Sequenciamento do gene 16SrRNA**

O gene 16S rRNA dos isolados foi amplificado pela reação de polimerase em cadeia (PCR) usando-se GoTaq® DNA polimerase (Promega), seguindo as recomendações do fabricante em volumes de 50 µl, com 10 pmol dos primers 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 1492R (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) (LANE, 1991). Os produtos de PCR foram sequenciados das duas pontas usando-se os mesmos primers usados nas reações de PCR com ajudado sequenciador capilar ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems). As sequências foram processadas e montadas usando-se o software BioNumerics versão 7.2 (Applied Maths, Bélgica).

#### **3.2.5.3 Fingerprinting molecular por BOX-PCR e GTG 5**

A variabilidade genética dos isolados foi avaliada por meio dos perfis moleculares gerados por meio de reação de BOX-PCR e GTG5. Foram selecionados os isolados conforme resultado obtido após o seqüenciamento do gene 16S rRNA, retirando aqueles que não eram rizóbios, e foi realizado um dendrograma concatenado com os dois marcadores.

As reações de BOX-PCR foram conduzidas com o iniciador BOX-A1 (CTACGGCAAGGCGACGCTGACG) (VERSALOVIC et al., 1994) e o ISSR com o iniciador (GTG)5 (5'- GTGGTGGTGGTGGTG -3') (SVEC et al., 2005). As reações foram dimensionadas

para um volume final de 20  $\mu\text{L}$ , utilizando: tampão de reação 1X,  $\text{MgCl}_2$  0,6  $\mu\text{L}$ , dNTP 2,5  $\mu\text{L}$ , Taq DNA polimerase 0,2  $\mu\text{L}$ , 1,0  $\mu\text{L}$  dos primers e 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA. A amplificação foi realizada utilizando os seguintes ciclos: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 6 min, 35 ciclos de desnaturação (2 min a 94 °C), temperatura de anelamento de 52°C por 2 min e extensão (8 min a 72°C), um ciclo de extensão final a 72°C por 16 min. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% (p/v) a 100 V por 120 minutos. Posteriormente, o gel foi visualizado em transluminador sob luz UV e fotografado em fotodocumentador. Todos os perfis foram avaliados com auxílio do programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica).

Os perfis genéticos foram avaliados com auxílio do programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica) utilizando o coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA para a construção do dendrograma de similaridade.

### **3.2.6 Tratamento estatístico dos dados**

A qualidade das sequências obtidas foi avaliada com o programa SeqScanner 2.0 (Applied Biosystems, EUA). A montagem dos contigs foi feita com o BioEdit e a similaridade das sequências obtidas no sequenciamento foi comparada com aquelas depositadas no banco de dados GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) usando a ferramenta BLASTn. As sequências das estirpes tipo (typestrain) e dos isolados rizobianos com maior similaridade foram baixadas para o alinhamento e alinhadas utilizando o algoritmo MUSCLE. As árvores filogenéticas foram construídas pelo método Neighbour-Joining e o modelo Jukes-Cantor com auxílio do programa MEGA 11 (TAMURA et al., 2021).

## **3.3 Resultados e Discussão**

### **3.3.1 Isolamento, autenticação e purificação dos rizóbios**

No ensaio com planta isca em tubos com solução de Norris agarizada, apenas foram produzidos nódulos nas raízes do feijão-caupi, inoculado com a suspensão salina obtida a partir de raízes de cana-de-açúcar cultivada em consórcio com esta mesma leguminosa (Figura 8). As plantas inoculadas com as demais suspensões de raízes não nodularam, demonstrando que as raízes da

variedade RB 92579 de cana cultivada solteira ou consorciada com soja ou com amendoim não abrigam nódulos capazes de formar simbiose com nenhuma das três leguminosas estudadas.

**Figura 8:** Utilização de feijão-caupi com planta isca para obtenção de nódulos dos extratos de raiz de cana-de-açúcar

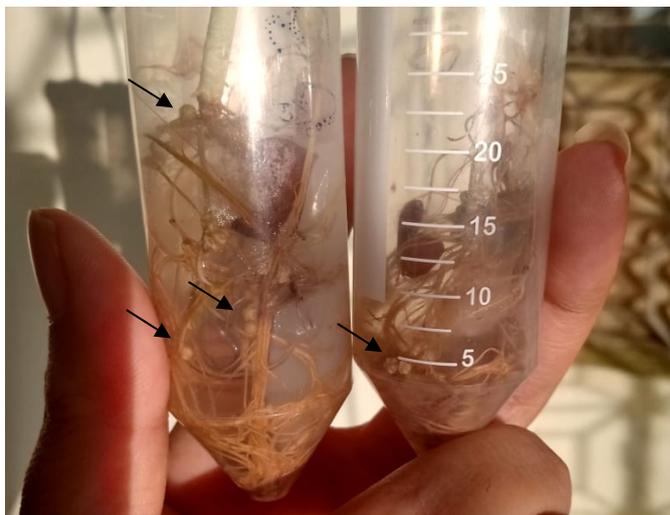


Foto da autora

Ao todo foram obtidos 48 isolados, dos quais 17 foram confirmados como sendo rizóbios, pois foram positivos no teste de renodulação no feijão-caupi. Após realização da diluição seriada para purificação, desses 17 isolados autenticados, observamos em 3 placas (nos tratamentos 12, 13 e 16) o crescimento de duas colônias distintas, que foram então considerados isolados A (menor) e B (maior colônia) (Figura 10A), totalizando assim 20 isolados que foram transferidos para placas de Petri contendo meio YMA com azul de bromotimol como indicador de pH para realização da caracterização morfofisiológica (Figura 10B).

**Figura 9:** Isolados obtidos após a autenticação.

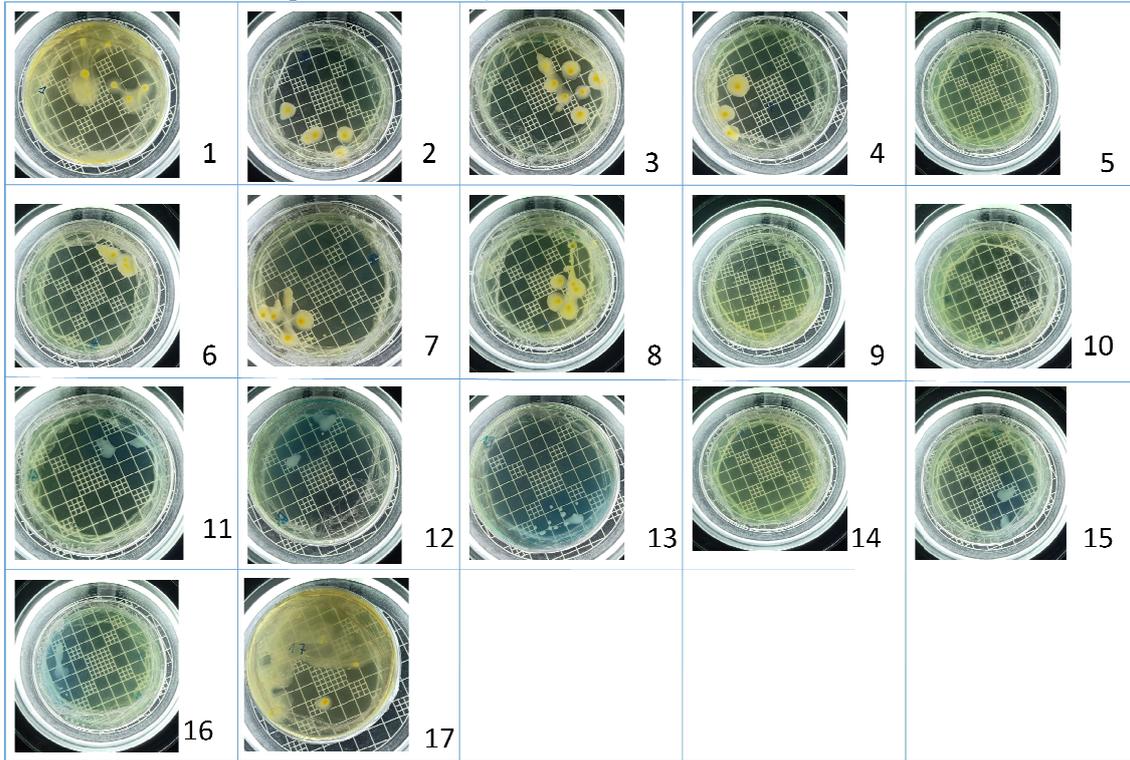
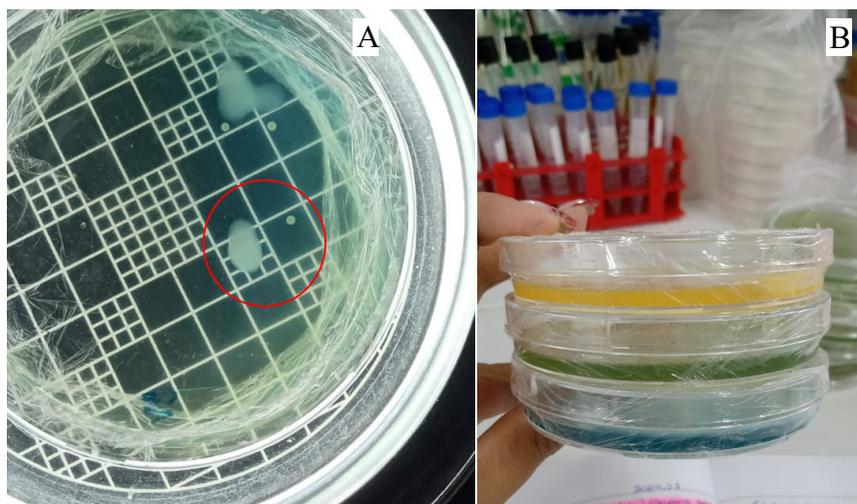


Foto da autora

### 3.3.2 Caracterização fenotípica dos isolados

As características morfológicas foram tabuladas em uma planilha que foi transformada em uma matriz binária para a construção do dendrograma de similaridade por agrupamento com a utilização do programa PAST 4.03, onde pudemos observar apenas dois isolados com crescimento rápido (1 e 17), nenhum com crescimento intermediário e o restante com crescimento lento.

**Figura 10:** Tratamento 13 com duas colônias distintas (A) e Caracterização morfológica das bactérias que acidificam (amarela), neutralizam (verde) ou alcalinizam (azul) o meio (B).



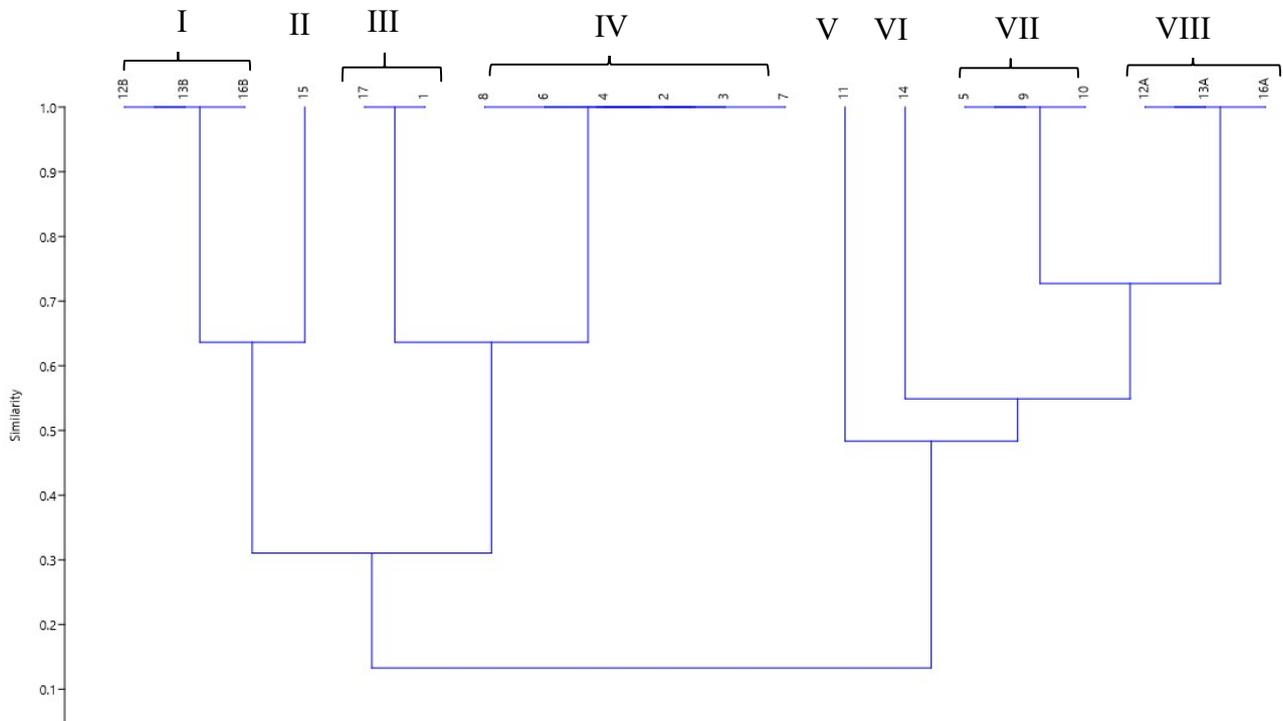
Fotos da autora

**Tabela 2:** Descrição das características em meio de cultivo YMA com azul de bromotimol de rizóbios isolados de raízes de cana de açúcar

N	Tempo de crescimento	pH do meio	Tamanho da colônia (mm)	Forma da colônia	Transparência da colônia	Cor da colônia	Presença de muco	Produção de muco	Consistência do muco
1	rápido	Ácido	>2	Irregular	translúcida	amarela	sim	abundante	floculosa
2	lento	Ácido	>2	Circular	translúcida	amarela	sim	abundante	floculosa
3	lento	Ácido	>2	Circular	translúcida	amarela	sim	abundante	floculosa
4	lento	ácido	>2	Circular	translúcida	amarela	sim	abundante	floculosa
5	lento	neutro	1-2	Circular	translúcida	branca	não	escasso	butírica
6	lento	ácido	>2	Circular	translúcida	amarela	sim	abundante	floculosa
7	lento	ácido	>2	Circular	translúcida	amarela	sim	abundante	floculosa
8	lento	ácido	>2	Circular	translúcida	amarela	sim	abundante	floculosa
9	lento	neutro	1-2	Circular	translúcida	branca	não	escasso	butírica
10	lento	neutro	1-2	Circular	translúcida	branca	não	escasso	butírica
11	lento	neutro	<1	Circular	opaca	branca	não	escasso	seca
12A	lento	alcalino	1-2	Circular	translúcida	branca	não	escasso	butírica
12B	lento	alcalino	>2	Irregular	transparente	incolor	sim	moderado	floculosa
13A	lento	alcalino	1-2	Circular	translúcida	branca	não	escasso	butírica
13B	lento	alcalino	>2	Irregular	transparente	incolor	sim	moderado	floculosa
14	lento	neutro	1-2	Irregular	translúcida	branca	não	escasso	seco
15	lento	alcalino	>2	Irregular	translúcida	creme	sim	moderado	floculosa
16A	lento	alcalino	1-2	Circular	translúcida	branca	não	escasso	butírica
16B	lento	alcalino	>2	Irregular	transparente	incolor	sim	moderado	floculosa
17	rápido	ácido	>2	Irregular	translúcida	amarela	sim	abundante	floculosa

Ao obter o dendograma e considerando uma similaridade de 100% podemos agrupar os isolados em 8 grupos distintos, conforme imagem abaixo:

**Figura 11:** Fenograma de similaridade por agrupamento dos isolados obtidos de raiz de cana-de-açúcar cultivada em consórcio com feijão-caupi. PAST 4.03



Os isolados 11, 14 e 15 não apresentaram 100 % de similaridade de características de cultivo com nenhum dos demais isolados, formando grupos monofiléticos. Exceto os isolados 1 e 17, todos os demais são de crescimento lento.

No grupo I se agruparam os isolados 12B, 13B e 16B, com as características de colônia maior que 2 mm, de formato irregular, transparente e incolor e com formação de muco moderado e de consistência floculosa. O oposto ocorreu com os isolados do grupo V, formado por 12A, 13A e 16A em relação às características da colônia que foram de formato circular, translúcida e branca e com muco escasso e de consistência butírica.

No grupo II, formado pelos isolados 1 e 17, que apresentaram crescimento rápido, acidificando o meio, e a colônia maior que 2 mm, de formato irregular, translúcida, amarela e com muco abundante e de consistência floculosa. No grupo III, composto pelos isolados 2, 3, 4, 6, 7 e 8 com características de colônia de tamanho maior que 2mm, circular, translúcida, amarela e com muco abundante e de consistência floculosa.

No grupo IV, os isolados 5, 9 e 10 apresentaram neutralização do meio, colônia com 1-2 mm, de formato circular, translúcida e branca e com muco escasso.

### 3.3.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Para o posicionamento taxonômico, os 20 isolados foram submetidos à amplificação do fragmento do gene 16S rRNA, purificação e sequenciamento. Destes, 16 apresentaram seqüências de boa qualidade em ambos os sentidos de sequenciamento (forward e reverse) após verificação no programa SeqScanner (Figura 12) e, posteriormente, tiveram suas seqüências montadas e alinhadas com seqüências de estirpes depositadas no banco de dados GenBank (Tabela 3). Aqueles que não apresentaram seqüências satisfatórias, não puderam ser identificados.

**Figura 12**– Análise da qualidade da seqüência parcial do gene 16S rRNA do isolado 13B por meio do programa Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems) com 963 bases contínuas (parte em azul indica leitura contínua com QV>20).



O gene 16S rRNA é o principal componente da subunidade ribossômica nos procariontes, encontrando-se presente em todas as bactérias e apresentando características conservativas ao longo da evolução, servindo como indicador de como os micro-organismos estão intimamente relacionados durante a evolução em milhões de anos (ATLAS; BARTHA, 1998). Dos 20 isolados avaliados, 7 apresentaram similaridade com *Rhizobium miluonense*, e 4 com *Bradyrhizobium elkanii*. Dos demais, 2 isolados tiveram 99,79 de similaridade com *Enterobacter sichuanensis* e 3 isolados com *Leifsonia shinshuensis* com similaridade superior a 99%. Quatro isolados apresentaram seqüência de má qualidade, não dando para identificar o gênero.

**Tabela 3:** Identificação dos isolados de cana-de-açúcar por meio da comparação de sequências do gene 16S com as estirpes “tipo” disponíveis no banco de dados GenBank.

Isolado	Descrição 16S	Nome Científico	Query cover	Similaridade	Número de Acesso 16S
1	<i>Enterobacter sichuanensis</i> WCHECL1597	<i>Enterobacter sichuanensis</i>	100%	99,79%	MG83788.1
2	<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251	<i>Rhizobium miluonense</i>	99%	99,93%	NR_044063.1
3	<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251	<i>Rhizobium miluonense</i>	100%	99,85%	NR_044063.1
4	<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251	<i>Rhizobium miluonense</i>	99%	99,85%	NR_044063.1
5	<i>Leifsonia shinshuensis</i> DB 102	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	100%	99,34%	NR_043663.1
6	<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251	<i>Rhizobium miluonense</i>	99%	99,78%	NR_044063.1
7	<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251	<i>Rhizobium miluonense</i>	99%	99,93%	NR_044063.1
8	<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251	<i>Rhizobium miluonense</i>	100%	99,85%	NR_044063.1
9	<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251	<i>Rhizobium miluonense</i>	99%	99,62%	NR_044063.1
10	<i>Leifsonia shinshuensis</i> DB 102	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	100%	99,06%	NR_043663.1
11	<i>Leifsonia shinshuensis</i> DB 102	<i>Leifsonia shinshuensis</i>	100%	99,56%	NR_043663.1
12A	Seq ruim*				
12B	Seq ruim*				
13A	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	100%	100%	MN338958.1
13B	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99%	100%	MN338958.1
14	Seq ruim*				
15	Seq ruim*				
16A	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99%	99,9%	MN338958.1
16B	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> USDA 76	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	100%	100%	MN338958.1
17	<i>Enterobacter sichuanensis</i> WCHECL1597	<i>Enterobacter sichuanensis</i>	99%	99,79%	MG832788.1

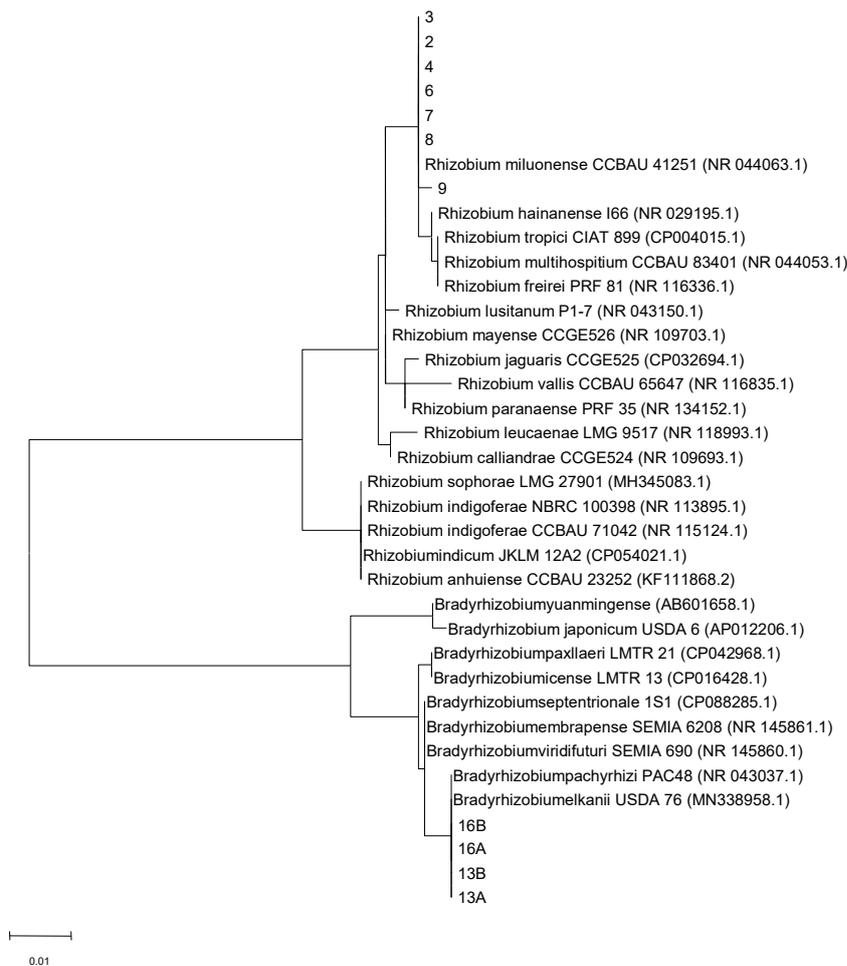
\*Seq ruim= sequência ruim

O gênero *Bradyrhizobium* foi encontrado em tecidos internos de raízes de cana-de-açúcar em Seropédica- RJ (MENEZES-JUNIOR et al., 2019), onde por meio de perfil BOX-PCR e análises de 16S rRNA e ITS foi possível confirmar filotipos pertencentes ao clado *B. elkanii*, *B. japonicum* e *B. sacchari*, confirmando assim a presença natural de diversas espécies de *Bradyrhizobium* spp. em sistemas radiculares de cana-de-açúcar.

O raquitismo-de-soqueira (RSD), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é considerada a principal patologia em cana-de-açúcar, sendo responsável por perdas na produção que podem exceder 50%, a depender da concentração do patógeno nos vasos condutores da planta (DIAS, CARRER FILHO & CUNHA, 2019).

Como base nas 11 sequências de isolados rizóbios obtidos e com sequências parciais do gene 16S rRNA de 26 estirpes tipo utilizadas como referências foi construída uma árvore filogenética (Figura 14).

**Figura 13**– Árvore filogenética construída com base em sequencias parciais do gene 16S rRNA de 11 sequências de bactérias isoladas de nódulos radiculares de feijão-caupi e de 26 estirpes tipo utilizadas como referências.



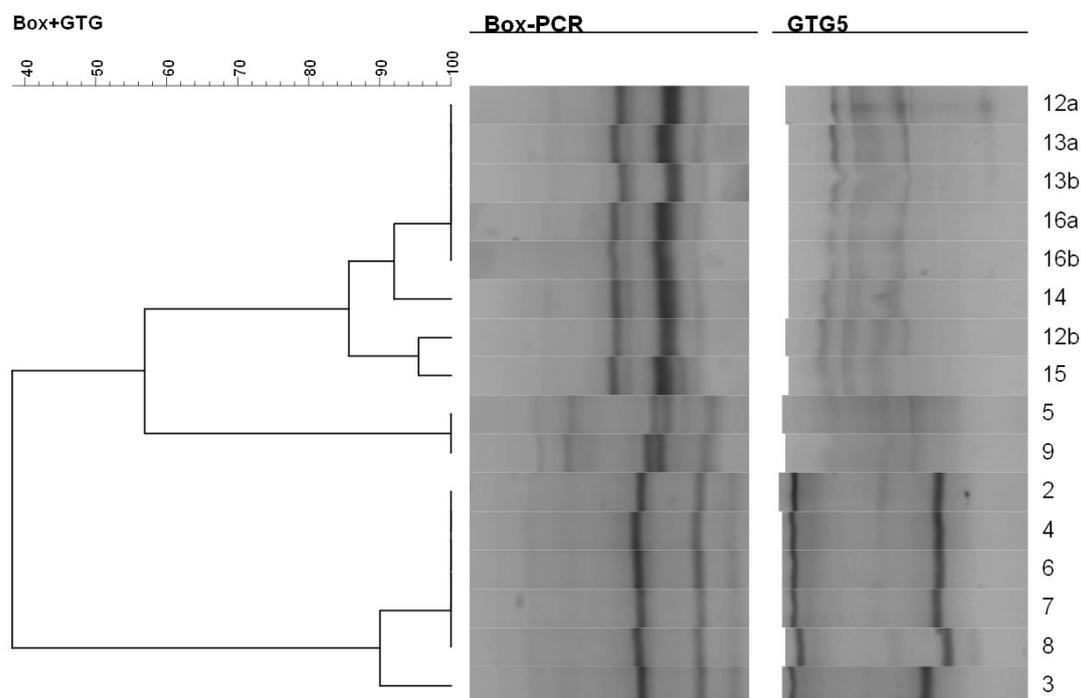
### 3.3.4 Fingerprinting molecular por BOX-PCR e GTG5

A análise de fingerprinting molecular realizada com 16 isolados: 11 rizóbios, 4 sequências que não puderam ser identificadas pelo 16S rRNA e um isolado, identificado como *Leifsonia*, (5), permitiu identificar a diversidade intraespecífica dos perfis genéticos obtidos e indicou um grau de diversidade genética mediano, uma vez que os isolados apresentaram 7 perfis de DNA (Figura 14).

Com base nos resultados foram formados grupos maiores com os isolados 12A, 13A, 13B, 16A e 16B em um grupo e 2, 4, 6, 7 e 8 em outro grupo. Os isolados 5 e 9 formaram um grupo menor. Já os isolados 12B, 15, 14 e 3 apresentaram perfis únicos de DNA.

Comparando com 16S rRNA, foi observado que os resultados estão consistentes, sendo necessário o sequenciamento dos isolados para identificação em nível de espécie. Esses dados mostram a condição de dimorfismo de colônias nos isolados de *Bradyrhizobium*, em que o mesmo isolado pode apresentar características morfológicas diferentes.

**Figura 14:** Dendograma concatenado com os marcadores BOX PCR e GTG5 dos isolados obtidos de raiz de cana-de-açúcar consorciada com feijão-caupi



Dentre os rizóbios do gênero *Bradyrhizobium* encontrados na cana-de-açúcar, os *B. elkanni* foram os mais encontrados neste e em outros trabalhos, mostrando que parece ser a espécie mais comum encontrada colonizando as raízes da cana-de-açúcar e que os *Bradyrhizobium* possuem

afinidade especial por colonizar raiz de cana-de-açúcar (ROUWS et al., 2014, MENEZES-JUNIOR et al., 2019).

#### **4. Conclusões**

A cana-de-açúcar cultivada em consórcio com feijão-caupi abriga população de rizóbios endofíticos que apresentam capacidade de nodular essa leguminosa e a sua presença nas entrelinhas da cana-de-açúcar estimula o aumento da população de rizóbio desta leguminosa. Bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* foram encontradas colonizando raízes de cana-de-açúcar. Dentro do gênero *Bradyrhizobium*, a cana-de-açúcar parece ter preferência por ser colonizada por *B. elkanni*.

## REFERÊNCIAS

- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Ecologia microbiana: Fundamentos e Aplicações. Benjamin/Cummings. **Science Publishing**, p. 281-324, 1998.
- BÉCQUER GRANADOS, C. J. *et al.* Efecto de La inoculación com bacterias rizosféricas e dos variedades de trigo. Fase II: Invernadero, **Revista Mexicana de Ciências Agrícolas**, Granada-México, v. 3, n. 5, p. 985-997, 2012.
- BELTRÃO, B. A. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea - Estado de Pernambuco: Diagnóstico do município de Carpina.** [s.l.]
- BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.; BAKKER, P.A. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends Plant Science**, v. 17, p.478–486, 2012
- BULGARELLI, D. *et al.* Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. **Nature**, v. 488, p. 91–95, 2012.
- BURBANO, C.S. *et al.* Predominant nifH transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, p.383– 389 , 2011.
- CPRM- Serviço geográfico do Brasil. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea do estado de Pernambuco: Diagnóstico do município de Igarassu.** p. 22, 2005.
- DIAS, V.; CARRER FILHO, R.; CUNHA, M. G..Comparison of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* molecular detection in heat-treated sugarcane setts. **Agricultural Research in the Tropics**, v.49, 2019. <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v4955132>
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- Embrapa. Amendoim BR1. 4ª ed. Campina Grande, Centro Nacional de Pesquisa de Algodão, p. 2, 2009.
- FISCHER, D. *et al.* Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant Soil** , v. 356, p. 83–99, 2012
- FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology with special reference to the microorganisms of the soil** New York: McGraw-Hill Book Company, 1928. 145p.
- GARIBALDI, L.A.; GEMMILL-HERREN, B.; D’ANNOLFO, R.; GRAEUB, B.E.; CUNNIGHAM, S.A.; BREEZE, T.D. Farming Approaches for Greater Biodiversity, Livelihoods, and Food Security. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 32, n. 1, p. 68-80, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.11.017>
- HAHN, L.; SÁ, E. L. S.; SILVA, W. R.; MACHADO, R. G.; DAMASCENO, R. G. Promoção de crescimento de híbridos de milho inoculados com rizóbios e bactérias diazotróficas associativas. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 19, n. 1/2, p. 33-40, 2013.

HE, T.; SU, L.; LI, Y.; SU, T.; QIN, F.; LI, Q. Nutrient decomposition rate and sugarcane yield as influenced by mung bean intercropping and crop residue recycling. **Sugar Tech**, v. 20, n. 2, p. 154-162, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0548-0>

HERNÁNDEZ, I., TAULÉ, C., PÉREZ-PÉREZ, R. Endophytic rhizobia promote the growth of Cuban rice cultivar. **Symbiosis**, v. 85, p. 175–190, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13199-021-00803-2>

LANE, D.J. **16S/23S rRNA sequencing**. In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds). New York: John Wiley and Sons, p. 115-175, 1991.

MARTINS, P. G. ; LIRA JÚNIOR, M. A.; BASTOS, M. L. ; VICENTIN, R. P.; LYRA, M. C.; FRACETTO, G. G. *Mimosa caesalpinifoli* arhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, v. 197, p. 459-469, 2015.

MENEZES JÚNIOR, I.A.; MATOS, G.F.; FREITAS, K. M.; JESUS, E. C.; ROUWS, L. F. M. Occurrence of diverse *Bradyrhizobium* spp. in roots and rhizospheres of two commercial Brazilian sugarcane cultivars. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.50, n.3, p. 759-767, 2019. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00090-6>

POOLE, P.; RAMACHANDRAN, V.; TERPOLILLI, J. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. **Nature Microbiology Reviews**, v.16, p. 291–303, 2018.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA DE DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO- RIDESA. **Liberação nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. RIDESA, 72p. 2015.

ROUWS, L. F. *et al.* Endophytic *Bradyrhizobium* spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. **Environmental Microbiology Reports**, v.6, n.4, p.354–363, 2014. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12122>

SMITH, D.M.; INMAN-BAMBER, N.G.; THORBURN, P.J. Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research**, v.92, p. 169-183, 2005.

SOLANKI, M.K. *et al.* Intercropping in sugarcane cultivation influenced the soil properties and enhanced the diversity of vital diazotrophic bacteria. **Sugar Tech**, v. 19, p. 136- 147, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12355-016-0445-y>

SOUZA, R. S. *et al.* Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome, **Scientific Reports**, v.6, 28774, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep28774>

SVEC, P. *et al.* Evaluation of (GTG)<sub>5</sub>-PCR for identification of *Enterococcus* spp. **FEMS Microbiology**, v. 247, p.59-63, 2005.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution**, 2021. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

THAWEENUT, N.; HACHISUKA, Y.; ANDO, S.; YANAGISAWA, S.; YONEYAMA, T. Two seasons' study on *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. **Plant Soil**, v.338, p.435–449, 2011

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p.

YANNI, Y. G. *et al.* Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* and rice roots and assessments of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 99-114, 1997.

YANNI, Y.G. *et al.* The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 845-870, 2001.

**Capítulo 2: CAPACIDADE DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE RAÍZES DE CANA DE AÇÚCAR EM PROMOVER O CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS: AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO***

#### 4. CAPACIDADE DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE RAÍZES DE CANA DE AÇÚCAR EM PROMOVER O CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS: AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO*

##### Resumo

A ocorrência de rizóbios, bactérias tradicionalmente conhecidas como microssimbiontes de leguminosas, tem sido observada em tecidos de diversas espécies de gramíneas, mas o conhecimento sobre o potencial de utilização dessas bactérias ainda é incipiente. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi testar o potencial de rizóbios isolados de raízes de cana-de-açúcar de produzir substâncias promotoras de crescimento de plantas e de promover a produção de biomassa defeijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.); feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) e soja (*Glycine Max* L. meir). Os isolados foram testados quanto à capacidade de solubilização de fosfatos e biossíntese de ácido indolacético (AIA). Foram montados três experimentos em casa de vegetação, utilizando copos com capacidade para 500ml, preenchidos com substrato estéril (areia e vermiculita, na proporção de 1:1). Os experimentos, um para cada leguminosa, foram conduzidos em delineamento em blocos ao acaso, com 22 tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos consistiram em inoculações com 20 isolados de rizóbios e dois controles sem inoculação (sendo um com adubação nitrogenada e um controle absoluto). A coleta foi realizada em torno de 45 dias após o plantio. O material vegetal coletado (parte aérea e raiz) foi levado à estufa de circulação forçada de ar (72 horas a 60°C) para secagem e determinação da biomassa. Os nódulos, quando presentes, foram lavados, contados e realizada a determinação da massa seca. Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando o F foi significativo, foram realizadas comparações de médias utilizando o programa computacional Sisvar, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Nenhum dos isolados foi capaz de solubilizar o fosfato de alumínio (P-Al). Em relação à solubilização do fosfato de cálcio, o P-Ca foi disponibilizado por 55% (11) dos 20 isolados. Houve produção de AIA por todos os isolados, 60% deles tiveram média e 40% alta produção de AIA. Na avaliação em casa de vegetação, não houve nodulação com o feijão comum nem com a soja e não houve diferença estatística entre os tratamentos. Em relação ao caupi, 12 isolados não foram capazes de nodular o feijão-caupi, podendo este resultado estar relacionado à possível perda da capacidade de nodular desses rizóbios ou ser devido às condições do ambiente, como a alta temperatura. Oito isolados nodularam o feijão-caupi, porém tiveram nódulos pequenos e inativos, mostrando que não estavam realizando a FBN.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento. Produção de ácido indolacético. Solubilização de fosfato.

## ABILITY OF RHIZOBIANS ISOLATED FROM SUGAR CANE ROOTS TO PROMOTE LEGUMINOSIS GROWTH: IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION

### Abstract

The occurrence of rhizobia, bacteria traditionally known as legume microsymbionts, has been observed in tissues of several grass species, but knowledge about the potential use of these bacteria is still incipient. In this sense, the objective of this work was to test the potential of rhizobia isolated from sugarcane roots to produce growth-promoting substances in plants and to promote the production of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) biomass; cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and soybean (*Glycine Max* L. meir). The isolates were tested for phosphate solubilization capacity and indoleacetic acid (IAA) biosynthesis. Three experiments were carried out in a greenhouse at the Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, using cups with a capacity of 500ml, filled with sterile substrate (sand and vermiculite, in the proportion of 1:1). The experiments, one for each legume, were conducted in DBC, with 22 treatments and four replications. The treatments consisted of inoculations with 20 rhizobia isolates and two controls without inoculation (one with nitrogen fertilization and an absolute control). The collection was carried out around 45 days after planting. The plant material collected (shoots and roots) was taken to a forced air circulation oven (72 hours at 60°C) for drying and biomass determination. The nodules, when present, were washed, counted and the determination of dry mass was performed. The results were submitted to analysis of variance and when the F was significant, comparisons of means were performed using the Sisvar computer program, and the means were compared by Tukey's test at 5% probability. None of the isolates was able to solubilize aluminum phosphate (P-Al). Regarding the solubilization of calcium phosphate, P-Ca was available in 55% (11) of the 20 isolates. There was AIA production by all isolates, 60% of them had medium and 40% high AIA production. In the greenhouse evaluation, there was no nodulation with common bean or soybean, and there was no statistical difference between treatments. Regarding cowpea, 12 isolates were not able to nodulate cowpea, which may be related to the possible loss of the ability to nodulate these rhizobia or be due to environmental conditions, such as high temperature. Eight isolates nodulated cowpea, but had small and inactive nodules, showing that they were not performing BNF.

Keywords: Growth promoting bacteria. Production of indoleacetic acid. Phosphate solubilization.

## 4.1 Introdução

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo natural em que o nitrogênio atmosférico é absorvido por micro-organismos diazotróficos, que quebram a molécula  $N_2$  e a convertem em uma forma assimilável pelas plantas. Para que a FBN seja possível, é necessário que se forme uma associação mutualística entre as plantas e as bactérias diazotróficas. Essa relação pode ser de forma associativa, de vida livre ou simbiótica, que é o caso da relação rizóbio-leguminosa, onde há a formação dos nódulos. Nessa relação entre as bactérias fixadoras de N e as espécies vegetais, a associação entre as bactérias dos grupos dos rizóbios e as plantas da família das leguminosas é a mais bem-estudada e caracterizada (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; EMBRAPA, 2020).

As bactérias que se tem maior interesse agrônômico são do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, que fazem simbiose com plantas leguminosas e para que ocorra o reconhecimento e forme-se a simbiose entre bactéria e planta, necessita-se ter uma especificidade para que ocorra o processo de fixação biológica do  $N_2$ . Como toda relação mutualística, ambos os simbiontes são beneficiados: as bactérias transformam o  $N_2$  para  $NH_3$  e fornece às plantas, e em contrapartida, elas necessitam de açúcares, que são fornecidos pelo hospedeiro (FLOSS, 2011).

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta a propriedade de estabelecer simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium*. Moreira et al. (2017) verificaram que após inoculação com diferentes estirpes de *Rhizobium*, houve ganhos significativos em nodulação e produtividade de feijão comum e que até 75,8% do N presente na parte aérea é oriunda da FBN. Porém, por mais que existam indicações de diferentes produtos comerciais e diferentes cultivares com distintos graus de sensibilidade a formulações de inoculantes, a prática de inoculação no feijoeiro ainda é pouco utilizada (SANYAL et al., 2019).

A cultura de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) se destaca quanto ao potencial de fixação biológica de nitrogênio (FBN), que pode ser incrementado por meio da inoculação com bactérias rizobianas. O uso de inoculantes com estirpes eficientes (XAVIER et al., 2006) diminui ou mesmo dispensa o uso de fertilizantes nitrogenados, sendo esta uma importante tecnologia para a agricultura brasileira. Na soja (*Glycine max* (L.) Mer), o nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade por conta da grande quantidade de proteína contida nos grãos, possuindo um teor médio de 6,5% N. Quando bem inoculada, a soja nodula e, através da associação simbiótica, os micro-organismos fixam nitrogênio atmosférico eficientemente, suprindo 100% da adubação nitrogenada (ZUFFO et al., 2020; ZUFFO et al., 2022).

Embora rizóbios clássicos sejam definidos como bactérias capazes de infectar raízes de leguminosas, formando nódulos onde fixam o N atmosférico de maneira mais eficiente que as bactérias que colonizam as gramíneas, diversos trabalhos relatam a presença de rizóbios no interior da raiz de gramíneas, assim como a cana-de-açúcar (MATOS et al., 2017). Não se sabe se esses organismos exercem funções benéficas para as plantas, mas, se forem capazes de atuar como bactérias promotoras de crescimento, essa associação rizóbios gramíneas pode representar uma grande possibilidade de desenvolvimento de tecnologias baseadas em bioinsumos ou em manejos mais independentes de fertilizantes químicos para a cultura.

Além da contribuição por meio da FBN, os rizóbios podem produzir substâncias promotoras de crescimento das plantas. Esses mecanismos produzidos contribuem para o desenvolvimento das plantas direta ou indiretamente, por meio de solubilização de fosfatos de cálcio ou alumínio, produção de fitormônios, sideróforos, protegendo contra fitopatógenos e mitigando estresse por seca (BATISTA et al., 2018; SANTOS et al., 2018; BLANCO et al., 2021; VILLANUEVA; 2021). Os resultados obtidos até o momento sugerem que rizóbios e outras bactérias não nodulantes filogeneticamente relacionadas com eles representam um grupo de micro-organismos que deve ser mais bem estudado no sentido da sua aplicação para culturas da família Poaceae, como a cana-de-açúcar, e testes podem ser feitos em leguminosas também.

As fabáceas inoculadas fixam uma quantidade de nitrogênio atmosférico suficiente para suprir a demanda da cultura para produtividades satisfatórias, sendo possível diminuir (na cultura do feijão) ou até mesmo eliminar (na cultura da soja) a utilização de fertilizantes nitrogenados, possibilitando um melhor custo/benefício para o produtor de ambas as culturas e diminuindo os impactos ambientais que os fertilizantes químicos provocam. Considerando isso, o objetivo deste trabalho foi testar o potencial de rizóbios provenientes da raiz da cana-de-açúcar de produzir substâncias promotoras de crescimento em plantas e de avaliar a eficiência da inoculação na produção de biomassa e nodulação do feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.); feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) e soja (*Glycine max* L. meir).

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Potencial dos isolados de produzir substâncias promotoras de crescimento em plantas

#### 4.2.1.1 Solubilização de fosfato de cálcio e alumínio

Foi analisada a capacidade de solubilizar tri-fosfato de cálcio assim como fontes inorgânicas insolúveis de alumínio pelos isolados. Os isolados foram inoculados em triplicata retirando-se uma porção de uma colônia isolada e realizando um leve toque no meio de cultura com auxílio da alça de platina. A formação de halo translúcido em torno da colônia indica a solubilização do fosfato. O halo foi medido com auxílio do paquímetro possibilitando calcular o índice de solubilização (IS) (BERRAQUEIRO et al., 1976):

$$IS = D(\text{halo})/D(\text{colônia})$$

Em que: IS = índice de solubilização, D = diâmetro, do halo e da colônia, respectivamente

Com base nos índices de solubilização, os isolados foram classificados como isolados com baixa ( $IS < 2$ ), média ( $2 < IS < 4$ ) ou alta ( $IS > 4$ ) capacidade de solubilização. A seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio bibásico foi realizada segundo metodologia descrita por Verma; Ladha; Tripathi (2001) com modificações (Apêndice A). Os isolados foram repicados em meio de cultura sólido e incubados a 28° por 15 dias.

A seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato de alumínio foi realizada utilizando o método descrito por Hara; Oliveira (2004). Os isolados foram incubados em meio de cultura sólido (Apêndice B) incubados a 28°C por 15 dias.

De acordo com o início da solubilização, os isolados foram classificados como precoces (até 3° dia), tardia (após 3° dia) e não solubiliza aparentemente (não apresentou solubilização até o 15° dia). (HARA; OLIVEIRA, 2004).

#### 4.2.1.2 Produção de ácido indol acético (AIA)

Para a avaliação da produção de AIA, foi utilizado o método descrito por Kuss et al. (2007), com base na alteração de coloração das amostras devido à oxidação dos compostos indólicos, variando de amarelo (não oxidado) a vermelho (oxidado). Os isolados foram cultivados em meio Tryptone Soya Broth (TSB) (Apêndice C) suplementado com L-triptofano (5mM), no escuro por 24 horas à 30°C, sob agitação (150rpm). Foram então centrifugados (12.000rpm) 1,5mL da cultura dos isolados, durante 5 minutos. Posteriormente, foi transferido uma alíquota de 1mL do sobrenadante obtido para outro eppendorf, no qual foi adicionado 1mL do reagente de salkowski ( $\text{FeCl}_3$  0,5 mol.  $\text{L}^{-1}$ , 1mL;  $\text{HClO}_4$  35%, 49mL) (SERGEEVA; LIAIMER; BERGMAN, 2002) sendo incubada por 30 min. na ausência de luz e avaliadas posteriormente utilizando espectrofotômetro à 520nm.

A concentração de compostos indólicos foi estimada por meio de uma curva padrão, previamente preparada com meio de cultura estéril não inoculado, com quantidades conhecidas de AIA: 0; 0,5; 10; 30; 50; 70; 90 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , de acordo com a equação  $Y = 0,016X + 0,002$  ( $R^2 = 0,995$ ). O ensaio foi realizado em triplicata. De acordo com a produção de AIA, foram classificados em baixa ( $< 1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); média (1 - 11  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ); alta (11 - 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e elevada produção ( $> 50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (KAVAMURA et al., 2013).

### 4.2.3 Experimento em casa de vegetação com leguminosas

#### 4.2.3.1 Delineamento experimental

Foi montado um experimento em casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE. O experimento foi conduzido com um delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições. Foram utilizadas 3 espécies de leguminosas, que possuem diferentes faixas hospedeiras: feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L. cv. princesa); feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp cv. IPA 206) e soja (*Glycine Max* L. meir, FTR 3191 IPRO, 131-21/20). Os tratamentos foram: inoculações com 20 isolados de rizóbio e dois controles sem inoculação, sendo um com adubação nitrogenada e o outro um controle absoluto.

### 4.2.3.2 Preparo do inoculante

Foram utilizados 20 isolados de rizóbio provenientes da raiz de cana-de-açúcar cultivada em consórcio com feijão-caupi. Para o preparo dos inoculantes, as bactérias foram crescidas, em condições monoxênicas, em meio YM líquido, em agitador rotatório (150 rpm), de acordo com o tempo de crescimento do isolado (por 48 horas rápido e 120 horas lento). Após o crescimento, os inoculantes foram submetidos a leitura da densidade ótica para estimar a quantidade de células bacterianas. Todas as bactérias foram diluídas com o próprio meio para se obter uma concentração de  $10^8$  células  $\text{ml}^{-1}$  e então realizada a inoculação.

### 4.2.3.3 Instalação do experimento

Para a montagem do experimento, foram utilizadas 3 sementes por pote e após 10 dias realizado o desbaste, ficando uma planta por vaso com capacidade para 500g de substrato estéril (areia e vermiculita, na proporção de 1:1). O experimento teve delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições e 22 tratamentos (inoculação com 20 isolados de rizóbios e dois tratamentos controle sem inoculação, sendo um com adição de N mineral e outro um controle absoluto sem N). A adubação nitrogenada, em quantidade equivalente à dose recomendada em campo para cada cultura, conforme Manual de Recomendação de Adubação para o Estado de Pernambuco (IPA, 2008), foi dividida em 4 doses e aplicadas nas primeiras quatro semanas. Foi utilizada 80 ml de solução nutritiva de Norris duas vezes por semana e água destilada de forma a manter em torno de 70% da capacidade de pote.

**Figura 1:** Inoculação nas sementes de soja (A) e Experimento completo em casa de vegetação (B)



#### **4.2.2.4 Parâmetros avaliados**

A coleta das plantas foi realizada em torno de 45 dias após o plantio, quando foi analisada a nodulação, sendo a parte aérea cortada rente à superfície do substrato, no colo da planta. As raízes foram separadas da parte aérea e lavadas, os nódulos foram destacados e o substrato restante tamisado em peneira com malhas de 2 mm para resgate dos nódulos caídos. Após isso, o material (parte aérea e raiz) foi acondicionado em sacos de papel, identificado e levado à estufa de circulação forçada de ar (72 horas a 60°C) para secagem e determinação da biomassa seca. Os nódulos foram lavados, contados e acondicionados em potes com sílica gel para remoção da umidade e determinação da massa seca.

#### **4.2.2.5 Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando o F foi significativo, foram realizadas comparações de médias utilizando o programa computacional Sisvar (FERREIRA, 2011), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **4.3 Resultados e Discussão**

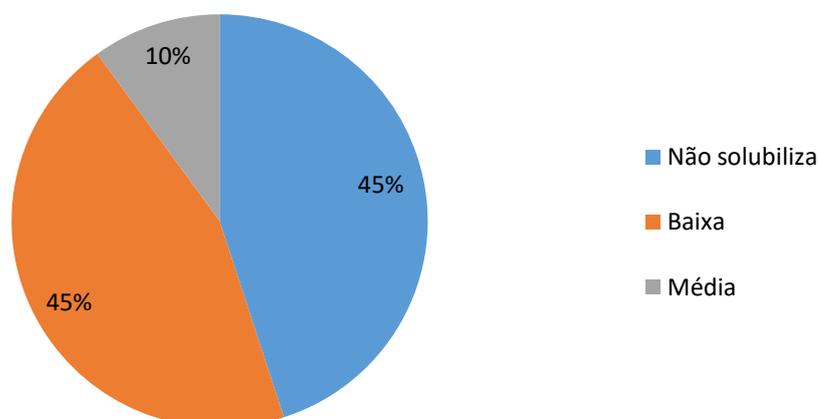
#### **4.3.1 Produção de substâncias promotoras de crescimento**

##### **4.3.1.1 Solubilização de fosfato**

Nenhum dos isolados foi capaz de solubilizar o fosfato de alumínio (P-Al), resultado também encontrado por Souza et al. (2021), que avaliaram rizóbios provenientes de solos ácidos da região de Manaus e por mais que 100% dos isolados mostraram-se tolerantes à acidez, nenhum solubilizou o fosfato de alumínio.

O fosfato de cálcio foi disponibilizado por 55% (11) dos 20 isolados, percentual superior ao encontrado por Souza et al., (2021), que foi de 41%. Dos isolados que solubilizaram o P-Ca, 27,27% solubilizaram de forma precoce (até 3 dias) e 72,72% de forma tardia (após o 3º dia). A solubilização foi baixa na maioria dos isolados (82%) e média em 18%, o que equivale a 8 e 3 tratamentos. Nenhum isolado apresentou solubilização alta.

**Figura 2-** Frequência da solubilização de fosfato de cálcio pelos isolados obtidos da raiz de cana-de-açúcar. De acordo com o IS obtido: ( - ) não solubiliza; IS < 2 baixo; IS 2 - 4 médio e IS > 4 alto



A eficiência agrônômica no uso adequado dos fosfatos tem sido um desafio no manejo de solos no Brasil devido a limitação da fertilidade em regiões tropicais que é fortemente afetada pela deficiência do P, pois boa parte da adubação fosfatada fica indisponível à planta, por conta do fenômeno da fixação do P em reação com componentes do solo, o que faz com que grandes quantidades de fosfatos sejam necessárias para suprir essa deficiência e alcançar a necessidade do elemento para as plantas (HALVERSON; HANDELSMAN, 1991; MENDES; REIS JUNIOR, 2003). RESENDE; FURTINI NETO, 2007). Nesse contexto, é importante estudar outras fontes fosfatadas como alternativas de menor custo e maior poder residual, implementar melhores práticas de manejo de fertilizantes como aplicação da fonte correta, aplicada na taxa certa, no momento certo e no lugar certo (ROBERTS; JOHNSTON, 2015) e buscar alternativas para tornar este fósforo assimilável para as plantas, como é o caso da utilização de micro-organismos solubilizadores de fosfato.

Apesar dos rizóbios serem micro-organismos endofíticos, sua capacidade de solubilizar fosfatos pode ser de alguma importância durante sua fase saprofitica nos solos ou fornecendo compostos solubilizadores que podem fazer parte dos exsudados das raízes das leguminosas, atuando dessa forma na solubilização de formas de elementos não disponíveis no solo.

#### 4.3.1.2 Produção de Ácido-Indol-Acético

Houve produção de AIA por todos os isolados, 60% deles tiveram média e 40% alta produção de AIA. Nenhum isolado teve produção baixa ou elevada. Resultado superior ao

encontrado por Sousa et al. (2021), em que apenas 52% dos rizóbios foram capazes de sintetizarem metabólito em meio com triptofano e tiveram a produção classificada entre baixa (38%) e média (52%).

Esse resultado mostra que os isolados possuem uma capacidade bastante favorável em relação a promover o crescimento das plantas por meio deste mecanismo.

**Tabela 1:** Solubilização de P-Ca, produção de AIA e identificação dos isolados com base no 16S RNA

<b>Isolado</b>	<b>Solubilização de Fosfato de Cálcio</b>	<b>AIA</b>	<b>Identificação do isolado</b>
<b>1</b>	++	+++	<i>Enterobacter</i>
<b>2</b>	+	+++	<i>Rhizobium</i>
<b>3</b>	+	+++	<i>Rhizobium</i>
<b>4</b>	+	+++	<i>Rhizobium</i>
<b>5</b>	+	++	<i>Leifisonia</i>
<b>6</b>	+	+++	<i>Rhizobium</i>
<b>7</b>	+	+++	<i>Rhizobium</i>
<b>8</b>	+	+++	<i>Rhizobium</i>
<b>9</b>	+	++	<i>Rhizobium</i>
<b>10</b>	-	++	<i>Leifisonia</i>
<b>11</b>	-	++	<i>Leifisonia</i>
<b>12A</b>	-	++	
<b>12B</b>	-	++	
<b>13A</b>	-	++	<i>Bradyrhizobium</i>
<b>13B</b>	-	++	<i>Bradyrhizobium</i>
<b>14</b>	+	++	
<b>15</b>	+	++	
<b>16A</b>	+	++	<i>Bradyrhizobium</i>
<b>16B</b>	+	++	<i>Bradyrhizobium</i>
<b>17</b>	++	+++	<i>Enterobacter</i>

#### 4.3.1.4 Experimentos em casa de vegetação com leguminosas

- Feijão comum

No momento da coleta, foi observado que o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Princesa) não formou nódulo em nenhum tratamento. A média de diâmetro dos caules das plantas variou entre 2,24 e 2,97mm, já em relação a altura os tratamentos tiveram entre 12,04 e 19,50 cm. Não houve diferença estatística entre os tratamentos. A BSPA e BSR tiveram valores entre 0,24 a 0,38g e 0,44 a 0,87g, respectivamente. Por mais que os isolados avaliados no experimento possuam mecanismos de promoção de crescimento como solubilização de fosfato de cálcio e/ou produção de AIA, como não houve formação de nódulo, a contribuição deles para o feijão comum não foi eficiente como o esperado, já que se sabe que na relação simbiótica rizóbio-leguminosa há um beneficiamento bastante considerável para a leguminosa em relação do suprimento de nitrogênio.

Como a cultivar possui microssimbiontes conhecidamente eficazes em formar nódulos (CAMPANHARO et al., 2013), podemos concluir que os isolados não possuem capacidade de nodular o *Phaseolus vulgaris* L. cv. Princesa.

- Soja

No caso da soja, não houve nodulação entre os tratamentos. O diâmetro e a altura variaram entre 2,97 a 3,69 mm e 25,25 a 32,88 mm, respectivamente. Já a BSPA e BSR teve valores entre 0,61 a 1,33g e 0,67 a 1,34g, respectivamente. Não houve diferença estatística entre os tratamentos.

As plantas de soja podem interagir com diversos gêneros bacterianos, como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Azorhizobium* e (*Para*)*Bulkholderia* (GYANESHWAR et al., 2011; ARTIGAS RAMÍREZ et al., 2019; SHARAF et al., 2019). Já é sólido o conhecimento de que a soja possui especificidade em nodular com algumas espécies do gênero *Bradyrhizobium* como o *B. japonicum* (ZUFFO et al., 2020; ZUFFO et al., 2022) e *B. elkanni* (ROCHA et al., 2021). Essa relação é bastante específica, porém também muito eficaz, chegando à inoculação com *B. japonicum* substituir 100% da adubação nitrogenada (ZUFFO et al., 2020).

Segundo Hungria (2002), para ocorrer uma boa infecção nas raízes de soja a quantia mínima de células viáveis é no mínimo 600.000 de *Bradyrhizobium* por semente, sendo realizado antes de iniciar a semeadura, as bactérias em contato com a semente começam a germinação e elas iniciam a colonização na raiz da leguminosa e o desenvolvimento dos nódulos.

Como não se encontra naturalmente a presença de bactérias deste gênero nos solos brasileiros, é indicado realizar a inoculação. Atualmente, o Brasil conta com quatro estirpes disponíveis: SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 5019 e SEMIA 587 (NOGUEIRA; HUNGRIA; ARAÚJO, 2013). Um dos fatores que favorece o uso de *Bradyrhizobium* é a especificidade da infecção deste gênero na soja. As estirpes disponíveis comercialmente possuem um mecanismo de reconhecimento na associação do rizóbio com a leguminosa que obedece a um complexo conjunto de informações genéticas entre as partes interessadas. No caso, diversos genes atuam para que os rizóbios se associem com a planta hospedeira (soja) de forma benéfica (CARDOSO; FREITAS, 1992; YUSUF; SIEMENS; BULLOCK, 1999).

- Feijão-caupi

**Figura 3:** Experimento com feijão-caupi: inoculação (A) e experimento montado (B)



Fotos da autora

Na coleta do feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp cv. IPA 206) aos 35 dias após a inoculação, as medidas dos diâmetros (DIA) das plantas variaram entre 3,09 e 3,74 mm, não havendo diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 2). Na Biomassa seca da parte aérea (BSPA) a estirpe BR3267 teve a maior média com 0,53g, porém não diferiu dos tratamentos 13B, 17 e 14, que apresentaram médias de 0,41g, 0,38g e 0,36g, respectivamente. O isolado 9 foi o que apresentou o menor desenvolvimento da parte aérea, pesando apenas 0,18g.

Já em relação a biomassa seca da raiz (BSR) o tratamento com aplicação de nitrogênio e o isolado 11 foram os que se destacaram, diferindo significativamente apenas do tratamento 13A.

Era esperado que o controle nitrogenado influenciasse positivamente os parâmetros biométricos avaliados. No caso da inoculação com a estirpe BR3267, esperava-se que contribuísse

bastante para o desenvolvimento da cultura, visto que é a estirpe recomendada, porém acredita-se que a bactéria teve sua eficiência diminuída, bem como a dos demais rizóbios que foram inoculados, devido à elevada temperatura dentro da casa de vegetação e dentro do próprio substrato, que foram superiores a 50°C e 43°C, respectivamente.

**Tabela 2:** Biometria das plantas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp cv. IPA 206) inoculadas com rizóbios em casa-de-vegetação

	<b>DIA</b>	<b>BSPA</b>	<b>BSR</b>
	<b>(mm)</b>	<b>(g)</b>	<b>(g)</b>
<b>1</b>	3,38	0,33bcd	0,39ab
<b>2</b>	3,20	0,26 bcd	0,30ab
<b>3</b>	3,22	0,30 bcd	0,30ab
<b>4</b>	3,22	0,27 bcd	0,25ab
<b>5</b>	3,40	0,28 bcd	0,36ab
<b>6</b>	3,09	0,27 bcd	0,24ab
<b>7</b>	3,10	0,25 bcd	0,27ab
<b>8</b>	3,42	0,28 bcd	0,29ab
<b>9</b>	3,40	0,18d	0,23ab
<b>10</b>	3,74	0,30 bcd	0,30ab
<b>11</b>	3,30	0,34 bcd	0,38a
<b>12A</b>	3,12	0,29 bcd	0,22ab
<b>12B</b>	3,70	0,29 bcd	0,24ab
<b>13A</b>	3,59	0,21cd	0,18b
<b>13B</b>	3,73	0,41ab	0,23ab
<b>14</b>	3,63	0,36abcd	0,26ab
<b>15</b>	3,39	0,31 bcd	0,20ab
<b>16A</b>	3,57	0,27 bcd	0,22ab
<b>16B</b>	3,54	0,31 bcd	0,27ab
<b>17</b>	3,74	0,38abc	0,25ab
<b>N</b>	3,32	0,30 bcd	0,40a
<b>CONTROLE</b>	3,48	0,26 bcd	0,28ab
<b>BR3267</b>	3,56	0,53a	0,33ab
<b>CV</b>	8,82	23,22	29,37

\*Letras minúsculas comparam médias na mesma coluna pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Não houve transformação de nenhum dado. CV: coeficiente de variação. DIA: Diâmetro, BSPA: Biomassa Seca da Parte Aérea, BSR: Biomassa Seca da Raíz

As plantas inoculadas com os isolados: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 17, bem como o controle absoluto (sem inoculação) nem o controle nitrogenado apresentaram nódulos.

Um dos motivos que justificaria a ausência de nódulos nos tratamentos acima (exceto o controle absoluto e nitrogenado) é que os genes de nodulação de rizóbios estão organizados em diversos operons, que podem estar localizados no cromossomo (LOH et al., 2003) ou em grandes plasmídeos simbióticos pSym (DÁVILA, 2005; FREIBERG et al., 1997), dependendo da espécie (CHEN et al., 2005). Quando esses genes são localizados nos plasmídeos, podem ser perdidos com o tempo, deixando o rizóbio sem capacidade de nodular.

Outro ponto é que o feijão-caupi possui uma preferência por *Bradyrhizobium* em relação ao *Rhizobium*, então em condições de estresse da casa de vegetação pelos fatores já citados acima, conseguiu formar simbiose com seu microssimbionte preferido, não havendo nódulos nos tratamentos com o *Rhizobium*. Dessa forma, o feijão-caupi foi hábil para detectar *Rhizobium* no experimento de prospecção e no de autenticação, mas parece não ter afinidade com eles.

Na avaliação da nodulação das plantas de feijão-caupi que nodularam (Tabela 5), o tratamento 16B teve a maior média em relação ao número de nódulos, com 321 nódulos por planta e o isolado 12A apresentou menor média, de 42,33 nódulos. Porém, mesmo tendo diferença significativa entre os tratamentos em relação ao NN, o isolado 16B não se destaca na produção de biomassa total do nódulo, o que conseqüentemente leva a ter uma biomassa individual de nódulo menor.

A estirpe de *Bradyrhizobium* BR 3267 apresentou maior média em relação à Biomassa Seca Total de Nódulos (BSTN) da planta ( $93,43 \text{ mg.planta}^{-1}$ ), o que refletiu também na Biomassa Seca Individual de Nódulos (BSIN), mostrando que seus nódulos estavam em menor quantidade, porém apresentavam um maior tamanho, que é o desejável para uma nodulação mais eficiente.

**Tabela 3:** Avaliação da nodulação nas plantas de feijão-caupí cultivadas em casa de vegetação

	NN	BSTN (mg.planta <sup>-1</sup> )	BSIN (mg.planta <sup>-1</sup> )
<b>12A</b>	42,33 c	5,26 c	0,1185 ab
<b>12B</b>	146,33 abc	22,16 abc	0,1694 ab
<b>13A</b>	152,66 abc	23,26 abc	0,1339 ab
<b>13B</b>	299,33 ab	33,83 abc	0,1276 b
<b>14</b>	261,00 ab	49,16 abc	0,1980 ab
<b>15</b>	69,00 bc	13,86 bc	0,1634 ab
<b>16A</b>	149,33 abc	16,66 abc	0,0935 b
<b>16B</b>	321,00 a	53,26 ab	0,1634 ab
<b>BR3267</b>	225,33 ab	93,43 a	0,4156 a
<b>CV</b>	10,78	26,14	23,20

\*Letras minúsculas comparam médias na mesma coluna pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para poder passar no teste de normalidade de Skapiro-Wilk (0,05 de significância) os dados foram transformados em Log. CV: coeficiente de variação. NN: Número de Nódulos, BSTN: Biomassa Seca total de Nódulos, BSIN: Biomassa Seca Individual de Nódulos

Como a concentração do inoculante foi padronizada, a quantidade de nódulos pode estar fortemente associada aos fatores intrínsecos do ambiente em que as bactérias fixadoras se encontravam na casa de vegetação, que apresentava variações de temperatura que superavam 50° C fora do substrato e 43°C dentro do substrato onde as plantas se encontravam. Assim, fatores edafoclimáticos como temperatura, salinidade, umidade, pH do solo, resistência a substâncias tóxicas, entre outros, influenciam a eficiência da simbiose (VALENTE et al., 2007).

**Figura 4:** Comparação entre plantas (A), sistema radicular (B) e nódulos (C) de plantas inoculadas com a BR 3267 e o isolado 16B.



Fotos da autora

No geral, as plantas inoculadas com os tratamentos onde houve formação de nódulos, apresentavam claramente deficiência de nitrogênio identificada pela cor amarelada e posterior queda das folhas e também pela coloração dos nódulos que apresentaram-se brancos, mostrando assim que não estavam ativos e realizando a FBN. Nas plantas inoculadas com a BR3267, a parte aérea apresentava menor sintoma de deficiência, porém ainda não era o esperado, dada a incontestável eficiência da estirpe em realizar a FBN e seus nódulos não estavam todos róseos (Figura 5).

**Figura 05:** Nódulos inativos (brancos) e ativos (róseos) de uma mesma planta de feijão-caupi inoculada com a BR3267



Foto da autora

O feijoeiro, considerada uma planta promíscua, é capaz de formar simbiose com uma grande diversidade de rizóbios dentre eles *R. leguminosarum* *bv. phaseoli*, *R. tropici*, *R. etli*, *R. giardinii* e *R. gallicum* (MOSTASSO et al., 2002; GRANGE E HUNGRIA, 2004), além de espécies dos gêneros *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e com  $\beta$  proteobactérias do gênero *Burkholderia*. Dessa forma a taxonomia baseada na especificidade da planta hospedeira foi sendo substituída pela taxonomia numérica, que leva em conta as características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares (HUNGRIA et al., 1997).

Contudo, essas simbioses variam em eficiência e podem ser limitadas por incompatibilidade em diferentes etapas do processo de formação dos nódulos, induzindo desde nódulos vazios a nódulos amorfos ou infectados, mas sem a diferenciação adequada do rizóbio em bacteróides e a consequente fixação biológica do nitrogênio, (MICHIELS et al., 1998).

Dessa forma, esses fatores justificariam a ausência de nodulação de alguns isolados e a não eficiência dos nódulos dos tratamentos em que houve formação de nódulos.

#### 4.4 Conclusões

Dos 20 isolados avaliados, 55% apresentam potencial de solubilização de fosfato de cálcio e nenhum solubiliza fosfato de alumínio; houve produção de AIA por todos os isolados, 60% deles tiveram média e 40% alta produção de AIA.

Nenhum isolado é capaz de nodular o feijão comum nem a soja;

Doze isolados não foram capazes de nodular o feijão-caupi, podendo este resultado estar relacionado à possível perda da capacidade de nodular desses rizóbios ou ser devido às condições do ambiente, como a alta temperatura, terem beneficiado a simbiose apenas com seu microssimbionte preferido, o *Bradyrhizobium*.

Oito isolados nodularam o feijão-caupi, porém tiveram nódulos pequenos e inativos, mostrando que não estavam realizando a FBN

## REFERÊNCIAS

- ARTIGAS RAMÍREZ, M.D. *et al.* *Burkholderia* and *Paraburkholderia* are predominant soybean rhizobial genera in venezuelan soils in different climatic and topographical regions. **Microbes Environmental**, v. 34, p. 43–58, 2019
- BATISTA, F. *et al.* Potencial de microrganismos rizosféricos e endofíticos de milho em solubilizar o fosfato de ferro e produzir sideróforos. **Embrapa Milho e Sorgo**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2018.
- BLANCO, E. L.; CASTRO Y. Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatógenos, y su actividad microbiana con potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador, **Revista Colombiana de Biotecnología**, v.23, n.1, 2021.  
<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.84808>
- BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v.17, p.399-406, 1976.
- CAMPANHARO, M. ; MONNERAT, P. H.; ESPINDULA, M. C.; SOUZA, W. Resposta do feijoeiro princesa cultivado em argissolo e neossolo à aplicação de níquel. **Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América**, v. 38, n.6, p. 465-470, 2013.
- CARDOSO, E. J.; FREITAS, S. S. **Rizosfera**. In: CARDOSO, Elke Jurandy Bran Nogueira et al. (Ed.). *Microbiologia dos solos*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 41-58.
- CHEN, X.C.; FENG, J.; HOU, B.H.; LI, F.Q.; LI, Q.; HONG, G.F. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 2540–2548, 2005. <https://doi.org/10.1093/nar/gki537>
- DÁVILA, G.; GONZÁLES, V.; RAMÍRES-ROMERO, M. A.; RODRÍGUES, O. *Rizobium Etli* Genome Biology. In: PALACIOS, R.; NEWTON, W. E. (Ed.). *Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms*. , **Springer & Business Media**, v. 3, p. 133-143, 2005.
- EMBRAPA. **Fixação biológica de nitrogênio - perguntas e respostas**. Embrapa, Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-fixacao-biologica-de-nitrogenio/perguntas-erespostas>. Acesso em: 22 abr. 2022.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- FLOSS, E. L. **Fisiologia das plantas cultivadas: o estudo que está por trás do que se vê**. 5. ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2011. 734 p.
- FREIBERG, C.; FELLAY, R.; BAIROCH, A.; BROUGHTON, W. J.; ROSENTHAL, A.; PERRET, X. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. **Nature**, v. 387, p. 394-401, 1997.

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

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A.M.; MOULIN, L.; CHEN, W.-M.; ELLIOTT, G.N.; BONTEMPS, C. Legume-nodulating Betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. **Mol Plant Microbe Interact**, 24, 1276–1288, 2011

HALVERSON, L.J.; HANDELSMAN, J. Enhancement of soybean nodulation by *Bacillus cereus* UW85 in the field and in a growth chamber. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.2767-2770, 1991.

HARA, F. A.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, 34, 343-357, 2004.

HUNGRIA, M.; VARGAS M.A.; ARAUJO R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997, p.189-295

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of *soybeans* and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility Soils**, v. 49, p. 791–801, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Cerrados, v. 13, 2002. p. 48. ISBN ISSN. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/459673> . Acesso em: 20 abr. 2022.

IPA - Instituto de Pesquisas Agropecuárias. **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco**, 2nd edn. Recife PE, 2008

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L. A. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183-191, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L.; Fixação de Nitrogênio e Produção de Ácido Indolacético in vitro por Bactérias Diazotróficas Endofíticas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.42, n.10, 1459-1465, 2007

LOH, J.; STACEY, G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 10-17, 2003.

MATOS, G. F. *et al.* *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov., a legume nodulating bacterium isolated from sugarcane roots. **Archives of Microbiology**, v. 199, p.1251–1258, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1398-6>

MEDEIROS, E. V.; SILVA, K. J.; MARTINS, C. M.; BORGES, W. L. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.2, n. 2, 2007.

- MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B. **Micro-organismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica**. Planaltina, DF: Embrapa, 2003.
- MICHIELS, J., DOMBRECHT, B., VERMEIREN, N., XI, C., LUYTEN, E., VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 193-205, 1998
- MOREIRA, F. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006.
- MOREIRA L. P.; OLIVEIRA A. P. S.; FERREIRA E. P. B. Nodulation, contribution of biological N<sub>2</sub> fixation, and productivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculated with rhizobia isolates. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 11, p. 644–651, 2017.
- MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F., L.; VARGAS, M., A.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, n. 2, p. 121–132, 2002.
- RESENDE, A.V.; FURTINI NETO, A. E. **Aspectos relacionados ao manejo da adubação fosfatada em solos do cerrado**. Planaltina: EmbrapaCerrados, 2007, 32p
- ROBERTS, T. L.; JOHNSTON, A. E. Phosphorus use efficiency and management in agriculture, **Resources, Conservation and Recycling**, v.105, p.275-281, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2015.09.013>.
- ROCHA, L. B. *et al.* *Bradyrhizobium brasilense* como um eficiente microssimbionte de soja em dois solos contrastantes da região Sudoeste do Piauí (bioma Cerrado). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v.16, n.3, p.212, 2021. <https://doi.org/10.5039/agraria.v16i3a212>
- SANTOS, C. S. *et al.* Solubilização de fosfatos inorgânicos por bactérias endofíticas isoladas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa*). **Revista Craibeiras de Agroecologia**, v.1, n. 1, 2018.
- SANYAL, D.; OSORNO, J. M.; CHATTERJEE, A. Influence of *Rhizobium* inoculation on dry bean yield and symbiotic nitrogen fixation potential, **Journal of Plant Nutrition** , v. 43, n. 6, p. 798-810, 2019.
- SERGEEVA, e.; LIAIMER, A.; BERGMAN, B. Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. **Planta**, 215, 229,238, 2002.
- SHARAF, H.; RODRIGUES, R.R.; MOON, J.; ZHANG, B.; MILLS, K.; WILLIAMS, M.A. Unprecedented bacterial community richness in *soybean* nodules vary with cultivar and water status. **Microbiome**, v. 7, n. 63, 2019
- SOUZA, L. C. C.; HARA, F. A. S.; VENDRUSCOLO, J.; INÁCIO, A. C. F.; SILVA, M. S. Caracterização morfofisiológica de isolados de rizóbios provenientes de solos ácidos da Amazônia Central. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.12, n.4, 2021.  
<https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2021.004.0003>
- 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.

VILLANUEVA, N. S. Mecanismos de inducción de rizobios para reducir el estrés por sequía en las leguminosas. **Revista de Investigaciones Altoandinas**, v. 23, n. 4, p. 258-265, 2021.

<http://dx.doi.org/10.18271/ria.2021.263>

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RIBEIRO, J. R. A. RUMJANEK, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Caatinga**, v. 19, n. 1, p. 25-33, 2006

ZUFFO, A. M.; RATKE, R. F.; AGUILERA, J. G.; SANTOS FILHO, F. N.; YOKOTA, L. A.; MORAIS, D. B. Adubação nitrogenada associada à inoculação de *bradyrhizobium japonicum* pode aumentar a produtividade e o teor de proteínas de grãos de soja? **Revista Agronômica Ambiental**, v. 13, n. 4, p. 1391-1407, 2020. <https://doi.org/10.17765/2176-9168.2020v13n4p1391-1407>

ZUFFO, A. M.; RATKE, R. F.; STEINER, F.; AGUILERA, J. G. Agronomic characteristics of soybean cultivars with late-season nitrogen application in supplementation to the inoculation of *Bradyrhizobium* spp. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 46, n. 022521, 2022.

<http://dx.doi.org/10.1590/1413-705420224602252>

YUSUF, R, SIEMENS, J, BULLOCK, D. Growth analysis of soybean under no-tillage and conventional tillage systems. **Agronomy Journal**, v. 91, p.928–933, 1999.

**Capítulo 3: PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E HISTOLÓGICOS DE MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM RIZÓBIOS**

## 5. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E HISTOLÓGICOS DE MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM RIZÓBIOS

### Resumo

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) reduz o uso de adubos nitrogenados, pela associação com bactérias capazes de quebrar a ligação tripla do nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), transformando-o em amônia, assimilável pelas plantas. Bactérias do grupo dos rizóbios são conhecidas por infectar raízes de leguminosas, formando nódulos onde fixam o N atmosférico. Vários isolados de rizóbios de gramíneas possuem, além da capacidade de realizar a FBN, outros mecanismos de promoção de crescimento de plantas, como a produção de hormônios vegetais. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação com rizóbios previamente isolados de tecido de cana-de-açúcar sobre o crescimento, produção de biomassa e parâmetros morfoanatômicos de raízes da planta. Foi montado um experimento em casa de vegetação, utilizando tubetes de 180 cm<sup>3</sup>, preenchidos com substrato inerte autoclavado (areia e vermiculita 2:1). A variedade utilizada foi a RB92579. As mudas de cana-de-açúcar foram obtidas pelo sistema de multiplicação de mudas pré-brotadas (MPB). O experimento teve delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições e 22 tratamentos (inoculação com 20 isolados de rizóbios e dois tratamentos controle sem inoculação, sendo um com adição de N mineral e outro um controle absoluto sem N). Foram utilizadas 5 plantas por parcela experimental. Foram realizadas avaliações biométricas aos 30 e 70 dias (altura da planta, diâmetro do colmo, produção de biomassa aérea e de raízes, número de folhas e comprimento de raiz) e avaliações das características morfoanatômicas das raízes aos 70 dias. Aos 30 dias, não houve diferença entre os tratamentos. Aos 70 dias foi observado efeitos positivos com a inoculação, sendo este de até 50% na produção de biomassa seca das raízes em relação ao controle absoluto. A inoculação em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar aumentou a densidade e comprimento de pêlos radiculares. A espessura do velame, córtex e sistema vascular também foram influenciados positivamente pela inoculação, chegando a um aumento de até 5 vezes na espessura do sistema vascular. Dessa forma, a inoculação com as bactérias pode ser considerada adequada para a utilização como inoculante na cana-de-açúcar, porém é necessário avaliar suas contribuições em campo.

Palavras-chave: *Saccharum* spp. Bactérias promotoras de crescimento. Morfoanatomia da raiz.

## BIOMETRIC AND HISTOLOGICAL PARAMETERS OF PRE-BURNED SUGARCANE SEEDLINGS INOCULATED WITH RHIZOBIA

### Abstract

Biological nitrogen fixation (BNF) reduces the use of nitrogen fertilizers, through association with bacteria capable of breaking the triple bond of atmospheric nitrogen (N<sub>2</sub>), transforming it into ammonia, which can be assimilated by plants. Rhizobia bacteria are known to infect legume roots, forming nodules where they fix atmospheric N. Several rhizobia isolate from grasses have, in addition to the ability to perform BNF, other plant growth promotion mechanisms, such as the production of plant hormones. Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of inoculation with rhizobia previously isolated from sugarcane tissue on growth, biomass production and morphoanatomical parameters of plant roots. An experiment was carried out in a greenhouse at UFRPE, using 180 cm<sup>3</sup> tubes, filled with autoclaved inert substrate (sand and vermiculite 2:1). The variety used was RB92579. The sugarcane seedlings were obtained by the pre-sprouted seedling multiplication system (MPB). The experiment had a randomized block design, with four replications and 22 treatments (inoculation with 20 rhizobia isolates and two control treatments without inoculation, one with the addition of mineral N and the other an absolute control without N). Five plants were used per experimental plot. Biometric evaluations were performed at 30 and 70 days (plant height, stem diameter, aerial and root biomass production, number of leaves and root length) and evaluations of the morphoanatomical characteristics of the roots at 70 days. At 30 days, there was no difference between treatments. At 70 days, we observed positive effects with the inoculation, which was up to 50% in the production of dry biomass of the roots in relation to the absolute control. The inoculation in pre-sprouted sugarcane seedlings increased the density and length of root hairs. The thickness of the canopy, cortex and vascular system were also positively influenced by inoculation, reaching an increase of up to 5 times in the thickness of the vascular system. Thus, inoculation with bacteria can be considered potential for use as an inoculant in sugarcane, but it is necessary to evaluate their contributions in the field.

Keywords: *Saccharum* spp .Growth promoting bacteria. Root morphology.

## 5.1 Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma Poacea originária do continente asiático. Gramíneas de metabolismo fotossintético C4 evoluíram primariamente nos trópicos e se adaptaram a elevadas intensidades luminosas e altas temperaturas, possuindo alta eficiência fotossintética e potencial de alta produção de biomassa, por esse motivo, são amplamente utilizadas como cultura energética na produção de etanol (LIMA et al., 2014; SILVA et al., 2021). Atualmente, a produtividade média da cultura da cana-de-açúcar no Brasil está por volta de 68,78 toneladas de colmos frescos por hectare e a adição média de fertilizantes nitrogenados é de 60 kg de nitrogênio por hectare (CONAB, 2021).

A reprodução da cana em plantios comerciais ocorre de maneira vegetativa, a partir dos toletes ou rebolos (JESUS et al., 2019). Com a evolução da tecnologia, foi desenvolvido um sistema de Mudanças Pré-Brotadas (MPB) que possibilita aumento na produção associado a um elevado padrão de fitossanidade, aumentando assim o vigor e a uniformidade do plantio (LANDELL et al., 2012). Esse novo sistema gerou diminuição no uso de matéria-prima, reduzindo em até 90% a quantidade de material utilizado, se comparado ao sistema convencional, que demandava aproximadamente 18 a 20 toneladas de mudas. Em contrapartida, com a utilização do sistema de MPB, essa quantidade era diminuída em até 2 toneladas (GOMES et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018).

Para que o sistema de propagação de MPB seja conduzido de forma sustentável, faz-se necessário aprimorar estudos visando encontrar melhores fontes de substâncias ou compostos naturais que atuem como promotores de crescimento de plantas, como os micro-organismos. Os rizóbios são bactérias diazotróficas que realizam simbiose com leguminosas e induzem a formação de estruturas especializadas, chamadas de nódulos, onde realizam a fixação biológica do nitrogênio (FBN). Além da FBN, esses rizóbios podem possuir outros mecanismos de promoção de crescimento, como produção de sideróforos, fitormônios como o ácido-indol-acético –AIA, solubilização de fosfatos, além de proteger contra doenças e estresses abióticos (SOUZA et al., 2015; BLANCO et al., 2021).

Na cana-de-açúcar, microrganismos endofíticos realizam FBN de forma associativa, mas os resultados são variáveis, sugerindo forte influência de fatores ambientais e/ou do genótipo da planta (ETESAMI; MAHESHWARI, 2018). A produção de AIA e outras substâncias promotoras de crescimento provocam alterações morfológicas na raiz (aumento das raízes laterais e dos pêlos radiculares), aumentando a absorção de nutrientes, contribuindo para o crescimento da planta e maior produtividade dos canaviais (ALVES et al., 2015; BENEDUZI et al., 2013; VIDEIRA et al., 2012).

A procura por métodos naturais de produção vegetal têm sido bastante utilizada no setor sucroenergético. A inoculação com BPCP pode contribuir para o aumento da produtividade na cultura e pode ser realizada tanto em cultivos comerciais tradicionais, que utilizam rebolos e minirrebolos como sementes (CHAVES et al., 2015), como em plantios que utilizem do sistema de MPB (GÍRIO et al., 2015). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da inoculação com rizóbios previamente isolados de tecido de cana-de-açúcar sobre o crescimento, produção de biomassa e parâmetros morfoanatômicos de raízes da planta.

## **5.2 Material e Métodos**

### **5.2.1 Experimento em casa de vegetação**

#### **5.2.1.1 Delineamento experimental**

Foi montado um experimento em casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco, utilizando tubetes de 180 cm<sup>3</sup>, preenchidos com substrato inerte autoclavado (areia e vermiculita na proporção de 2:1). A variedade de cana-de-açúcar utilizada foi a RB92579, a mais plantada no Nordeste do Brasil. As mudas foram obtidas pelo sistema de multiplicação de mudas pré-brotadas (MPB), sugerido por Landell et al. (2012). O experimento teve delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições e 22 tratamentos (inoculação com 20 isolados de rizóbios e dois tratamentos controle sem inoculação, sendo um com adição de N mineral e outro um controle absoluto sem N). Foram utilizadas 5 plantas por parcela experimental, totalizando 440 plantas.

#### **5.2.1.2 Preparo do inoculante**

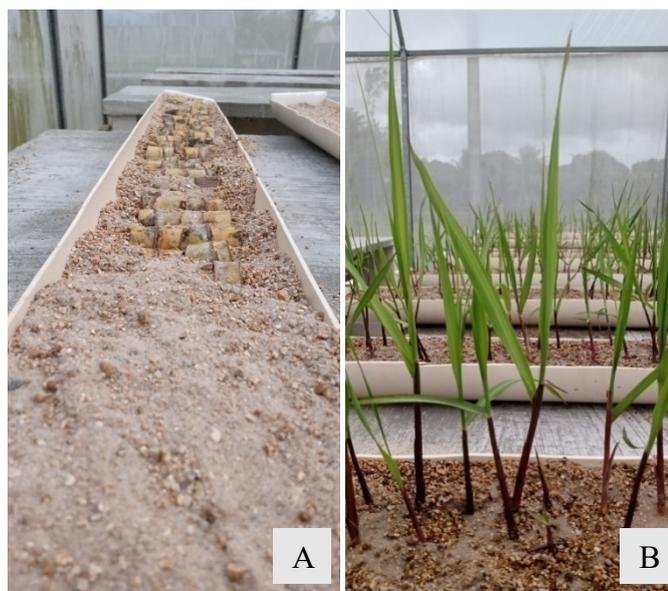
Foram utilizados 20 isolados de rizóbio provenientes da raiz de cana-de-açúcar cultivada em consórcio com feijão-caupi. Para o preparo dos inoculantes, as bactérias foram crescidas, em condições monoxênicas, em meio YM líquido, em agitador rotatório (150 rpm), de acordo com o tempo de crescimento do isolado (por 48 horas rápido e 120 horas lento). Após o crescimento, os inoculantes foram submetidos à leitura da densidade ótica para estimar a quantidade de células

bacterianas. Todas as bactérias foram diluídas com o próprio meio para se obter uma concentração de  $10^8$  células  $\text{ml}^{-1}$  e então realizada a inoculação.

### 5.2.1.3 Produção das mudas pré-brotadas e instalação do experimento

Para se obter uma estrutura de multiplicação vegetal da cana-de-açúcar no tamanho considerado de um minirrebolo (3-5 cm) contendo uma gema (ARAMAKI et al., 2010), foi utilizada uma guilhotina com lâminas cortantes. Foram utilizadas gemas mais novas, desprezando a base mais lignificada, de plantas coletadas em campo. O plantio dos minirrebolos foi feito em calhas de brotação (Figura 1), utilizando substrato inerte autoclavado (areia e vermiculita na proporção de 2:1).

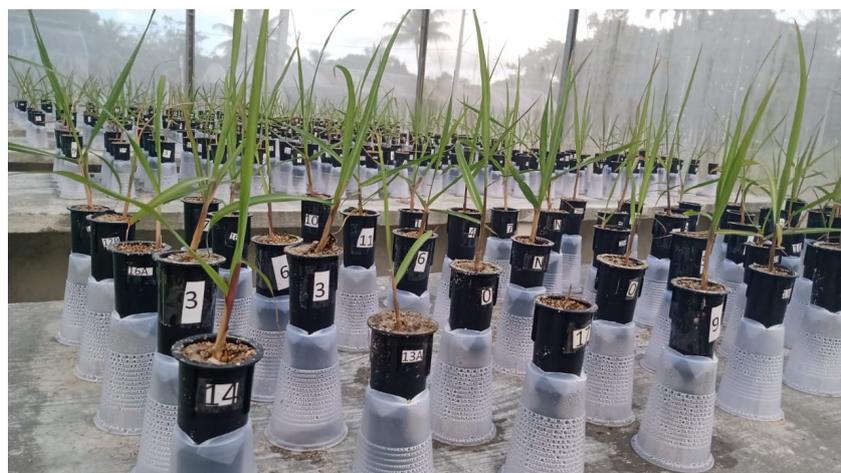
**Figura 1:** Montagem de mini rebolos em caixa de brotação (A) e mudas de cana com 17 dias (B)



Fotos da autora

Após 17 dias do plantio (Figura 1), as mudas foram transferidas para os tubetes. A inoculação foi realizada utilizando 2 ml do inoculante por minirrebolo. Repetido após 7 dias. Os tratamentos sem inoculação receberam 2 ml do meio YM sem crescimento de bactérias e o tratamento com nitrogênio recebeu uréia na quantidade equivalente à dose recomendada para a cultura. Durante a condução do experimento, as mudas foram irrigadas com 30 ml de solução de Norris sem N, duas vezes por semana, e água destilada estéril nos intervalos da aplicação da solução. Foram realizadas duas coletas, aos 30 e 70 dias após inoculação (DAI).

**Figura 2:** Experimento em casa de vegetação após montagem



Fotos da autora

#### **5.2.1.4 Parâmetros avaliados**

Foram coletadas 2 e 3 plantas de cada parcela aos 30 e 70 dias após inoculação (DAI), respectivamente. Na primeira coleta (30 dias) foi medido o diâmetro, o peso seco da parte aérea, da raiz e do rebolo. Ao fim do experimento (70 dias), foi medido o diâmetro, altura da planta (medida da base até a folha + 1), o peso seco da parte aérea, da raiz e do rebolo e o comprimento da raiz (Figura 3A). O diâmetro foi medido na base próximo ao rebolo, com a utilização de paquímetro digital (cm); para a determinação da biomassa, as amostras foram secas em estufa de circulação forçada a uma temperatura de 65 °C até atingirem peso constante.

**Figura 3:** Coleta do experimento com 70 dias: medição do comprimento da raiz (A) e amostras de raízes conservadas em etanol 70% (B).



Fotos da autora

Amostras de raízes frescas foram coletadas a partir de 5 cm do ápice (meristema apical) e fixadas em FAA50 – Formaldeído, ácido acético e álcool 50% (JOHANSEN, 1940) por 48 h, sendo, em seguida, conservadas em etanol 70%, para a observação dos parâmetros morfoanatômicos (Figura 3B).

As amostras conservadas em etanol 70% foram submetidas a série etanol/butanol 50-100%, infiltradas e emblocadas em parafina histológica, e então seccionadas transversal e longitudinalmente (Figura 4) com auxílio do micrótomo rotativo (Leica RM2125RT) (Figura 5) e com uma espessura de 12 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). Os cortes obtidos foram desparafinados, corados com azul de Alcian e safranina e montados de modo permanente com Bálsamo do Canadá (KRAUS; ARDUIN, 1997).

**Figura 4:** A-E: sequencia de montagem das lâminas: A - seccionamento; B- coleta de cortes; C- início da montagem de lâminas; D-distensão de cortes



Fotos da autora

A partir das lâminas confeccionadas, foram avaliados de modo comparativo, os seguintes parâmetros: espessura do velame ( $\mu\text{m}$ ), da região cortical ( $\mu\text{m}$ ) e do sistema vascular ( $\text{mm}^2$ ), além de densidade (pêlos/ $\text{mm}^2$ ) e comprimento dos pêlos radiculares ( $\mu\text{m}$ ). Imagens dos cortes histológicos foram feitas em microscópio óptico Leica DM500 acoplada à câmera ICC50. As imagens obtidas foram analisadas no software Image J.

**Figura 5:** Micrótopo rotativo Leica RM 2125RT

Fotos da autora

Para avaliação da densidade (pêlos/mm<sup>2</sup>) e comprimento ( $\mu$ m) dos pêlos radiculares foi utilizada a técnica de dissociação epidérmica através da utilização da solução de Franklin que consiste em uma mistura de peróxido de hidrogênio e ácido acético 1:1 (FRANKLIN, 1945) ou água sanitária 50% (KRAUS; ARDUIM, 1997, modificado). Para tanto, amostras de indivíduos dos blocos 1 ao 3 de todos os tratamentos, foram submetidas a solução de dissociação, sendo colocadas em placas de Petri ou frascos bem vedados e mantidos em estufa à 40- 50°C por 12 horas. Após esse período o material foi lavado em água destilada, para a completa remoção da solução de Franklin. Essas amostras foram então coradas com safranina e montadas em lâminas semipermanentes com glicerina 50% (KRAUS; ARDUIM, 1997). O n para cada parâmetro foi 10, em que 10 campos de 1mm<sup>2</sup> foram utilizados para avaliação da densidade dos pelos, enquanto o comprimento foi mensurado em 10 células.

A análise dos caracteres foi realizada utilizando o microscópio Leica DM750 acoplado a câmera ICC50 e o registro foi feito com auxílio do software LAS EZ 3.4

### 5.2.1.5 Análise estatística

Os resultados das avaliações foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de normalidade e homocedasticidade. As médias foram comparadas utilizando o teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ), com o software SISVAR.

## 5.3 Resultados e Discussão

### 5.3.1. Parâmetros biométricos de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar em casa de vegetação

#### 5.3.1.1 Coleta aos 30 dias após inoculação (DAI)

**Figura 6:** Sistema radicular (A) e plantas em casa de vegetação (B) no momento da coleta aos 30 dias após inoculação



Fotos da autora

Na avaliação de 30 dias, as plantas apresentaram diâmetro variando entre 5,11 cm e 6,75 cm, não apresentando diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 1). A utilização do fertilizante nitrogenado apresentou média de 5,53 cm enquanto o controle teve média superior com 6,11 cm de diâmetro. Em relação ao peso seco da parte aérea, também não houve diferença significativa entre os tratamentos variando entre 0,61 e 1,01 g.

**Tabela 01:** Biométrie de mudas-pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com rizóbios em casa-de-vegetação aos 30 dias após inoculação.

TRAT	DIA(cm)	BSPA(g)	BSR (g)	BSRE (g)
1	5,45 a	0.77 a	2,09 ab	3,33
2	5,49 a	0.96 a	1,17 ab	3,39
3	5.54 a	0.77 a	0.96 ab	3,48
4	5.55 a	0.80 a	1.29 ab	3,24
5	5.79 a	0.87 a	1.54 ab	3,57
6	5.34 a	0.95 a	1.44 ab	3,21
7	5.92 a	0.68 a	1.25 ab	3,77
8	6.48 a	0.97 a	1.03 ab	3,89
9	5.98 a	0.89 a	0.98 ab	3,51
10	6.73 a	0.77 a	1.58 ab	3,12
11	5.76 a	0.76 a	0.88 b	3,63
12A	6.41 a	0.93 a	1.76 ab	3,62
12B	6.04 a	0.88 a	1.88 ab	3,43
13A	5.27 a	0.70 a	0.64 b	3,3
13B	5.50 a	0.75 a	1.10 ab	3,27
14	6.35 a	1.01 a	1.82 ab	3,07
15	5.11 a	0.69 a	2.01 ab	3,11
16A	6.60 a	0.91 a	1.30 ab	3,14
16B	5.52 a	0.64 a	1.11 ab	3,14
17	6.05 a	0.61 a	1.28 ab	2,92
N	5.53 a	0.96 a	2.40 a	2,96
<b>CONTROLE</b>	6.11 a	0.85 a	1.94 ab	2,87
<b>CV</b>	20,31	46,14	52,43	-

\*Letras minúsculas comparam médias na mesma coluna pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Não houve transformação de nenhum dado. CV: coeficiente de variação. DI: Diâmetro, BSPA: Biomassa Seca da Parte Aérea, BSR: Biomassa Seca da Raiz e BSRE: Biomassa Seca do Rebolo

Em relação ao peso seco da raiz as médias variaram entre 0,64g e 2,40g. O controle apresentou média de 1,94g não diferindo do controle nitrogenado (2,40g) e nem dos demais tratamentos com os isolados. A menor média foi do isolado 13A, com 0,64g, diferindo estatisticamente do tratamento nitrogenado.

Já era esperado que o controle nitrogenado apresentasse maior incremento à cultura, porém não se esperava que o controle absoluto (sem adição de N fertilizante nem de inoculante) fosse uma das maiores médias, então pensamos que poderia haver correlação entre o peso seco rebolo e o peso

seco da raiz, já que um maior rebolo poderia fornecer mais nutrientes e assim contribuir mais para o crescimento da planta.

Realizamos então a correlação de Pearson, para avaliar se há alguma relação entre o tamanho dos rebolos e a raiz; o tamanho dos rebolos e a parte aérea e entre o peso da raiz e o peso da parte aérea. Todos os coeficientes de correlação de Pearson ( $r$ ) das variáveis analisadas apresentaram valores tendendo a zero, mostrando que não há relação entre as variáveis (Tabela 2).

**Tabela 2:** Coeficiente de Correlação de Pearson ( $r$ ) aos 30 dias após inoculação

	BSPA	BSR
BSRE	0,12	-0,33
BSPA	-	0,27

Dessa forma os resultados indicam que o tempo de 30 dias de avaliação das variáveis para a cultura da cana é curto já que nos primeiros dias após o plantio, o suprimento de água e nutrientes é fornecido pelo próprio rebolo e pelas raízes aí originadas (BARNES, 1964), então não pudemos avaliar o efeito dos tratamentos aplicados.

No preparo das mudas pré-brotadas, os rebolos foram padronizados em relação ao tamanho, mas não em relação ao local de coleta na planta (terço superior, médio ou inferior). A parte mais jovem da cana (terço superior) tem gemas de melhor qualidade que impacta na germinação e desenvolvimento das mudas, por serem mais ativas metabolicamente. Indo mais para a base da planta (terço inferior) as gemas podem estar mais senescentes, possuindo menor vigor (ARNT, et AL., 2017; SOUZA et al., 2020).

Assim, o desenvolvimento das plantas na primeira coleta (30 dias) está relacionado mais com essas características da muda utilizada (local de origem da gema) e o curto tempo de avaliação não permitiu que o efeito da inoculação com os rizóbios fosse observado, o mesmo pode ser observado no trabalho de Girio et al., (2015). Novos testes poderão ser realizados levando em consideração o ciclo da cultura.

### 5.3.1.2. Coleta aos 70 dias após inoculação

Na avaliação dos parâmetros biométricos das MPB de cana-de-açúcar aos 70 dias, pode-se observar influência dos tratamentos (Tabela 3). As plantas que receberam adubação nitrogenada apresentaram maior média em relação ao DIA (8,37cm) e ALT (52,32cm). A menor média foi do

tratamento 1, para os mesmos parâmetros, sendo 4,90cm (DIA) e 26,30 cm (ALT). Em relação ao número de folhas os tratamentos 5 e 13B apresentaram a melhor média, diferindo do controle absoluto (sem inoculante e sem nitrogênio). Não houve diferença estatística em relação à BSPA. No comprimento da raiz o melhor resultado foi do tratamento 8 com 40,36 cm, diferindo apenas do tratamento 1 (23,42cm).

**Tabela 3.** Biometria de mudas-pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com rizóbios em casa-de-vegetação aos 70 dias após inoculação.

Trat.	DIA (cm)	BSPA (g)	ALT (cm)	NF	CR (cm)	BSR (g)	BSRE (g)
1	4,90 d	0,88	26,30 d	7,22ab	23,42 b	1,32b	2,94
2	6,45 bcd	1,03	35,53 bcd	7,40ab	29,68 ab	2,03ab	3,58
3	6,93 abc	1,33	42,09 abc	8,00ab	27,59 ab	2,31ab	3,27
4	6,34 bcd	0,99	33,05 cd	7,10ab	29,77 ab	1,86ab	3,12
5	7,51 abc	1,31	39,50 abcd	8,36a	36,43 ab	2,42ab	3,23
6	7,04 abc	1,48	40,56 abcd	8,30ab	32,61 ab	2,22ab	3,54
7	7,72 ab	1,40	38,07 abcd	7,42ab	37,00 ab	2,25ab	3,32
8	6,99 abc	1,51	42,81 abc	7,90ab	40,36 a	2,40ab	3,40
9	5,87 cd	1,07	37,76 abcd	7,54ab	36,50 ab	3,00ab	3,50
10	6,65 abcd	1,47	40,46 abcd	8,09ab	31,60 ab	2,48ab	3,44
11	6,65 abcd	0,96	37,21 bcd	7,36ab	33,50 ab	1,66ab	3,38
12A	6,81 abc	1,20	39,80 abcd	7,90ab	32,30 ab	2,12ab	3,31
12B	7,12 abc	1,45	44,50 abc	7,33ab	37,77 ab	3,25a	3,35
13A	6,66 abcd	1,48	38,61 abcd	7,50ab	34,83 ab	2,53ab	3,05
13B	6,94 abc	1,20	41,82 abc	8,36a	32,80 ab	2,04ab	3,43
14	7,37 ab	1,52	49,00 ab	8,11ab	34,36 ab	3,24a	3,10
15	7,39 abc	1,57	44,18 abc	8,09ab	30,85 ab	3,42a	3,45
16A	6,96 abc	1,34	39,41 abcd	7,44ab	30,79 ab	2,07ab	3,65
16B	7,70 abc	1,41	38,38 abcd	8,27ab	30,90 ab	2,46ab	3,59
17	7,15 abc	1,17	39,60 abcd	8,20ab	25,28 ab	2,20ab	3,57
N	8,37 a	1,73	52,32 a	8,00ab	29,33 ab	3,33a	3,37
CONTROLE	7,09 abc	1,49	42,92 abc	7,00b	29,10 ab	2,04ab	3,56
CV	15,14	53,80	20,89	4,96	28,13	45,90	-

\*Letras minúsculas comparam médias na mesma coluna pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os dados do número de folhas (NF) foram transformados utilizando LOG para obter normalidade e homocedasticidade dos dados. CV: coeficiente de variação. DI: Diâmetro, BSPA: Biomassa Seca da Parte Aérea, BSR: Biomassa Seca da Raiz e BSRE: Biomassa Seca do Rebolo

Em relação à BSR, os tratamentos 12B, 14, 15 e o controle nitrogenado (N) foram os que se destacaram com as maiores médias, diferindo estatisticamente também do tratamento 1. A formação de maior quantidade de raízes secundárias pode ter feito esses tratamentos não terem apresentado maior média também em relação ao comprimento da raiz.

Otto et al. (2009), ao avaliar a adubação nitrogenada para o desenvolvimento de raízes de cana-de-açúcar verificaram que com aumento da dose de N, houve uma redução no comprimento radicular, o que é atribuído a hipótese de que as raízes desenvolvidas próximas ao nutriente obtiveram o necessário para seu desenvolvimento e não dependem de gasto energético para o crescimento das raízes em busca do elemento, então as raízes ficam mais curtas.

Por outro lado, o uso de BPCP também pode estimular o desenvolvimento das raízes (comprimento e biomassa) por conta da produção de hormônios, melhorando absorção de água e nutrientes e consequentemente aumentando a produtividade, o que pode ser observado em casa de vegetação (GÍRIO et al., 2015; SANTOS et al., 2018) e em campo (CHAVES et al., 2015).

O tratamento com o isolado 1, apresentou as menores médias em relação aos parâmetros estudados, não sendo considerado uma boa recomendação de inoculante para a cana-de-açúcar.

Vale ressaltar que a inoculação com os rizóbios, exceto o tratamento 1, apresentaram efeitos positivos na BSPA e CR em relação às plantas não inoculadas, sendo que os tratamentos 12B, 14 e 15 obtiveram as melhores médias em relação aos parâmetros biométricos avaliados, tendo um acréscimo superior a 50% na produção de biomassa seca das raízes em relação ao controle absoluto.

Na coleta de 70 DAI também realizamos a correlação de Pearson, para avaliar se há alguma relação entre o tamanho dos rebolos e os parâmetros biométricos avaliados. Como todas as correlações apresentaram valores tendendo a zero, concluímos que não há relação entre as variáveis (Tabela 4).

**Tabela 4:** Coeficiente de Correlação de Pearson (r) aos 70 dias após inoculação

	<b>DIA</b>	<b>ALT</b>	<b>NF</b>	<b>CR</b>	<b>BSR</b>	<b>BSPA</b>
<b>BSRE</b>	0,30	0,28	0,12	-0,009	0,06	0,28
<b>BSPA</b>	-	-	-	-	0,64	-

### 5.3.2 Análise morfoanatômica das raízes de cana-de-açúcar

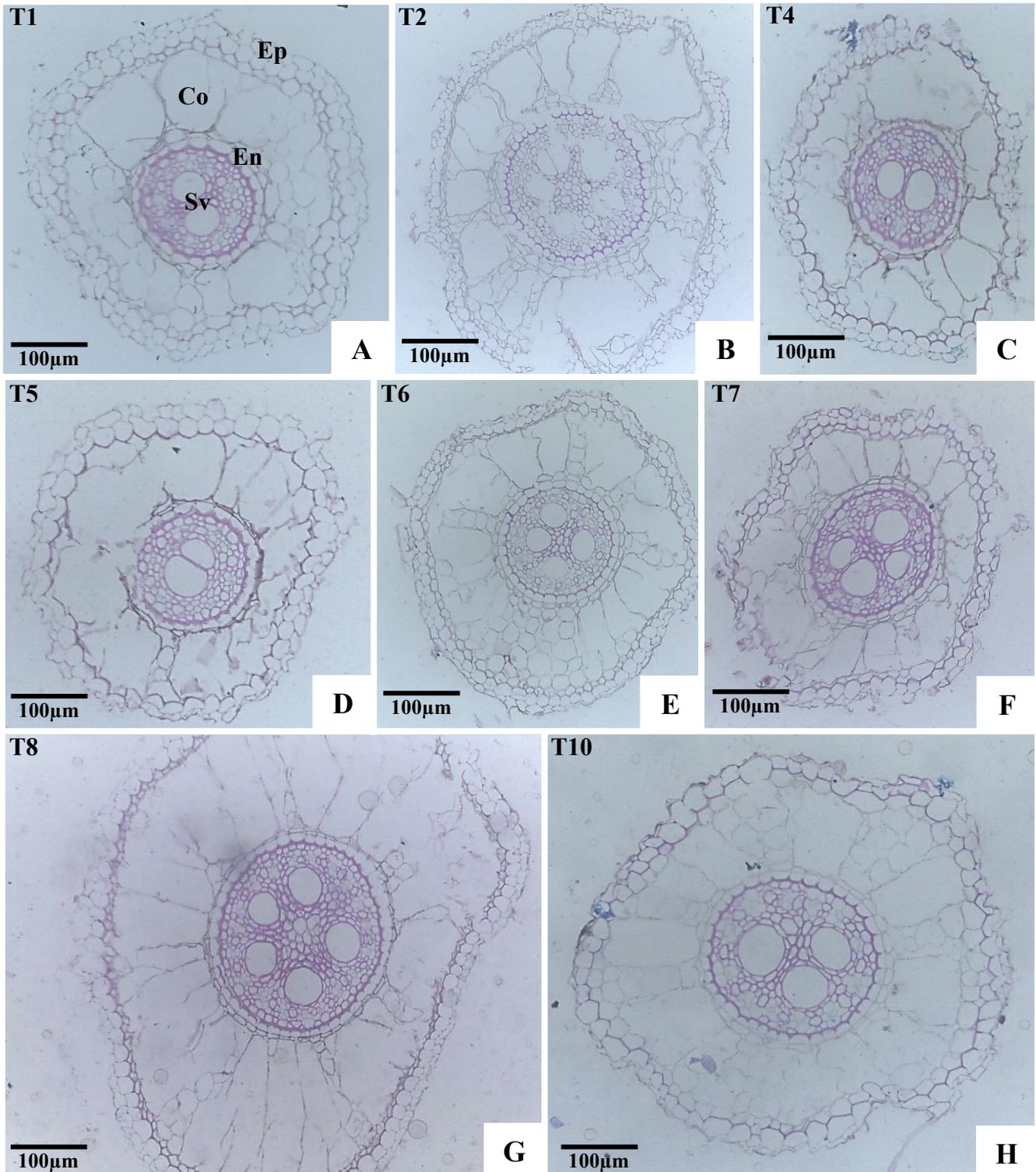
A anatomia radicular da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), em corte transversal, apresentou o sistema de revestimento constituído pela epiderme multisseriada (velame), apresentando pêlos absorventes seguidopela exoderme unisseriada constituída por células hexagonais com paredes espessadas (Figuras 8A-B), similar ao verificado em outras raízes de monocotiledôneas (FAHN, 1990; SOUZA et al., 2013). Variações estruturais nos diferentes tratamentos avaliados foram observadas, as quais podem ser resultantes da ação da associação de bactérias utilizadas no experimento podendo afetar a capacidade absorptiva e, conseqüentemente, o desenvolvimento dessas raízes.

Internamente ao revestimento radicular dos indivíduos de *Saccharum* spp. analisados, encontra-se a região cortical que é formada pelo sistema fundamental que está diferenciado em um aerênquima cuja formação é lisígena (Figura 8C). O aerênquima apresentou variações estruturais nos tratamentos aplicados nos diferentes exemplares avaliados. O aerênquima é uma das mais importantes adaptações anatômicas em plantas submetidas à deficiência temporária de oxigênio, nitrogênio e fósforo em ambientes aeróbicos (EVERT, 2006; DANTAS et al., 2001) podendo, no caso das raízes de *Saccharum* spp. aqui avaliadas, estar relacionadas à associação das bactérias utilizadas, que podem não ser eficientes na fixação do nitrogênio nessas raízes.

Similar ao observado em outras raízes de monocotiledôneas (SOUZA et al., 2013), as raízes dos exemplares de cana-de-açúcar avaliadas no presente trabalho, apresentam, na maior parte dos indivíduos, uma endoderme unisseriada com espessamentos em “U” (Figuras 8 D-E). A endoderme é uma importante camada seletiva e fundamental ao bom desempenho protetivo e hidráulico das raízes (EVERT, 2006). Em alguns dos tratamentos, foi verificado que a endoderme apresentou atividade meristemática capaz de gerar novas células para a região cortical (Figura 8C), podendo indicar uma resposta a associação das raízes com as bactérias utilizadas, uma vez que representa uma forma de promover o crescimento em diâmetro do órgão, que é um dos mecanismos de promoção de crescimento das bactérias utilizadas no experimento (GÍRIO et al., 2015; SANTOS et al., 2018).

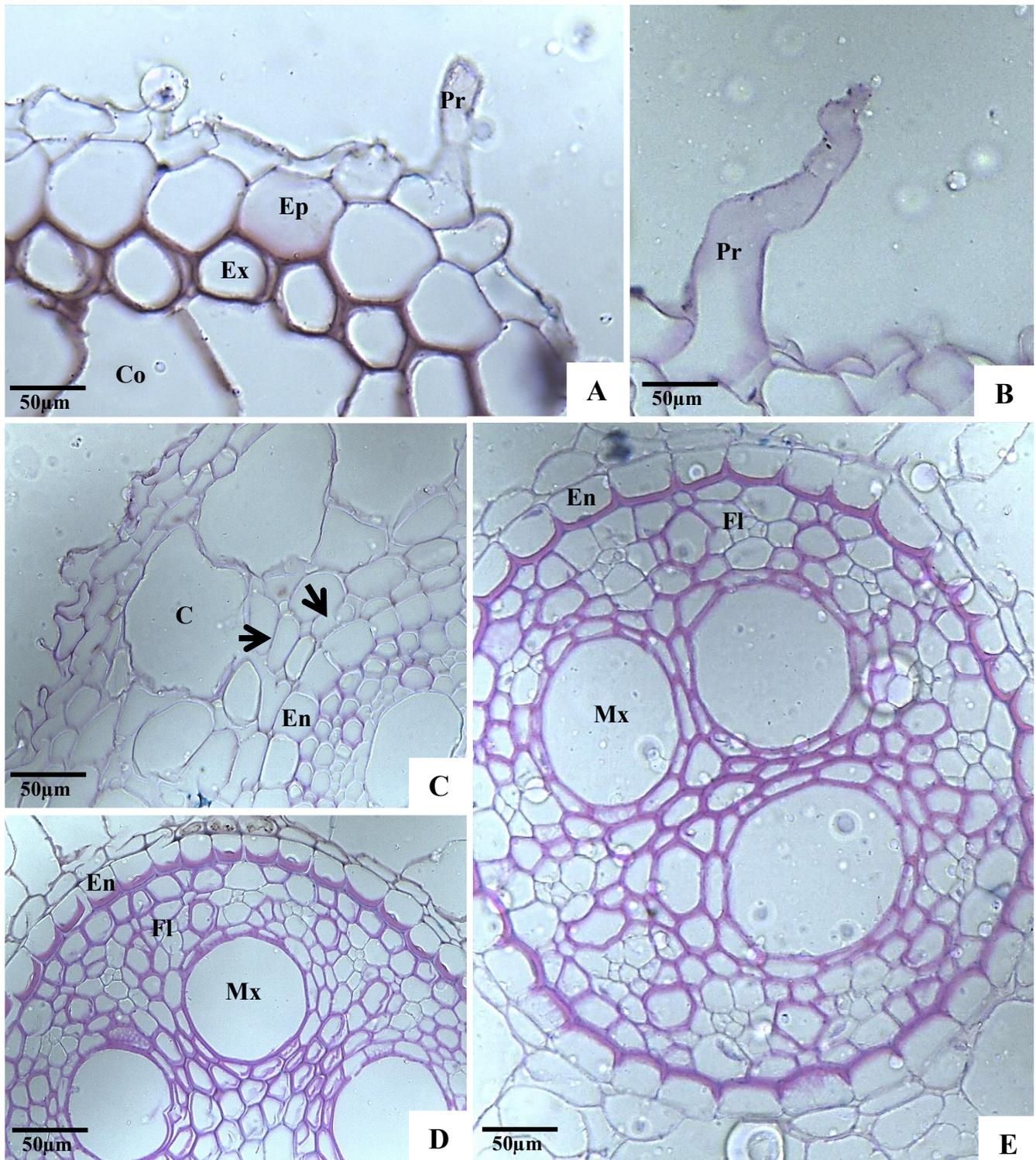
O sistema vascular, que ocupa a região central da raiz, é formado pelo xilema e floema em disposição alterna, como apresentado em outras raízes de monocotiledôneas (FAHN, 1990). Tanto o xilema como o floema apresentaram variações no número e diâmetro de elementos do metaxilema bem como no número de pólos floemáticos, respectivamente, dentre ostratamentos avaliados até o momento (Figuras 7A-H,8E). Esse efeito pode gerar importantes conseqüências a condutividade hidráulica da raiz (DICKISON, 2000) e necessita de maiores avaliações.

**Figura 7.** Cortes transversais das raízes dos indivíduos de *Saccharum* spp. submetidas a diferentes tratamentos com bactérias.



Co-Córtex, En-Endoderme, Ep-Epiderme, Sv-Sistema vascular

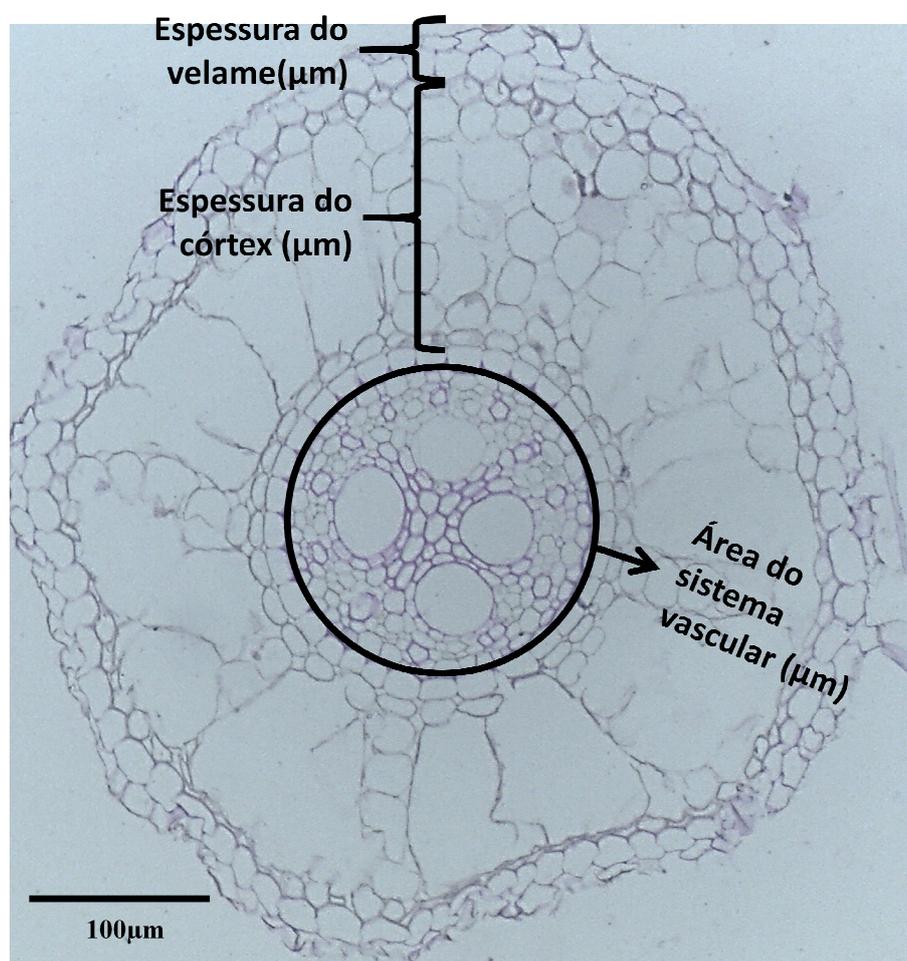
**Figura 8.** Cortes transversais detalhados das raízes dos indivíduos de *Saccharum* spp. submetidas a diferentes tratamentos com bactérias.



Co-Córtex, En-Endoderme, Ep-Epiderme, Fl-Floema, Mx-Metaxilema, Pr-Pêlo radicular, Setas-  
Endoderme meristemática

*Velame* é o sistema de revestimento da raiz, sendo o sistema mais plástico, apresentando respostas imediatas à ação de herbívoros e microrganismos. É neste tecido que se encontram os pelos radiculares (ou absorventes) que ampliam a capacidade absorptiva das raízes, além de atuar na proteção do órgão (Figura 9). Com a inoculação dos rizóbios podemos observar um aumento na espessura do velame (Tabela 5), tendo os tratamentos 13A, 15, 11 e 12A as maiores médias e diferindo estatisticamente dos demais, inclusive do controle absoluto que apresentou a pior média de 54,23  $\mu\text{m}$ .

**Figura 9:** Corte transversal da raiz



**Tabela 5.** Valores médios da espessura do velame, espessura do córtex e área do sistema vascular das raízes medidos em secções transversais.

<b>Tratamentos</b>	<b>Espessura do velame (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Espessura do córtex (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Espessura do sistema vascular (<math>\text{mm}^2</math>)</b>
1	62,90 f	327,83 i	253,03 m
2	64,43 f	339,67 h	247,13 n
3	64,03 f	274,57 k	221,07 p
4	63,80 f	276,10 k	223,67 p
5	63,87 f	276,77 k	286,30 l
6	84,07 c	394,73 f	306,40 j
7	64,13 f	295,87 j	295,43 k
8	94,27 b	422,90 de	377,60 i
9	93,47 b	425,57 d	396,03 g
10	92,90 b	423,27 de	395,47 g
11	103,13 a	527,67 b	500,83 c
12A	102,53 a	418,43 e	479,23 e
12B	58,97 g	347,73 g	486,90 d
13A	105,67 a	564,53 a	405,97 f
13B	75,80 d	425,73 d	385,83 h
14	95,43 b	426,13 d	388,10 h
15	105,33 a	522,17 c	507,17 b
16A	69,67 e	293,80 j	407,07 f
16B	77,53 d	425,90 d	485,40 d
17	57,76 g	527,90 b	523,53 a
0	54,23 h	223,67 m	104,60 q
N	64,27 f	236,40 l	233,87 o
CV	4,54	1,51	1,12

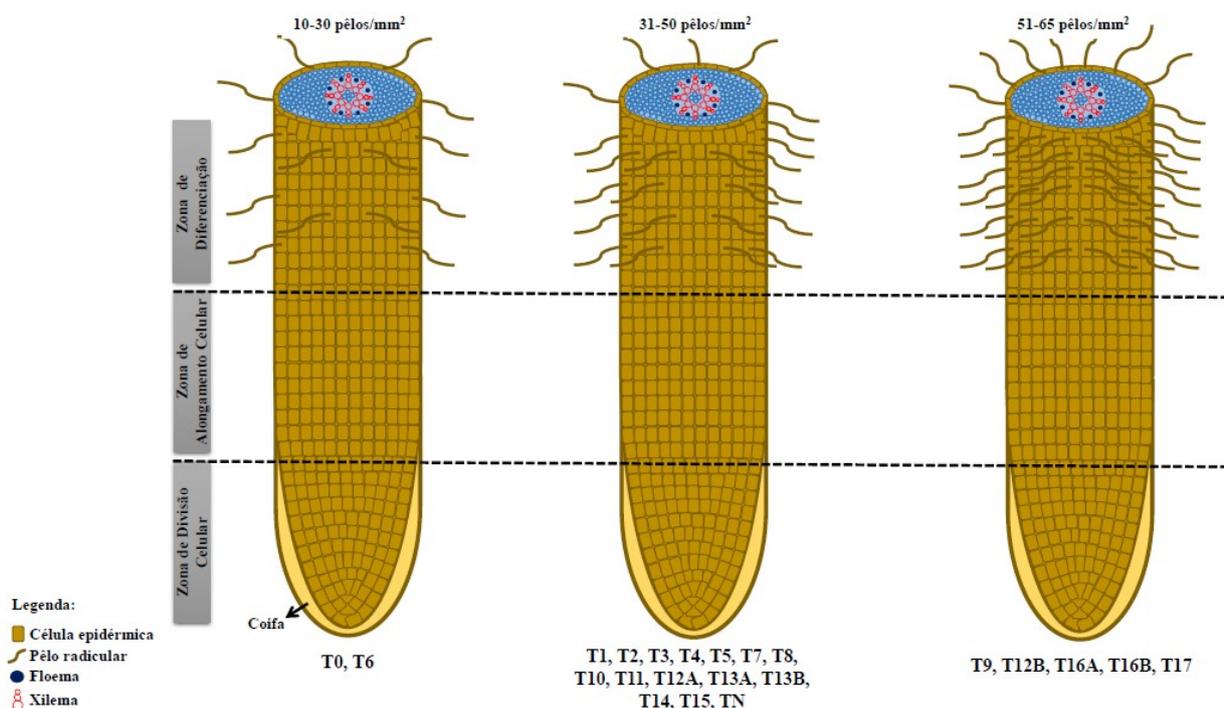
\*Letras minúsculas comparam médias na mesma coluna pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Não houve transformação dos dados.

O *córtex* é a região subepidérmica que é constituída pelo sistema fundamental ou de preenchimento, podendo ter funções de sustentação e armazenamento nos diferentes órgãos vegetais, não sendo diferente nas raízes estudadas. Logo, era esperado que esta região apresentasse aumento de volume com a inoculação devido ao benefício por parte das bactérias, que pode ser

observado na Tabela 5, em que o tratamento 13A foi o que apresentou a melhor média (564,53  $\mu\text{m}$ ), seguidos dos tratamentos 17, 11 e 15 (527,90, 527,66 e 522,66  $\mu\text{m}$ ), porém todos os tratamentos diferiram significativamente do controle absoluto (sem inoculação).

E por fim, o *sistema vascular* é o sistema condutor da planta sendo formado pelo xilema, tecido condutor de água e sais e o floema, tecido que conduz nutrientes em sua essência. Assim, na avaliação realizada, era esperado que apresentasse aumento de sua circunferência, sobretudo, no caso de bactérias que favoreçam aumento da fixação do Nitrogênio. Como é possível observar nos dados (Tabela 5), houve um aumento da circunferência do sistema vascular das plantas inoculadas em até 5x (tratamento 17, com 523,53  $\text{mm}^2$ ) em relação ao controle absoluto (104,60  $\text{mm}^2$ ). Quanto maior os números de vasos condutores, maior é a translocação de seivas para a parte aérea da planta e, conseqüentemente, maior a assimilação dos nutrientes e maior a produção de biomassa.

**Figura 10:** Variação da densidade de pêlos radiculares em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com rizóbios provenientes da raiz de cana-de-açúcar cultivada em consórcio com feijão-caupi

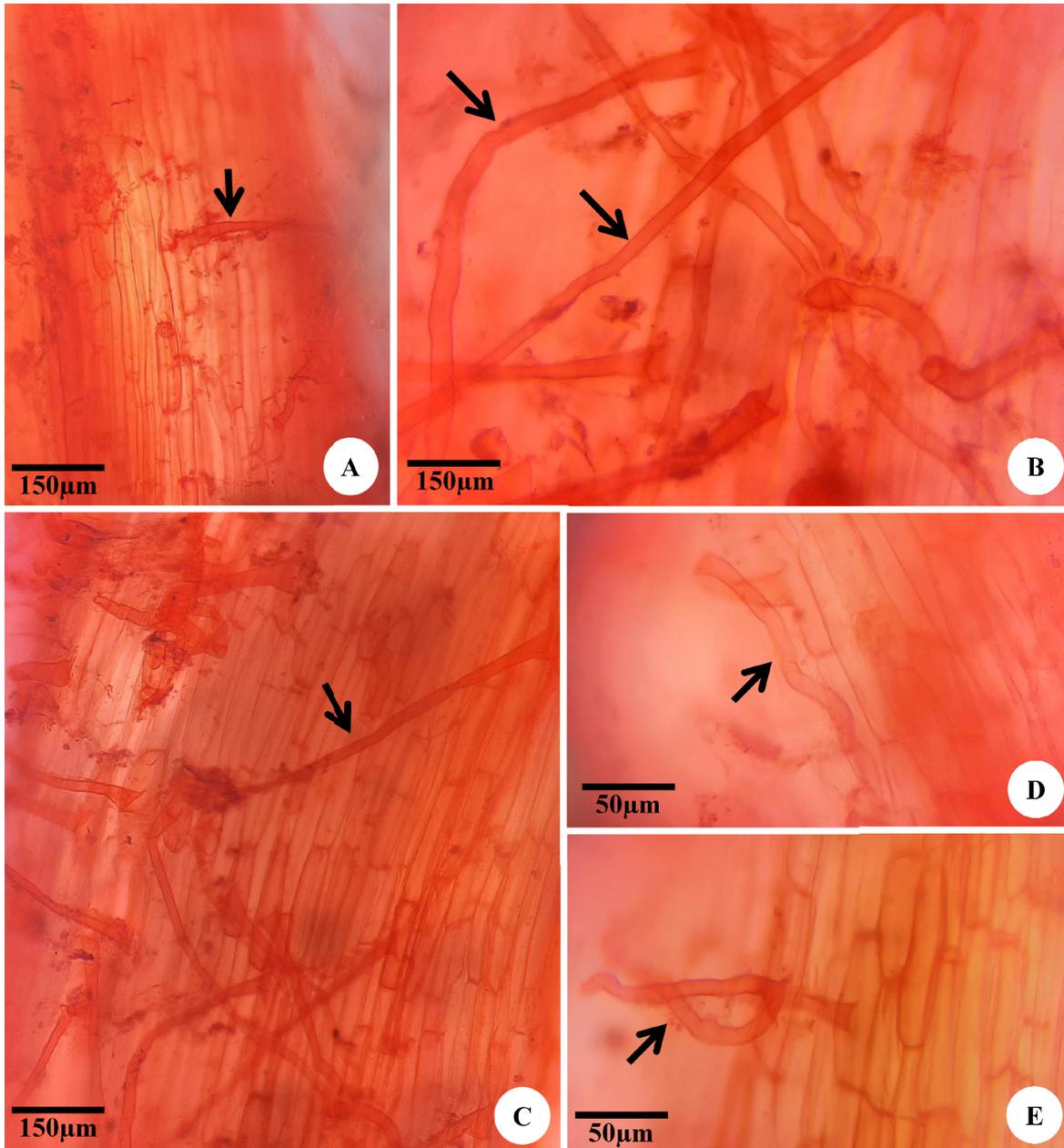


Foram analisados densidade e comprimento dos pêlos radiculares os quais mostraram aumento significativo de quantidade e tamanho, respectivamente.

Observando apenas as médias, foi possível classificar a densidade de pelos em três faixas crescentes de quantidade de pêlos por  $\text{mm}^2$  que foram: de 10-30 pêlos/ $\text{mm}^2$ , de 31-50 pêlos/ $\text{mm}^2$  e 51-65 pêlos/ $\text{mm}^2$  (Figuras 9-10). Na primeira faixa, que apresentou a menor quantidade de pêlos (10-30 pêlos/ $\text{mm}^2$ ) foram incluídos os tratamentos 0 e 6, enquanto que na segunda (31-50 pêlos/ $\text{mm}^2$ ) ficaram os tratamentos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 12A, 13A, 13B, 14, 15 e N. Já a última

faixa (51-65 pêlos/mm<sup>2</sup>), aquela que apresentou as maiores médias de densidade, foram 9, 12B, 16A, 16B e 17.

**Figura 11.** A-E. Cortes paradérmicos das raízes destacando a presença dos pêlos radiculares (setas). A. Tratamento T6. B. Tratamento T5. C. Tratamento T12B. D. Tratamento 5. E. Tratamento T0.



Outro parâmetro avaliado foi o comprimento dos pêlos radiculares cujos valores médios variaram de 304,5 µm a 680,97µm. Foi verificado que as plantas controle (T0), apresentaram pêlos menores ao passo que os pêlos radiculares apresentaram incremento em seu tamanho nos tratamentos com nitrogênio e inoculação de bactérias (Tabela 6).

**Tabela 6.** Medições de comprimento e densidade de pêlos radiculares de plantas de cana-de-açúcar inoculadas

Tratamentos	Densidade (pêlos/mm <sup>2</sup> )	Comprimento (µm)
1	36,20 d	319,50 p
2	35,00 de	322,60 p
3	35,10 de	313,30 q
4	45,47 c	428,47 l
5	33,07 f	330,23
6	24,20 f	454,53 k
7	45,87 c	654,37 b
8	45,9 c	394,13 n
9	54,27 b	399,83 m
10	34,37 de	680,97 a
11	44,97 c	480,20 ij
12A	45,37 c	583,53 d
12B	64,73 a	476,10 j
13A	35,03 de	627,17 c
13B	54,87 b	511,10 f
14	46,10 c	478,80 j
15	46,87 c	485,77 h
16A	55,50 b	535,17 e
16B	57,07 b	479,93 ij
17	47,23 c	499,70 g
0	14,47 g	304,50 r
N	34,20 de	484,47 hi
CV	7,26	1,05

\*Letras minúsculas comparam médias na mesma coluna pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Não houve transformação dos dados.

Resultados semelhantes foram encontrados por Rondina et al. (2020), que avaliando tratamentos sem inoculação, com inoculação e com coinoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasilense* em soja, perceberam que houve aumento do comprimento e densidade de da raiz, incidência e comprimento de pêlos radiculares e teor total de N na parte aérea, resultando no aumento da produtividade de grãos nos tratamentos com coinoculação ou inoculados com

*Bradyrhizobium* spp. e nos tratamentos onde não havia inoculação as médias foram sempre menores em relação aos parâmetros avaliados, mostrando assim que a inoculação induz uma densidade e comprimento de raiz e de pêlos radiculares maior e que por aumentar o volume de solo explorado pelas raízes da planta, incluindo microsítios, aumenta absorção de água e de nutrientes, incluindo os de baixa mobilidade no solo, elevando assim a produtividade (COMAS et al., 2012; HALING et al., 2013).

Além da inoculação com bactérias promotoras de crescimento contribuírem com o crescimento da planta pela FBN, algumas bactérias também produzem ou induzem a planta a produzir fitormônios de crescimento como auxinas e giberelinas (RONDINA et al., 2020). As auxinas estimulam a atividade da raizem meristemas e o alongamento e diferenciação de células radiculares, bem como o desenvolvimento de raízes laterais do periciclo (BARBIERI; GALLI, 1993; DUCA et al. 2014). Algumas BPCPs, quando colonizando a superfície radicular da planta, liberam óxido nítrico que atua como uma molécula sinalizadora na via de indução de ramificação da raiz mediada por auxina, estimulando indiretamente o desenvolvimento das raízes laterais (MOLINA-FAVERO et al. 2008; VACHERON et al. 2013).

Por outro lado, a adubação nitrogenada também contribui para o crescimento pela adição do elemento que está diretamente ligado à composição de aminoácidos e proteínas, constituinte de macromoléculas e enzima. Dessa forma, os resultados obtidos estão de acordo com o esperado na literatura e mostram que a inoculação com BPCPs podem contribuir com o crescimento da cana-de-açúcar, porém existe a necessidade de selecionar os rizóbios mais eficientes e levá-los para testes em campo, para avaliar sua capacidade competitiva e comprovar seu desenvolvimento em situação de campo.

## 5.4 Conclusões

Os parâmetros biométricos, no geral, apresentaram efeitos positivos nas plantas de cana-de-açúcar inoculadas em relação às não inoculadas, sendo os tratamentos 12B, 14 e 15, os que apresentaram as melhores médias, tendo um acréscimo superior a 50% na produção de biomassa seca das raízes em relação ao controle absoluto.

A inoculação em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar aumentou a densidade e comprimento de pêlos radiculares. A espessura do velame, córtex e sistema vascular também foram influenciados positivamente pela inoculação, chegando a um aumento de até 5x na espessura do sistema vascular.

## REFERÊNCIAS

ALVES, G. C.; VIDEIRA, S.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 387, p. 307-321, 2015.

ARAMAKI, E. *et al.* Extraction of adverse drug effects from clinical records. **Health Technology**, v.160, p.739-743, 2010.

ARNT, W.; NASCIMENTO, J.; CARDEAL, A.; SOUZA, P.; SHIROTA, L. Desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar em função da origem da gema e promotores na replicação. **Agrarian**, v. 11, p. 380-386., 2018. <https://doi.org/10.30612/agrarian.v11i42.4216>

BARBIERI, P.; GALLI, E. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. **Research in Microbiology**, v.144, p. 69–75, 1993. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(93\)90216-O](https://doi.org/10.1016/0923-2508(93)90216-O)

BARNES, A. C. **The sugar cane** London: Hill Ed., 1964. 456 p

BENEDUZI, A. *et al.* Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil, **Applied Soil Ecology**, v. 63, 94-104, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.08.010>.

BLANCO, E. L; CASTRO, Y. Antagonismo de rizobacterias sobre hongos fitopatogénos, y su actividad microbiana con potencial biofertilizante, bioestimulante y biocontrolador. **Revista Colombiana de Biotecnología**, Bogotá , v. 23, n. 1, p. 6-16, June 2021 . <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v23n1.84808>

CHAVES, V.A. *et al.* 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. <https://doi.org/10.1590/01000683rbc20151144>

COMAS, L.H.; MUELLER, K.E.; TAYLOR, L.L.; MIDFORD, P.E.; CALLAHAN, H.S.; BEERLING, D.J. Evolutionary patterns and biogeochemical significance of angiosperm root traits. **International Journal of Plant Sciences**, v.173, p.584–595, 2012. <https://doi.org/10.1086/665823>

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana>. Acesso em: 26 mai. 2022.

DANTAS, B.F.; ARAGÃO, C. A.; ALVES, J. D. Cálcio e o desenvolvimento de aerênquimas e atividade de celulase em plântulas de milho submetidas a hipoxia. **Scientia Agricola**, v.58, n.2, p.251-257, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162001000200006>

DICKISON, W. C. **Integrative Plant Anatomy**. Harcourt/Academic Press, San Diego, 2020.

DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C.L.; ROSE, D.; GLICK, B.R. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, p.85–125, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>

- ETESAMI, H.; EMAMI, S.; ALIKHANI, H. A. Potassium solubilizing bacteria (KSB): mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 897-911, 2017. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005>
- EVERT, F.R. **Esau's plant anatomy**. Meristems, cell and tissues of the body plant – Their structure, function and development. 3th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- FAHN, A. 1990. **Plant Anatomy**, 4th ed. Pergamon Press, Oxford.
- FRANKLIN, G. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood – resin composites and a new macerating method for wood. **Nature**, v. 155, p. 51, 1945.
- GÍRIO, L.A.S. *et al.* Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 1, p. 33-43, 2015. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000100004>
- GOMES, C. **IAC desenvolve sistema inédito que muda o conceito de plantar cana: dentre os benefícios estão redução do número de mudas e possibilidade de aumento dos ganhos do produtor**. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2018. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/noticiasdetalhes.php?id=836>. Acesso em: 5 abr. 2022.
- HALING, R.E. *et al.* Root hairs improve root penetration, root-soil contact, and phosphorus acquisition in soils of different strength. **Journal of Experimental Botanic**, v.64, p.3711–3721, 2013. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert200>
- JESUS, H. I. *et al.* Development and gas Exchange of pre-sprouted sugarcane seedlings in three different growing substrate media. **Journal of Experimental Agriculture International**, Hooghly, v. 32, n. 4, p. 1-7, 2019. <http://dx.doi.org/10.9734/jeai/2019/v32i430114>
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**, EDUR, Seropédica, 198 p. 1997.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mcgraw-Hill Book, 523, 1940.
- LANDELL, M.G. *et al.* Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. **Instituto Agrônomo de Campinas**, 17p. (IAC. Documentos, 109), 2012
- LIMA, D. A. L. ; LUNAS, A. L.; GARCIA, J. R.; GOMES, L. C.F.; GIONGO, P. R.; GONÇALES, C. Expansão do setor sucroenergético no sudoeste goiano: evolução e impactos sobre o uso do solo. **Espacios**. v. 35, n. 9, p. 15 2014
- MOLINA-FAVERO, C.; CREUS, C.M.; SIMONTACCHI, M., PUNTARULO, S., LAMATTINA, L. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v. 21, p. 1001–1009, 2008. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-7-1001>
- OLIVEIRA, H. P. *et al.* Performance of pre-sprouted sugarcane seedlings in response to the application of humic acid and plant growth-promoting bacteria. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 3, p. 1365-1370, 2018. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n3p1365>

OTTO, R.; TRIVELIN, P.C.O.; FRANCO, H.C.J.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C. Root system distribution of sugar cane as related to nitrogen fertilization evaluated by two methods: monolith and probes. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 33, p. 601-611, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832009000300013>

RONDINA, A.B.L; SANZOVO, A.W.S.; GUIMARÃES, G.S.; WENDLING, J.R.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology and Fertility of Soils**, v.56, p. 537-49, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01453-0>

SANTOS, S.G.; CHAVES, V.A.; RIBEIRO, F.S.; ALVES, G.C.; REIS, V.M. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 12-23, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.015>

SILVA, B. M.; SILVA, W. S. Um panorama da implantação do etanol de 3ª geração como uma fonte de energia sustentável. **ENGEVISTA**, v. 21, n. 1, p. 176-192, 2019.

SOUSA, B.T.; ZUCARELI, V., MARTINS, A.P. Quantificação de açúcares totais e auxina no desenvolvimento inicial de mini-toletes de cana-de-açúcar. **Colloquium Agrariae**, v.16, n.3, p.94-103, 2020. <http://dx.doi.org/10.5747/ca.2020.v16.n3.a375>

SOUZA, F. R.; BERGAMIN, A. C.; VENTUROSO, L. R.; VIEIRA, M. C.; PELLIN, D. M.; MONTANARI, R. Estrutura anatômica de raízes de cana-de-açúcar cultivada em solo compactado. **Agrarian**, v.6, n.22, p.423-428, 2013.

SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>.

VACHERON, J. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Front Plant Science**, v.4, p.356, 2013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00356>

VIDEIRA, S. S.; OLIVEIRA, D. M. ; MORAIS, R. F.; BORGES, W. F.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two xavie Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 356, p. 51-66, 2012.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cana-de-açúcar RB 92579 cultivada em solo com longo histórico de exploração canavieira abriga população de rizóbios endofíticos capazes de nodular feijão-caupi e que necessitam desta leguminosa para se multiplicarem no solo. Esses rizóbios não possuem alta diversidade fenotípica e genética. Alguns isolados produzem substâncias promotoras de crescimento como solubilização de fosfato de cálcio e AIA que beneficiam o crescimento radicular da cana-de-açúcar. Estudos posteriores com isolados pré-selecionados devem ser conduzidos no campo para avaliar sua contribuição no desenvolvimento da cana.

**RIZÓBIOS ASSOCIADOS À CANA-DE-AÇÚCAR (RB 92579)  
CONSORCIADA COM FEIJÃO-CAUPI EM SOLO COM LONGO  
HISTÓRICO DE EXPLORAÇÃO CANAVIEIRA**

---

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas  
ORIENTADORA

---

Sueide Karina da Silva  
RESPONSÁVEL