

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

Uso da Técnica de DGGE para Monitorar o
Estabelecimento de Bactérias Diazotróficas
Endofíticas Inoculadas em Duas Variedades de
Cana-de-Açúcar

Paulo Marcos Fernandes Boa Sorte

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**USO DA TÉCNICA DE DGGE PARA MONITORAR O
ESTABELECIMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ENDOFÍTICAS INOCULADAS EM DUAS VARIEDADES DE CANA-
DE-AÇÚCAR**

Paulo Marcos Fernandes Boa Sorte

Sob a Orientação da Professora
Veronica Massena Reis

e Co-orientação do Pesquisador
José Ivo Baldani

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em
Agronomia, Área de Concentração
em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Março de 2009

Anexo C – Exemplo de ficha catalográfica a ser elaborada pela Biblioteca Central

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO**

PAULO MARCOS FERNANDES BOA SORTE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 04/03/2009.

José Ivo Baldani PhD. Embrapa Agrobiologia
(Co-Orientador)

Eduardo Lima Dr. UFRRJ

Fábio Lopes Olivares Dr. UENF

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que sempre fizeram de seus obstáculos escadas para subirem ainda mais alto e que diante das dificuldades sentem vontade de “arregaçar” as mangas e partir para a luta com mais vontade de vencer. Dedico ao meu sobrinho Gabriel que nos trouxe tanta alegria e a toda minha família e amigos. Dedico por fim a todos que tem a ousadia de darem passos largos, (“maiores que as pernas”), porém conscientes, pois para se almejar vitórias tem que ter determinação.

A vocês dedico

AGRADECIMENTOS

Inicialmente o meu coração pede para agradecer ao “Cara lá de cima”, muito obrigado Meu Deus, sabemos que sem o senhor nem se quer o mundo existiria.

Agradeço a mulher que é a maior merecedora desta vitória, quem mais se não a minha querida e amada Mãe (dona Marilena). Muito obrigado Mainha por existir, me por no mundo e por sempre ter me apoiado incondicionalmente em minhas decisões, a senhora é a minha guerreira.

Agradeço a outra mulher da minha vida a quem amo tanto de uma forma tal que não se pode mensurar, muito obrigado Leona pelo apoio nos momentos mais difíceis que passou ao meu lado. Aliás, muito obrigado por estar ao meu lado, “Eu te amo e para sempre vou te amar”.

Agradeço ao homem que me ensinou a ser honesto e digno, meu Pai (Geraldo Boa sorte) muito obrigado pela educação oferecida.

Ao meu segundo Pai, a pessoa que me deu o primeiro empurrão que indiretamente fez com que eu chegasse até aqui, Tio João, muito obrigado por tudo.

Aos amigos de toda hora Cândido, Wardsson, Khalil, Carlos Bahiano, Samuel Ribeiro pela amizade e pela imensa contribuição que deram nas diversas etapas deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas formadores da família Bioquímica / Gramíneas: Luc, Helma, Carlos, Vivi, José Rodrigo, Mauro, Fernando, Péricles, Helder, Marcela, Patty Galvão, Pat Gitahy, Aline, Tatiana, Cleiton, Taís, Cris, Sandy, Joilson, Dani, Gabí, William, Lambari, Cecília, Laís e aos técnicos Lúcio e Renatinha, pelos momentos de alegria no dia a dia proporcionado pela convivência com todos vocês.

Ao amigo de todas as horas Geraldo Baêta que não mede esforços para ajudar a quem precise.

Aos amigos RURALINOS Nivaldo, Rafael Pavesi, Weber Samuel de Deus, Alessandro, Régia, Jaciane, Marilha, Ranusa, Rafael Lustrino (Mano), Murilo, Máster, Flávio, Enoque, Marcos, Gustavo, pela maravilhosa amizade de todos vocês o meu carinhoso muito obrigado.

Aos pesquisadores Stefan, Marcinha, Jean, Vera Baldani pelos ensinamentos passados. A pesquisadora Kátia pelos ensinamentos e amizade, muito obrigado.

Ao chefe Dr. José Ivo Baldani pela confiança depositada durante a realização deste trabalho e pelas sábias correções nas diferentes etapas desta intensa jornada, muito obrigado.

A pesquisadora Dra. Verônica Massena Reis pelo apoio e pela luz na hora de trabalhar os dados, muito obrigado.

Aos amigos de coleta José Carlos e Paulo Albuquerque da Embrapa tabuleiros costeiros que se deslocaram tantas vezes ainda de madrugada saindo de Maceió para Recife para ajudar nas coletas, ao amigo Ademar Barros da Embrapa solos, UEP Pernambuco também companheiro de coleta, muito obrigado pela nova amizade e pela imensa ajuda nos trabalhos de campo.

Aos amigos José Marcos Leite, Guilherme e Willian pela força no campo.

Às Usinas Maravilha e Olho D'Água por fornecerem área e suporte na condução dos experimentos.

Aos pesquisadores Robert Michael Boddey (Bob) e Segundo Urquiaga pela ajuda na interpretação dos dados de ^{15}N e a pesquisadora Janaína pela ajuda nas análises estatísticas juntamente com Wardsson e Khalil.

A minha grande amiga Luciene (Lú) pela ajuda na formatação da dissertação e pela amizade e alegria contagiante que está dentro de seu ser.

A professora Lúcia Helena pelas correções, ensinamentos e pela amizade, muito obrigado.

A Embrapa pelo suporte logístico. Ao CNPq pelos 18 meses de bolsa, a FAPERJ por custear as despesas de viagens, muito obrigado.

Ao CPGACS muito obrigado pela oportunidade oferecida. A UFRRJ, nossa mãe RURAL o meu muito obrigado de todo o coração por tudo que me propiciaste a aprender.

A todos que de alguma forma direta ou indireta contribuíram com a realização deste trabalho o meu mais sincero MUITO OBRIGADO.

RESUMO

BOA SORTE, Paulo Marcos Fernandes. **Uso da técnica de DGGE para monitorar o estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em duas variedades de cana-de-açúcar.** 57f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Diversos experimentos de inoculação conduzidos em vários países têm mostrado os benefícios da inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas na cultura da cana-de-açúcar, voltados para a redução de insumos químicos e o aumento de produção. O presente trabalho teve como objetivo monitorar o efeito de um inoculante padrão, composto de uma mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas (BR 11504, BR 11335, BR 11115, BR 11281 e BR 11366), em duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB72454) cultivadas no nordeste brasileiro. O monitoramento da população das bactérias inoculadas assim como da população nativa, pela técnica de Eletroforese Em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE), mostrou que houve um baixo estabelecimento das bactérias presentes no inoculante e que não foi possível a detecção de todas as bactérias inoculadas. Foram observadas variações na diversidade microbiana no decorrer do ciclo da cultura, sugerindo assim um controle da comunidade bacteriana endofítica pelas plantas. Uma redução da diversidade bacteriana entre os experimentos foi observada provavelmente devido ao estresse hídrico. As bactérias do gênero *Herbaspirillum* foram identificadas com maior frequência e o número de bandas correspondentes a bactérias desconhecidas foi superior ao das bandas correspondentes às bactérias utilizadas no inoculante. Além disso, os resultados mostraram que a inoculação com a mistura de bactérias proporcionou aumento de até 7% na produção de colmos das variedades de cana de açúcar RB72454 e RB867515, no experimento conduzido na cidade de Itambé – PE. Em contraste, não foi observado o efeito da inoculação no experimento conduzido na cidade de Goiana, PE, sugerindo que o efeito sobre a produtividade de colmos é dependente de fatores edafoclimáticos, dentre outros.

Palavras chaves: FBN. Diversidade. Inoculante.

ABSTRACT

BOA SORTE, Paulo Marcos Fernandes. **Use of DGGE technique to evaluate the establishment of endophytic diazotrophic bacteria inoculated in two sugarcane varieties.** 58p. Dissertation, (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

Many inoculation experiments conducted in several countries had shown the benefits of inoculation with endophytic diazotrophic bacteria in sugar cane crop, facing the reduction of chemical inputs and the production increase. The aim of this study was to observe the effect of a standard inoculant containing a mixture of diazotrophic entophytic bacteria (BR 11504, BR 11335, BR 11115, BR 11281, and BR 11366), in two sugarcane varieties (RB867515 and RB72454) cultivated in the Brazilian Northeast region. The monitoring of both the inoculated and the native bacterial population by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis technique (DGGE) showed a low establishment of the inoculant, and that it was not possible to detect all of the inoculated bacteria. Variations of the endophytic microbial diversity were observed during the crop cycle, suggesting that the plant controls its endophytic bacterial community. A reduction on the diversity between the experiments was observed, probably because of hydric stress. Bacteria of *Herbaspirillum* genus were identified with greatest frequency and the number of bands corresponding to unknown bacteria was higher than that of bands corresponding to the bacteria used in the inoculant. Furthermore, the results showed that inoculation with the mixture of bacteria increased up to 7% in the production of stalks of sugar cane varieties RB72454 and RB867515, for the experiment conducted in the city of Itambé – Pernambuco State. In contrast, the effect was not observed in the inoculation experiment conducted in the city of Goiana, Pernambuco State, suggesting that the effect on the stems productivity depends of edaphic and climatic factors, among others.

Key words: BNF. Diversity. Inoculant.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

DGGE – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel Com Gradiente Desnaturante)

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTPS – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

ha – Hectares

kb – quilo base (1000 pb)

pb – pares de base

N – Nitrogênio

PCR – polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PGPR – Plant Growth Promoting Rhizobactéria (rizobactérias promotoras do crescimento de plantas)

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa da divisa entre os estados do Pernambuco e da Paraíba www.google.com.br acessado em 12 de Abril de 2009 12
- Figura 2:** Precipitação acumulada mensal em mm no período de setembro de 2007 a Agosto de 2008 (www.itep.gov.br). Setas indicam as épocas de coleta para análise molecular. **A** – Experimento I (Usina maravilha), **B** - Experimento II (Usina Olho D’Água). 18
- Figura 3:** Esquema representativo do comportamento das amostras apresentando o grampo de GC em DGGE. Gel a direita mostrando a separação de diferentes microrganismos: A, B e C – diferentes microrganismos; M – Mistura das amostras A, B e C e P – Representa microrganismos presentes em amostras de planta. 19
- Figura 4:** **A** – Gel de Agarose contendo o produto de amplificação por PCR das estirpes bacterianas utilizadas como inoculante para cana-de-açúcar: 1Kb – Marcador de massa molecular, Gel corado com brometo de etídio. **B** – Gel de DGGE corado com Syber Gold e contendo as estirpes utilizadas no gel A. 1 – 5: estirpes bacterianas. 1 - BR11281 – *Gluconacetobacter diazotrophicus*, 2 - BR 11366 – *Burkholderia tropica*, 3 - BR 11115 - *Azospirillum amazonense*, 4 - BR 11335 – *Herbaspirillum seropedicae* e 5 - BR 11504- *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. 20
- Figura 5:** Esquema representativo do nó de plantas de cana de açúcar da variedade Ja 60-5 mostrando a descontinuidade dos feixes vasculares. DONG et al.,1997. 21
- Figura 6:** a)Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelCompar II, seguido do Gel de poliacrilamida em posição horizontal. 1º coleta (6 meses) análise de similaridade usando o Coeficiente de Jaccard $\{(Tol\ 1,3\% - 1,3\%) (H > 0\%, S > 0\%) [0\% - 100\%]\}$. 15 e 54 correspondem respectivamente às variedades utilizadas RB867515 e RB72454; N – tratamentos adubados com adubo nitrogenado; i – tratamentos inoculados; C – Controle; M – Marcadores contendo as cinco bactérias usadas no inoculante e como padrão Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*. b) Matriz binária de ausência e presença de bandas obtida a partir da análise em (a) evidenciando as bandas que se encontram na mesma altura das bandas correspondentes às bactérias inoculadas e as demais bactérias que integram a diversidade endofítica das plantas de cana-de-açúcar. b1 – b4, blocos de 1 a 4. 23
- Figura 7:** Análise do número de bandas referentes as bactérias contidas no inoculante da cana-de-açúcar. Variação por época de coleta para as duas variedades estudadas nos dois experimentos. Bactérias utilizadas no inoculante e utilizadas como padrão. Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*..... 29
- Figura 8:** Análise do número total de bandas para as variedades de cada experimento. BI – Bandas Identificadas referentes as bactérias no inoculante; NI – Não Identificadas, corresponde as demais bandas que encontradas. 6, 9 e 12 meses – Época de coleta. . 30
- Figura 9:** Análise do número total de bandas por tratamento para as variedades de cada experimento. BI – Bandas Identificadas referentes as bactérias contidas no inoculante; NI – Não Identificadas, correspondente as demais bandas encontradas. 31
- Figura 10:** Frequência da ocorrência de cada estirpe bacteriana dentro de cada variedade em cada época de coleta. Separação por experimento. Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*. Variedades: RB867515 e RB72454..... 32

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Características Agronômicas das variedades de cana-de-açúcar utilizadas.	13
Tabela 2: Estirpes bacterianas utilizadas como inoculante e suas respectivas origens de isolamento. Coleção de cultura da Embrapa Agrobiologia.	13
Tabela 3: Iniciadores utilizados nas reações de amplificação para “nested” - PCR e respectivas seqüências de nucleotídeos.	15
Tabela 4: Iniciadores utilizados nas reações de amplificação para análise por DGGE e respectivas seqüências de nucleotídeos.	16
Tabela 5: Porcentagem das bases nucleotídicas GC da região amplificada pelos iniciadores utilizados nas espécies utilizadas no inoculante.	20
Tabela 6: Distribuição de bandas correspondentes as bactérias contidas no inoculante e bandas não identificadas (NI) por época de coleta nos dois experimentos. Hr – <i>H. rubrisubalbicans</i> , Hs – <i>H. seropedica</i> , Aa – <i>A. amazonense</i> , Gd – <i>G. diazotrophicus</i> e Bt – <i>B. tropica</i>	24
Tabela 7: Produtividade de colmos em Megagrama por ha e teor de N na folha (%) de plantas de cana-de-açúcar. RB867515 e RB72454 - Variedades de cana utilizadas. Nitrogenado (120 kg N ha ⁻¹). Análise realizada separadamente por experimento.	36
Tabela 8: Análise conjunta dos experimentos.	36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	A Cultura da Cana-de-Açúcar	3
2.2	Fixação Biológica de Nitrogênio – FBN.....	4
2.2.1	Fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas	4
2.3	Inoculação com Bactérias Diazotróficas Endofíticas.....	6
2.4	Ecologia de Bactérias Diazotróficas Endofíticas	7
2.5	Técnicas Utilizadas para Monitorar o Estabelecimento de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Plantas da Família Poaceae	8
2.6	Diversidade Microbiana	9
2.7	Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE.....	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1	Localização da Área, Tratamentos e Delineamento Experimental	12
3.2	Inoculação de Toletes de Cana-de-Açúcar.....	13
3.3	Comunidade de Bactérias Diazotróficas em Cana-de-Açúcar Analisada Através da Técnica de DGGE.....	14
3.3.1	Definição dos padrões para os géis de DGGE.....	14
3.3.2	Amostragem de tecidos vegetais	14
3.3.3	Extração de DNA bacteriano.....	14
3.3.4	Amplificação da região 16S rDNA do DNA extraído das plantas de cana pela reação em cadeia da Polimerase (PCR)	15
3.3.5	Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação – DGGE	16
3.4	Efeito da Inoculação das Bactérias Diazotróficas Endofíticas sobre as Características Agronômicas utilizadas	17
3.4.1	Análise de produtividade de colmos.....	17
3.4.2	Análise do teor de nitrogênio.....	17
3.5	Dados Meteorológicos das Cidades onde se Localizaram os Experimentos	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1	Definição dos Padrões para os Géis de DGGE	19
4.2	Estudo da Comunidade de Bactérias Diazotróficas em Cana-de-Açúcar Analisada Através da Técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE).....	21
4.3	Efeito da Inoculação das Bactérias Diazotróficas Endofíticas Sobre as Características Agronômicas Utilizadas.	34
5	CONCLUSÕES.....	39
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
7	ANEXOS.....	49
7.1	Anexo A	49
7.2	Anexo B.....	50
7.3	Anexo C.....	51
7.4	Anexo D	52
7.5	Anexo E.....	54
7.6	Anexo F	55

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das principais culturas semi-perenes cultivada no Brasil, com uma área plantada aproximada a nove (09) milhões de ha em 2009, dos quais pouco mais de sete (07) milhões são para a produção de álcool e açúcar. O país ocupa a posição de maior produtor mundial, possuindo plantações de cana em quase todo o território em virtude das condições edafoclimáticas brasileiras serem favoráveis ao desenvolvimento da mesma. Basicamente, a produção é dividida por região: região Norte/Nordeste, com os principais estados produtores (Alagoas, Pernambuco e Paraíba) e Centro-Sul, que inclui os Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Goiás e Mato Grosso do Sul. A segunda região é responsável por 80% da produção nacional sendo o estado de São Paulo o maior produtor nacional (CONAB 2009).

A área plantada com esta cultura tem aumentado a cada ano, isso se deve a maior procura pelo etanol como combustível, a consciência ambiental que tem despertado ultimamente em razão do efeito estufa e a busca por fontes renováveis de energia. A busca por combustíveis renováveis tem incentivado as empresas automobilísticas na fabricação dos carros Flex, que juntamente com o incremento de álcool à gasolina proporcionaram uma maior procura pelo etanol e com isso tem incentivado os plantios de cana.

Conseqüentemente o aumento da área plantada proporciona um aumento do uso da adubação nitrogenada. Prática que pode causar problemas ambientais além do alto custo econômico. Apesar da cana-de-açúcar ser uma das culturas que se utiliza menos adubo nitrogenado, devido ao melhoramento ter sido para solos pobres em fertilidade e a busca por produtividades medianas. O custo com tal operação é bastante oneroso porque é um adubo altamente dependente de derivados do petróleo necessário para se alcançar altas pressão e temperatura durante o processo de fabricação. Além disso, estima-se que em torno de 80% deste adubo químico é adquirido via importação (SIACESP, 2008), tornando o Brasil dependente de outros países para adquirir estes insumos.

Por outro lado, a Fixação Biológica de Nitrogênio – FBN faz uso de bactérias diazotróficas endofíticas e portanto pode ser uma alternativa viável ao uso de adubos nitrogenados aplicados nesta cultura e desta forma promover uma diminuição destes problemas levantados. Dentre os principais gêneros de bactérias diazotróficas associadas em cana encontram-se o *Herbaspirillum spp*, *Azospirillum spp*, *Gluconacetobacter spp* e *Burkholderia spp*. Estas bactérias, além de serem capazes de fixar o nitrogênio do ar, são responsáveis pela produção de substâncias promotoras de crescimento como os fitormônios, sideróforos, etc.

Diversos experimentos de inoculação com estas bactérias em cana-de-açúcar já foram conduzidos e mostraram resultados bastante variados. Entretanto, o monitoramento das bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas utilizando a técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE ainda não foi realizado. Estudos sobre o impacto da inoculação destas bactérias na diversidade endofítica total presente nos tecidos vegetais também não foram realizados. Além disso, ainda é desconhecido se as bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas permanecem em números detectáveis nos canaviais até a época da colheita, se existe relação entre a presença destas bactérias com o aumento ou decréscimo de produtividade e se a região de cultivo da cana influencia na população bacteriana inoculada e nativa, assim como na produtividade.

O presente trabalho teve por objetivos:

a) Avaliar de maneira indireta o estabelecimento do inoculante padrão de cana-de-açúcar em plantas crescidas em condições de campo pela técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE;

b) Monitorar por DGGE a comunidade de bactérias diazotróficas endofíticas em duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB72454) cultivadas nas localidades de Goiana e Itambé – Pernambuco; e

c) Verificar o efeito do produto “Inoculante microbiano” padrão sobre a produtividade de colmos e acúmulo de N em duas variedades de cana-de-açúcar cultivadas no estado do Pernambuco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Cultura da Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar tem sua origem na Nova-Guiné, pertence a família *Poaceae* e apresenta cinco espécies: *Saccharum officinarum*, *Saccharum spontaneum*, *Saccharum sinensis*, *Saccharum barberi* e *Saccharum robustum*. (MOZAMBANI et al., 2006).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é a espécie mais utilizada comercialmente, pois engloba as canas nobres com alto teor de açúcar e baixa porcentagem de fibra. São consideradas canas tropicais, por apresentarem colmos grossos com pelo menos 3,5 cm de diâmetro e sistema radicular reduzido e superficial (MOZAMBANI et al., 2006). Segundo esses autores quase metade da produção mundial é assegurada atualmente por quatro países das Américas: Brasil, Cuba, México e EUA. Esta cultura é de grande importância econômica para o agronegócio brasileiro e vem sendo explorada desde a época do Brasil colônia (MOZAMBANI et al., 2006).

Dentre os marcos históricos desta cultura pode se citar como principal o Programa Nacional de utilização do álcool como combustível – PROÁLCOOL, da década de 70. Este programa não teve sucesso absoluto, ocasionou uma estagnação na produção e o fechamento de várias usinas, em virtude da estabilização e queda dos preços do petróleo.

O programa foi uma estratégia do governo militar para diminuir a dependência de combustíveis fósseis, que estavam com preços elevados na época, e assim ter uma fonte renovável de energia menos poluidora do ambiente pela minimização da emissão de gases tóxicos causados pela queima do combustível nos automóveis. No início, o objetivo era incrementar 22% de álcool à gasolina brasileira, além de um forte incentivo às montadoras para a fabricação de carros movidos a etanol. Para isso, foi necessário um grande investimento do governo federal em inovação tecnológica no setor produtivo. Por isso os usineiros passaram a produzir apenas álcool já que era mais rentável, e o Brasil chegou até mesmo a exportar o produto para alguns países como Estados Unidos e Japão. Porém, quando o preço do petróleo começou a cair, os investimentos governamentais passaram a ser inviáveis do ponto de vista econômico, pois o governo chegou a ponto de pagar mais caro no preço do álcool na usina do que o que era vendido na bomba de combustível. Com isso, os usineiros se endividaram onde alguns faliram enquanto outros passaram a produzir açúcar. Mas, a indústria automobilística continuava a fabricar carros a álcool e o Brasil foi obrigado a importar este combustível que outrora era abundante (LEITE e LEAL, 2007).

Nos dias atuais, a busca por combustíveis de fontes renováveis e não derivados do petróleo, fez com que o cultivo de cana-de-açúcar aumentasse de forma considerável nos últimos anos. As circunstâncias atuais não são as mesmas do programa da década de 70, onde o objetivo principal era substituir a importação de derivados de petróleo. O mundo está mais consciente em relação a redução de impactos ambientais, e entre muitas alternativas de amenização deste problema tem se a utilização dos biocombustíveis e da implementação de álcool a gasolina que já vem sendo adotadas por vários países além do Brasil.

Essa preocupação com o meio ambiente é crescente no mundo inteiro e outro programa do país com grande relevância é a adoção do biodiesel, que consiste no incremento de óleo vegetal ao diesel comum diminuindo assim a emissão de CO₂ pelos carros (BODDEY et al., 2008).

Uma avaliação de impactos ambientais do programa Bio-Etanol mostrou com bastante ênfase o balanço energético e a emissão de gases do efeito estufa (CO₂, N₂O, CH₄), estimando que o uso de etanol como combustível na frota brasileira devido a capacidade dos carros FLEX

incorreria em uma economia de 73% na emissão de gases do efeito estufa em comparação com a gasolina brasileira (BODDEY et al., 2008). Estes autores enfatizam a importância do manejo desta cultura na época da colheita não devendo se utilizar a queima que é uma das principais fontes emissoras de CO₂ na atmosfera.

O Brasil ocupa uma posição privilegiada, sendo atualmente o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com uma área plantada próximo a nove milhões de hectares (CONAB, 2008), e uma estimativa da produção nacional (safra 2007/2008) destinada à indústria sucroalcooleira de 559 milhões de toneladas, das quais 43,1% (240.895 toneladas) para a fabricação de açúcar e 56,9% (317.823 toneladas) para a produção de álcool. Quando comparada à safra 2006/07, verifica-se um crescimento na produção correspondendo a 11,4%, ou seja, a nova colheita contribuiu com um volume adicional de cana da ordem de 57,18 milhões de toneladas. A produção total de açúcar está estimada em 32,8 milhões de toneladas com um acréscimo de 4,81% em relação à safra passada, já o álcool os números indicam um volume de produção da ordem de 27,1 bilhões de litros, com um expressivo aumento na produção nacional de 17,7%. A produtividade tem aumentado a cada ano e já alcançou 80 Mg ha⁻¹ para a safra 2008/2009 (CONAB 2008). Diante de tanto avanço há a necessidade de se buscar alternativas que amenizem os impactos ocasionados pelas plantações de cana e dentre elas estão a substituição ou diminuição de adubos químicos. Estes produtos quando utilizados de forma inadequada podem vir a contaminar o meio ambiente degradando recursos não renováveis como o solo e a água (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

2.2 Fixação Biológica de Nitrogênio – FBN

O nitrogênio é o elemento mais abundante no ar atmosférico e ocupa quase 80% da atmosfera. Sua importância é indiscutível, sendo, portanto, essencial na constituição dos ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, expansão da parte aérea e sistema radicular das plantas e ganho de matéria seca. Na sua forma de N₂ que representa 99,96%, o mesmo é indisponível aos eucariontes, logo não pode ser aproveitado pelas plantas. Apenas 0,04% encontra-se disponível na forma orgânica ou inorgânica (ROSWALL, 1979).

Existem três formas para tornar este elemento disponível para as plantas: descargas elétricas, fabricação de fertilizante mineral e fixação biológica de nitrogênio atmosférico. As descargas elétricas apresentam baixa eficiência. A fabricação industrial é um processo dependente de derivados do petróleo e demanda altas temperaturas em conjunto com altas pressões (MOREIRA E SIQUEIRA, 2006), além de apresentar baixa eficiência no processo de aplicação do fertilizante, pois é muito móvel no solo na forma de nitrato podendo ocasionar contaminação do lençol freático. A fixação biológica de nitrogênio atmosférico é o processo mais eficiente do ponto de vista econômico e ecológico.

2.2.1 Fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas

Há muito tempo estudadas, as rizobactérias, bactérias que habitam a superfície das raízes dos vegetais (rizosfera) tem a capacidade de realizar a FBN. A rizosfera é uma região rica em compostos de carbono, devido ao exsudato radicular, e por isso é rica em bactérias. Algumas destas bactérias têm a capacidade de fixar nitrogênio e de produzir substâncias que estimulem o crescimento das plantas, e por isso são denominadas rizobactérias promotoras do crescimento em plantas – PGPR (KLOEPER & SCHOLTH, 1978, citados por FREITAS, 2007).

A grande diversidade de bactérias presentes no ambiente rizosférico proporciona uma maior competição com as bactérias do inoculante. Logo, alguns autores aventam que um inoculante de bactérias que habitem o interior das plantas seja mais eficiente porque o ambiente

endofítico é mais protegido que o da rizosfera (GYANESHWAR et al., 2001; BALDANI e BALDANI, 2005). O habitat endofítico possui características mais favoráveis ao processo de fixação biológica de nitrogênio que a rizosfera, como baixas pressões de O₂, alta disponibilidade energética e baixa competitividade por nutrientes (BALDANI et al., 1997). Estes aspectos sugerem que a expressão da enzima nitrogenase sofre menor influência de fatores ambientais ao longo do ciclo da cultura da planta hospedeira.

As bactérias diazotróficas endofíticas habitam o interior das plantas vivendo uma relação não patogênica e assim, são capazes de fixar o nitrogênio do ar e disponibilizá-lo para a planta. Essa interação possui uma eficiência muito menor quando comparada com as do gênero *Rhizobium* (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Esta diferença se dá porque não ocorre a formação dos nódulos como habitat natural das bactérias, além da inexistência da leghemoglobina no controle das concentrações de O₂ no interior dos tecidos. Deste modo, para que não ocorra a inativação da nitrogenase estas bactérias buscam formas de diminuir as pressões de O₂ com alta taxa respiratória ou habitam regiões com baixas pressões de O₂ como os vasos do xilema (JAMES et al., 1997).

Quando comparadas com as rizobactérias promotoras do crescimento vegetal, as bactérias endofíticas possuem ambiente mais favorável, devido às menores pressões de O₂ que o ambiente rizosférico, a maior disponibilidade energética e a menor diversidade nativa, resultando em menor competição para os endofíticos (BALDANI et al., 1997). Apesar de fixar menos nitrogênio do ar que as do gênero *Rhizobium*, as bactérias endofíticas também podem trazer grande economia para o país considerando a redução no uso de adubos nitrogenados em culturas como a cana-de-açúcar, arroz, milho e trigo.

Embora a cana-de-açúcar demande grande quantidade de nitrogênio, no Brasil esta cultura nunca recebeu grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados (60 kg N ha⁻¹ ano⁻¹), devido ao seu custo elevado e à baixa resposta da planta à sua aplicação em nossos solos (AZEREDO et al., 1986). Estes aspectos sugerem a existência da interação de alguns microrganismos diazotróficos endofíticos com as plantas como um sistema natural de reposição de N, exportado anualmente dos solos pela colheita (CANUTO et al., 2003). Isto ocorre, em parte, devido ao melhoramento das variedades brasileiras ter sido direcionado para a obtenção de produtividades medianas em solos de baixa fertilidade selecionando de forma indireta variedades mais responsivas a FBN (BALDANI et al., 2002). Este direcionamento pode ter levado indiretamente à seleção de clones mais adaptados a obtenção dos benefícios oriundos da associação com microrganismos.

As bactérias de vida livre associadas à rizosfera, bem como bactérias endofíticas são também denominadas como bactérias promotoras do crescimento vegetal e desta forma modificam o crescimento das plantas através de mecanismos diretos e indiretos de promoção do crescimento vegetal que ocorrerem nos sistemas naturais. Os mecanismos de ação direta incluem, por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio (FBN), síntese de sideróforos, produção de fitormônios, solubilização de fósforo e aceleração dos processos de mineralização. Como mecanismos indiretos incluem uma série de modificações na morfologia das raízes: aumento em número, comprimento, área e aumento na absorção mineral (ROESCH et al., 2005). Dentre todos estes mecanismos, a FBN visa propiciar uma redução no uso de adubos nitrogenados e com isso obter benefícios econômicos e ambientais.

Pesquisas realizadas na Embrapa Agrobiologia, utilizando a técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, estimaram que mais de 60% do nitrogênio acumulado em algumas variedades brasileiras de cana-de-açúcar (NA5679 e SP701143) foram provenientes da FBN (URQUIAGA et al., 1992). Isto pode ser explicado devido a presença de espécies diazotróficas endofíticas presentes em populações elevadas nos tecidos de cana-de-açúcar, influenciando os altos níveis de contribuição da FBN observados pelos autores. É bem difundido que bactérias fixadoras de

nitrogênio colonizam diversas famílias vegetais, em diferentes graus de associação (DÖBEREINER, 1992).

O desenvolvimento do meio de cultivo semi-sólido por DÖBEREINER et al., (1995) possibilitou a descoberta de uma grande e nova diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas colonizando plantas de cana-de-açúcar em populações elevadas. Espécies não patogênicas como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, algumas espécies de *Azospirillum* e *Burkholderia* colonizam tecidos internos de plantas de cana-de-açúcar em populações elevadas (BALDANI e BALDANI, 2005).

2.3 Inoculação com Bactérias Diazotróficas Endofíticas

Bactérias fixadoras de nitrogênio tem grande potencial como biofertilizante nitrogenado, principalmente as encontradas em associação com gramíneas, como as endofíticas, dos gêneros *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum*. Recentemente, em experimentos de vasos com solo, foram inoculadas as estirpes BR 11335 – *Herbaspirillum seropedicae*, BR 11504- *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, BR 11115 - *Azospirillum amazonense*, BR11281 – *Gluconacetobacter diazotrophicus* e BR 11366 – *Burkholderia tropica*, individualizadas e em diferentes combinações na variedade micropropagada de cana-de-açúcar SP701143. Após 400 dias, foi observado um melhor desenvolvimento das plantas com a inoculação conjunta de todas as espécies, e a FBN neste caso, contribuiu com 30% do nitrogênio da planta (OLIVEIRA et al., 2002). Esta mesma mistura de bactérias foi inoculada nas variedades SP70-1143 e SP81-3250 crescidas em condições de campo e avaliadas 16 meses após a inoculação, sendo observado que a FBN variou de -4,5 a 31,4%, e foi maior em solo de baixa fertilidade (OLIVEIRA et al., 2006). Os autores observaram pequenos aumentos no peso dos colmos na variedade SP70-1143 nos solos com baixa e média fertilidade enquanto que na variedade SP81-3250 houve um decréscimo de produtividade nos 3 tipos de solos testados. Os autores concluíram que a contribuição da FBN em cana-de-açúcar variou com o tipo de solo, variedade plantada e mistura de bactérias aplicada e mostrou que a contribuição da FBN foi maior no solo de baixa fertilidade (Planossolo).

A estimativa de economia pelo uso destes organismos como biofertilizantes na cana-de-açúcar cultivada no Brasil, com a substituição de 50% da dose recomendada de N-fertilizante (60 kg N ha⁻¹), representaria uma economia de 150.000 toneladas de N por ano (REIS et al., 2008), que corresponderia a 735 milhões de reais.

Experimentos de inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas foram conduzidos em vários países. Na Índia e no México experimentos com *G. diazotrophicus* reportaram aumentos na nutrição nitrogenada, incrementos na produtividade de colmos e na sobrevivência de plantas de cana-de-açúcar inoculadas, além de acréscimos no comprimento das raízes e do volume radicular (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999; SUMAN et al., 2005; MUÑOZ-ROJAS & CABALLERO-MELLADO, 2003).

Apesar de estudadas desde a década de 50 com os primeiros trabalhos realizados pela Dra. Johana Dobereiner ainda não se tinha um inoculante para plantas da família *poaceae* no Brasil. Porém no ano de 2008 a Embrapa Agrobiologia lançou o inoculante para cana-de-açúcar contendo a mistura de bactérias diazotróficas endofíticas testadas por OLIVEIRA et al., 2002, 2006 e utilizadas nesta dissertação.

Diversos países do mundo já utilizam estas bactérias promotoras do crescimento vegetal sejam elas endofíticas ou rizosféricas como inoculante em diversas culturas. No México, foi desenvolvido um inoculante a base de *Azospirillum* denominado “Fertilizante para Milho”, e tem sido usado com sucesso visto a sua aplicação em 5.000 ha no ano de 1993 (Paredes-Cardona et al., 1988 e Caballero-Mellado et al., 1992). Na Argentina foi lançado um produto

denominado Graminante™ a base de pó de carbonato de cálcio contendo uma mistura de estirpes de *Azospirillum* que pode aumentar a produção de grãos em cerca de 20% (Okon et al., 1994).

2.4 Ecologia de Bactérias Diazotróficas Endofíticas

O processo de infecção e colonização de plantas por bactérias caracteriza-se como um evento dinâmico envolvendo o reconhecimento dos sinais moleculares, seguido do movimento da bactéria em direção a planta hospedeira, sua adesão a superfície vegetal e posterior penetração e multiplicação no interior da planta (REIS et al., 2006). As vias de penetração e infecção dos tecidos internos dos vegetais são muitas como descrito por REIS 2006: Estômatos ou estomas, hidatódios, nectário ou glândula nectarífera, lenticelas, tricomas quebrados, emergência de raízes laterais e feridas.

Porém a realização de trabalhos mostrando a localização exata destes microrganismos nos tecidos vegetais é limitada. Na literatura apenas um trabalho foi encontrado mostrando a localização de *Gluconacetobacter diazotrophicus* no interior de células vegetais de *Arabidopsis* realizado por COCKING, 2006.

O questionamento é baseado nas condições requeridas pelas bactérias para seu desenvolvimento: o interior do citossol apresenta pH 7,2 não propício ao desenvolvimento de endofíticos como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum spp* ou *Azospirillum spp* que necessitam de condições mais ácidas para desenvolvimento e reprodução. O vacúolo apresenta essa condição de pH ideal para o crescimento microbiano mas para as bactérias terem acesso deveriam passar por duas membranas, a membrana plasmática e o tonoplasto (envolve o vacúolo).

Parte dos estudos mais antigos relacionados com a localização das bactérias endofíticas localizadas no interior da planta foram realizados por DONG et al., 1994. Os autores identificaram com uso de microscopia eletrônica nos espaços intercelulares de cana-de-açúcar bactérias do gênero ainda denominado na época de *Acetobacter*, atualmente *Gluconacetobacter*.

Sattelmacher fazendo uma revisão em 2001 afirma que os espaços intercelulares são colonizados por bactérias endofíticas. Relatando inclusive a diversidade de nutrientes existente nestes espaços intercelulares propiciando o desenvolvimento de microrganismos endofíticos.

As condições encontradas no apoplasto das células vegetais sugerem ser este o ambiente favorável ao desenvolvimento das bactérias endofíticas. Este ambiente apresenta pH favorável próximo a 5,5 além de ser repleto de nutrientes contendo inclusive fonte de carbono como a sacarose. Em se tratando de plantas como a cana-de-açúcar esses valores de sacarose ficam entre 10 e 20%, condição esta muito propícia para o desenvolvimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (DONG et al., 1994).

Os mesmos autores um ano mais tarde conseguiram um total de oito isolados do espaço intercelular de tecidos de cana-de-açúcar. Todos semelhantes a estirpe PAL 5 de *G. diazotrophicus* em mais de 30 testes bioquímicos. Em ambos os trabalhos os autores constataram a fixação biológica de nitrogênio pela técnica de redução de acetileno.

JAMES et al., 1997 observaram a presença de bactérias diazotróficas endofíticas nos vasos do xilema de plantas de cana-de-açúcar evidenciando ser também um ambiente favorável à sobrevivência destas bactérias.

Baseado em ferramentas da biologia molecular Ramos et al., 2002 construiu um plasmídeo contendo o gene repórter GFP que emite uma inflorescência de cor verde e inseriu o mesmo em *Azospirillum brasilense* e acompanhou a colonização da mesma no apoplasto dos tecidos de trigo. Neste experimento a inoculação foi realizada na semente e as análises de

microscopia foram realizadas nas raízes. Experimento semelhante foi realizado por NJOLOMA et al., 2006 utilizando *Herbaspirillum* em cana-de-açúcar. O autor utilizou plantas micropropagadas de cana-de-açúcar de duas variedades, testando duas doses de inoculação e observou que para ambos os tratamentos a bactéria ocupava os espaços internos (apoplasto) de raiz e colmo da planta 28 dias após a inoculação. O autor mostra ainda a colonização de alguns vasos do xilema pela espécie transgênica de *Herbaspirillum* (B501gfp1).

Contudo ainda não se sabe se as bactérias realmente utilizam os vasos do xilema como habitat ou simplesmente utilizam como forma de transporte para alcançarem a parte aérea das plantas.

Diversos estudos têm mostrado que estas bactérias apresentam um comportamento dinâmico e que pode ocorrer a dispersão de algumas delas como *Gluconacetobacter diazotrophicus* através de toletes, palhico da cultura como demonstrado por REIS, (1991) e através de fungos micorrízicos arbusculares (PAULA et al.,1993). As cochonilhas também podem ser transmissoras da bactéria já que foram detectadas na bainha foliar de plantas de cana-de-açúcar e possuem esta bactéria dentro da linfa, podendo provocar contaminação no momento da sucção da seiva do floema (ASBOLT & INKERMANN, 1990). Outros microrganismos como *Herbaspirillum seropedicae* são considerados endofíticos obrigatórios, não sobrevivendo no solo (OLIVARES et al., 1996), mas também apresentam dispersão no ambiente (REIS JR, 2002).

2.5 Técnicas Utilizadas para Monitorar o Estabelecimento de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Plantas da Família *Poaceae*

A inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas em culturas da família poaceae vem aumentando no campo científico com o propósito de se desenvolver tecnologias de inoculação visando incremento de produção vegetal e redução de adubos nitrogenados nas diversas culturas. No entanto, ao se realizar um procedimento de inoculação nem sempre ocorre o estabelecimento da bactéria inoculada uma vez que ocorre uma competição entre a bactéria a ser inserida na planta com a comunidade microbiana já existente nos tecidos vegetais.

Portanto, existem algumas técnicas utilizadas para se avaliar este estabelecimento como: NMP – Número Mais Provável preconiza a utilização de meios de cultura semi-seletivos com diferentes fontes de carbono e diferentes condições de crescimento. Os seguintes autores (OLIVEIRA et al., 2002; 2006; 2008; REIS, 1991, REIS Jr., et al 2000) utilizaram em cana-de-açúcar e muitos outros em diversas plantas da família *poaceae*. BALDANI et al., (1986) utilizaram este método em conjunto com uma marcação natural de resistência a antibióticos em *Azospirillum spp.* a fim de monitorar o estabelecimento destas bactérias inoculadas nas culturas de trigo e sorgo. Estes autores observaram uma melhor colonização de *Azospirillum spp.* em raízes esterilizadas de sorgo em comparação com as de trigo.

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent assay. É um método imunológico que através da produção de anticorpos policlonais permite a detecção de antígeno em meio líquido como é o caso dos extratos vegetais. Sendo assim, é possível detectar e até mesmo quantificar bactérias diazotróficas endofíticas. Foi utilizado por (SILVA, 1999; PERIN et al 2004) em cana-de-açúcar e por SILVA e REIS, (2005) em isolados de várias culturas da família *poaceae*. SILVA, (1999) obteve melhor desempenho deste método em comparação ao método tradicional NMP.

FISH – Hibridização *In situ*, Nesta técnica se faz uso de sondas de nucleotídeos para espécie específica e se observa em microscópio de epifluorescência. (OLIVEIRA et al., 2008) utilizaram em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar.

Recentemente foi realizado um trabalho com propósito de estudar a colonização das bactérias dizotróficas endofíticas utilizadas no inoculante da cana-de-açúcar individualizadas e em diferentes níveis de mistura (OLIVEIRA et al., 2008). Estes autores observaram por NMP um alto número de células por grama de raiz fresca da estirpe PAL5 de *G. dizotrophicus*, ($1,4 \times 10^7$) quando inoculada individualizada 5 dias após a inoculação, porém quando inoculada em mistura com *Herbaspirillum sp*, *A. amazonense* e *B. tropica* nas diversas combinações a sua população foi diminuída em 10 vezes. Enquanto as bactérias do gênero *Herbaspirillum* mantiveram suas altas populações o que indicia uma competição. Fazendo uso de sondas para Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) estes autores observaram ainda uma maior agressividade de colonização das espécies de *Herbaspirillum* em virtude de uma maior intensidade de sinal, sendo que os dois ocupavam sítios diferentes parecendo haver um efeito antagônico entre as espécies. Desta forma *H. seropedicae* mostrou se mais expressivo que *H. rubrisubalbicans*. Sendo assim deve ocorrer uma competição na colonização também entre a diversidade nativa das plantas de cana-de-açúcar em experimentos de inoculação em campo que não necessariamente pode resultar em efeito negativo na produção.

DGGE – Eletroforese em Gel Com Gradiente desnaturante. (FERREIRA, 2008) utilizou esta técnica para avaliar a comunidade bacteriana em duas variedades de Arroz e observou uma ampla ocorrência de bandas correspondentes a *Herbaspirillum seropedicae*, mesmo nos tratamentos que não foram inoculados com esta bactéria. Isto indica que esta bactéria tem grande capacidade de colonizar a planta hospedeira. Este estudo também mostrou uma grande ocorrência de bandas diferentes daquelas dos padrões utilizados, o que sugere a colonização das plantas de arroz por diferentes espécies de bactérias. Esta técnica foi adotada nesta dissertação por permitir verificar também a presença de outras bactérias não inoculadas e o efeito da inoculação na diversidade microbiana nativa das plantas de cana-de-açúcar.

2.6 Diversidade Microbiana

A diversidade biológica é definida como a variabilidade entre organismos vivos, geralmente é atribuída à diversidade de espécies. No entanto, ela pode ser medida em vários níveis taxonômicos (Família, gênero, intra espécie etc.), ou ainda, em termos de determinadas características genéticas ou fenotípicas (morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, simbióticas) (MOREIRA e SIQUEIRA 2006).

Há muitos anos a diversidade genética e metabólica dos microrganismos tem sido explorada para utilização nos diversos segmentos da indústria (MELO, 2002). Na agroindústria, microrganismos são utilizados para diversos fins: aumento de fertilidade do solo (mineralização e solubilização de nutrientes); controle biológico de insetos e patógenos (*Bacillus thuringiensis*); promoção de crescimento em plantas; produção de antiparasiticidas, antibióticos, antimicrobianos, antivirais, vitaminas e hormônios, vacinas e probióticos, compostagem e tratamento biológico de resíduos; aumento da disponibilidade dos nutrientes (fungos micorrízicos); fixação biológica de nitrogênio (bactérias diazotróficas endofíticas ou associativas) (COLWELL, 1997; HUNTER-CEVERA, 1998). Porém é necessário conhecer o comportamento destes microrganismos e em alguns casos entender como funciona a diversidade microbiana.

O estudo da diversidade microbiana é de grande importância, pois pode indicar perturbações no ambiente, podendo inclusive ser utilizado como indicador de qualidade do solo (SMIT et al., 2001; JOHNSON et al., 2003).

Os estudos sobre diversidade e população de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas da família *Poaceae* tem se expandido nos últimos anos com vários trabalhos publicados, como por exemplo: os trabalhos com diferentes variedades de arroz, RODRIGUES et al., (2006); (BRASIL, (2005); FERREIRA, (2008). Na cultura da cana-de-açúcar isto tem ocorrido com

maior intensidade pois esta cultura tem adquirido altas contribuições via FBN (URQUIAGA et al., 1992). Trabalhos como o de REIS, (1991); REIS Jr., (1998); SILVA, (1999); PERIN et al., 2004 e PERIN et al., 2006 tem contribuído para entender desde aspectos ecológicos, estudos populacionais, até a diversidade destas bactérias em plantas de cana-de-açúcar.

Atualmente as ferramentas de biologia molecular tem sido utilizadas para dar suporte às técnicas básicas de microbiologia, visando aprofundar o conhecimento taxonômico sobre os microrganismos. A diversidade microbiana estrutural atualmente é estudada com base na sequência de DNA do gene 16S ribossomal para o estudo bacteriano e do 18S ribossomal para o fúngico, podendo ser amplificados por reações em cadeia da polimerase, do inglês “Polimerase Chain Reaction” - PCR. Estes produtos de amplificação podem ser caracterizados por clonagem e seqüenciamento ou analisados por técnicas moleculares tais como: ARDRA, T-RFLP, RAPD, RISA, DGGE/TGGE e SSCP para obtenção de um perfil da comunidade microbiana (RANJARD et al., 2000; KOZDRÓJ e VAN ELZAS, 2001) citados por ZILLI, (2004).

2.7 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE

No campo da biotecnologia, várias são as ferramentas para estudo de diversidade microbiana. Uma das mais utilizadas são os géis desnaturantes, que são de dois tipos: TGGE – Eletroforese em Gel com Gradiente Térmico onde um gel de poliacrilamida é submetido a um gradiente de temperatura para promover a desnaturação da molécula de DNA e apresenta concentrações constantes de uréia e formamida; o gradiente também pode ser químico, e neste caso a técnica é denominada Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE (LESSA E APPLEBAUM, 1993).

Nesta técnica, diferente dos géis de agarose comumente utilizados nos laboratórios de Biologia Molecular para separar fragmentos por tamanho, os géis desnaturantes separam pelo conteúdo das bases nitrogenadas GC na amostra de DNA. Assim, a técnica permite separar organismos de espécies diferentes, mas de mesmo gênero, de acordo com a migração diferenciada e posterior separação das bandas no gel de poliacrilamida (MUYZER et al., 1993).

Os géis de DGGE apresentam um gradiente químico de uréia e formamida que permite esta separação, na qual amostras com maior conteúdo de GC tendem a permanecerem na região inferior do gel pois são mais difíceis de serem desnaturadas (NAKATSU, 2007). Inicialmente esta técnica foi desenvolvida para ser usada na área da medicina para identificação de mutações, logo é uma técnica bastante refinada, pois trabalha de acordo com a seqüência de bases nitrogenadas da amostra de DNA a ser utilizada (MUYZER et al., 1993).

Desde a sua aplicação inicial por MUYZER et al., (1993), o DGGE tem sido utilizado extensivamente para estudar a estrutura de comunidades microbianas (bactéria e Archaea) em diversos tipos ambientais, como por exemplo: águas costeiras próximas a Antártida (MURRAY et al., 1998), fontes hidrotermais (SIEVERT et al., 1999), biofilme revestindo moluscos bivalves (GILLAN et al., 1998) e comunidade bacteriana em diferentes tipos de solos (GELSOMINO et al., 1999). Estes últimos autores utilizaram a combinação de PCR_DGGE para estudar a estrutura da comunidade bacteriana de 16 tipos de solos em localidades diferentes. Os perfis obtidos apresentaram algumas diferenças, mas os autores encontraram evidências para a hipótese de que tipos de solos similares possuem a tendência de conter comunidades similares de tipos bacterianos dominantes, como revelados pelos padrões originados por DGGE.

KUKLINSKY-SOBRAI et al. (2005) utilizaram a técnica de DGGE e cultivo em meio de cultura para estudar a variação na diversidade de bactérias endofíticas em plantas de soja cultivadas com e sem a aplicação de glifosato. Os autores verificaram diferenças nos gêneros isolados pelas duas técnicas e sugeriram que isto pode ter ocorrido em função das fontes de

nutrientes utilizados no meio de cultura terem favorecido grupos específicos, enquanto que a técnica de DGGE utilizou o DNA bacteriano total extraído diretamente do tecido das plantas de forma que não beneficiou grupos de microrganismos.

A técnica de DGGE também permite analisar a diversidade de grupos funcionais, ou seja, organismos que estão envolvidos em determinados processos, como a fixação biológica de nitrogênio. Para tanto é necessário o uso de iniciadores baseados em genes responsáveis pelo processo de FBN. Por exemplo, o trabalho de COELHO et al., (2007) utilizou esta técnica para estudar a diversidade do gene *nifH* na rizosfera de plantas de duas cultivares de sorgo (BRS 308 e BRS 310) crescidas sob diferentes doses de adubação nitrogenada (12 e 120 Kg N ha) cultivadas em solo de cerrado. Os resultados de agrupamento mostraram que o nível de adubação nitrogenada influenciou a comunidade de diazotróficos da cultivar BRS 308 mas não a da cultivar BRS 310. Os autores concluíram que existe uma influência dos níveis de adubação nitrogenada e das cultivares na comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio na rizosfera desta cultura.

Os organismos numericamente importantes são representados pelos clones dominantes nas bibliotecas ou pelas bandas fortes como nos Géis com Gradiente Desnaturante – DGGE (POLZ E CAVANAUGH, 1998). Logo, a técnica de DGGE é uma ferramenta amplamente utilizada para estudo de diversidade microbiana. Via de regra, assume-se que o número de bandas existentes em um gel de DGGE representa a riqueza de espécies da amostra analisada e a intensidade da banda representa grosseiramente a abundância daquela espécie.

Recentemente NAKATSU, (2007) descreve a técnica de DGGE como uma ferramenta potencial para o estudo de comunidade microbiana em solos, e ao fazer comparações com outras técnicas de biologia molecular, referiram-se a esta como sendo muito utilizada pela rapidez no processamento de um grande número de amostras. Porém, como toda técnica tem suas limitações, o DGGE também as apresenta, como por exemplo, a co-migração de bandas, a amplificação preferencial de genes e várias cópias do operon 16S em algumas bactérias (NAKATSU, 2007). Além de limitações referentes ao próprio processo de amostragem, que deve ser o mais representativa possível, o método de extração de DNA também pode vir a ser limitante, haja visto que pode ser mais eficiente na lise de um grupo microbiano específico (NAKATSU, 2007). Além disso, a própria especificidade dos iniciadores na reação de PCR atrelada a formação de artefatos podem contribuir para a representação de forma errônea da diversidade microbiana (NAKATSU, 2007).

Segundo EDENBORN et al., (2007), o uso de DGGE de amostras de DNA de microrganismos previamente crescidos em meio de cultura (dependente de cultura), complementa os resultados da análise de DGGE diretamente de amostra ambientais, ou seja, sem utilização de meios de cultura (independente de cultura), com a extração do DNA diretamente das amostras ambientais. Isso porque existem alguns microrganismos que podem estar em uma população muito baixa e necessitam de um ambiente favorável para serem identificados. Por outro lado, alguns microrganismos não são culturáveis, na qual obrigatoriamente o DNA precisa ser extraído diretamente da amostra ambiental.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização da Área, Tratamentos e Delineamento Experimental

Os experimentos foram conduzidos na Usina Maravilha – Experimento I, localizada na cidade de Goiana – PE e usina Olho D’água – Experimento II, localizado na cidade Itambé – PE. Os experimentos foram conduzidos em um Argissolo, em delineamento experimental em blocos ao acaso e com quatro repetições. As cidades apresentam diferentes condições climáticas sendo que a primeira além de apresentar um clima mais ameno por estar mais próxima do mar possui um sistema de irrigação por pivô central. A segunda cidade por sua vez está situada na divisa com o Estado da Paraíba apresentando um clima bem mais seco (Figura 1).

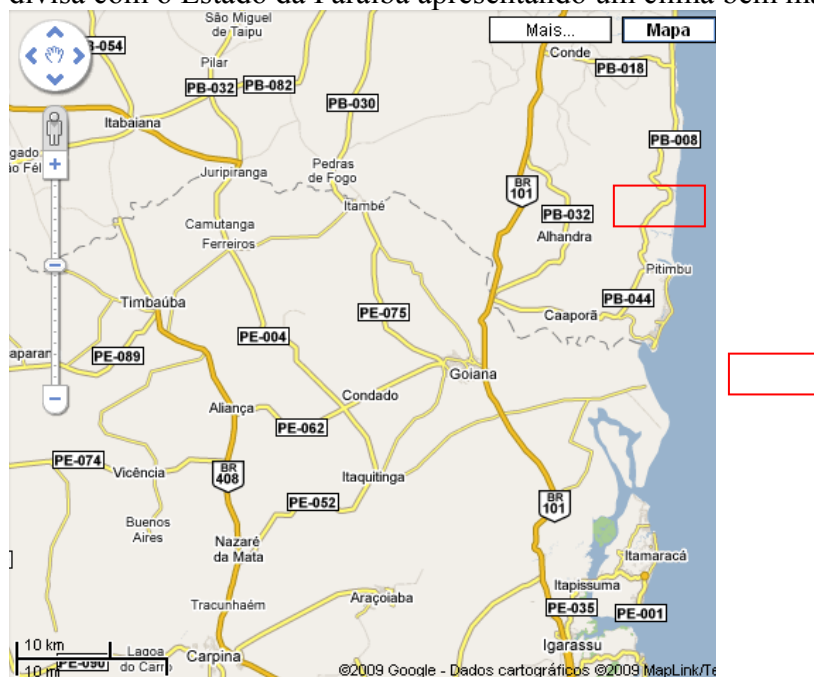


Figura 1: Mapa da divisa entre os Estados do Pernambuco e da Paraíba (www.google.com.br acessado em 12 de Abril de 2009).

As parcelas apresentavam 07 linhas de plantio, espaçadas 1,1 m e com 10 m de comprimento. Foi realizada a correção do solo para a cana planta segundo a interpretação de análise de solo para todos os experimentos na qual se utilizou 160 kg ha^{-1} de K_2O na forma de Cloreto de potássio e $100 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$ na forma de superfosfato simples para o experimento I e $160 \text{ kg de K}_2\text{O}$ e $180 \text{ kg de P}_2\text{O}_5$ por ha para o experimento II utilizando as mesmas fontes do experimento anterior. Como fonte de micronutriente se utilizou 30 kg de FTE BR12 com 0,4 kg de molibdato de sódio por ha.

Foram utilizadas duas variedades de cana, RB867515 e RB72454 cujas características estão listadas na Tabela 1. As variedades foram inoculadas com o inoculante turfoso padrão para cana-de-açúcar ou adubadas com $120 \text{ kg de N ha}^{-1}$, além de um tratamento controle absoluto para cada variedade. A exceção foi o experimento II (Usina Olho D’Água), que não apresentou o tratamento correspondente à variedade RB867515 adubado com nitrogênio.

Nas parcelas nitrogenadas foram aplicados $60 \text{ kg de N ha}^{-1}$ na forma de uréia no plantio e $60 \text{ kg de N ha}^{-1}$ aos 60 dias após o plantio com o objetivo de diminuir as perdas de N e elevar os níveis deste nutriente de forma que não fosse limitante no processo de produção.

Tabela 1: Características agrônômicas das variedades de cana-de-açúcar utilizadas.

Características da cultivar	RB72454	RB867515
Brotação	Boa	Boa
Perfilhamento	Bom	Médio
Porte	Ereto	Alto
Produção agrícola	Alta	Alta
Brotação das socas	Muito boa	Boa
Florescimento	Ocasional	Eventual
Maturação	Média	-
Teor de açúcares	Alto	Alto
Carvão	Intermediário	Resistente
Ferrugem	Resistente	Resistente
Solo	Sem restrições	Baixa restrição

*Fonte: Características da variedade RB72454, adaptadas da Dissertação de Mestrado de Prado Jr, 2008; e variedade RB867515 da equipe do programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar PMGCA/UFV (Universidade Federal de Viçosa).

3.2 Inoculação de Toletes de Cana-de-Açúcar

A inoculação foi realizada com um inoculante denominado padrão, constituído da mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas (Tabela 2), após a realização do tratamento térmico (52°C por 30 minutos). A inoculação foi realizada no tolete de plantio (três gemas) através da imersão dos mesmos em um reservatório contendo o inoculante diluído (01 envelope contendo 250 g a uma concentração de 10⁹ células por mL para cada bactéria totalizando cinco envelopes para 100 L de água) pelo período de 1/2 hora.

Tabela 2: Estirpes bacterianas utilizadas como inoculante e suas respectivas origens de isolamento. Coleção de cultura da Embrapa Agrobiologia.

Espécie bacteriana	Estirpe	Origem de isolamento
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	BR 11504	Colmos <i>Saccharum</i> sp. (SP701284)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BR 11335	Raízes <i>Saccharum</i> sp. (SP701143)
<i>Azospirillum amazonense</i>	BR 11115	Raízes <i>Saccharum</i> sp. (SP775181)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	BR11281	Raízes <i>Saccharum</i> sp. (Híbrido)
<i>Burkholderia tropica</i>	BR 11366	Perfilhos <i>Saccharum</i> sp. (SP 711406)

OLIVEIRA et al., 2006.

3.3 Comunidade de Bactérias Diazotróficas em Cana-de-Açúcar Analisada Através da Técnica de DGGE

3.3.1 Definição dos padrões para os géis de DGGE

As estirpes presentes no inoculante padrão para cana de açúcar foram usadas como referência para a comparação do perfil de bandejamento das bactérias inoculadas e as presentes nos tecidos das plantas coletadas no campo e analisadas através dos géis de DGGE. Para tanto, cada uma das bactérias listadas na

Tabela 2 foram crescidos em 5 mL de meio DYG'S por 16 horas a 30°C. Em seguida foi realizado centrifugação (5000 rpm por 5 minutos) de 2 mL da cultura. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado formado foi submetido a extração de DNA com o reagente PlantDNAzol® (Invitrogen), conforme a recomendação do fabricante. O DNA obtido foi amplificado utilizando os primers da Tabela 4 conforme descrito por BOA SORTE et al., (2006).

3.3.2 Amostragem de tecidos vegetais

As análises moleculares foram realizadas aos seis, nove e doze meses após a implantação dos canaviais. Foram coletados o nós da base dos colmos das plantas e realizado uma desinfestação superficial com álcool 70% para eliminação da comunidade epífita possivelmente presente.

3.3.3 Extração de DNA bacteriano

A extração de DNA total bacteriano das amostras foi feita utilizando-se o reagente PlantDNAzol® (Invitrogen), conforme a recomendação do fabricante. O método permite realizar a extração de DNA genômico de amostras vegetais ou de culturas previamente crescidas de forma rápida e com qualidade. Embora não se obtenha uma concentração tão alta quanto outros métodos como CTAB, permite extrair DNA suficiente para o trabalho em questão.

As amostras de tecido vegetal foram maceradas em N₂-líquido e em 0,1 g do pó fino resultante da maceração foi adicionado 0,15 ml do reagente PlantDNAzol®. O material foi incubado por 5 minutos a 25°C, adicionado 0,15 ml de clorofórmio e agitado em “vórtex” por 15 segundos, seguido de incubação a 25°C por 5 minutos. O material foi centrifugado a 12.000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante transferido para novo microtubo.

O DNA extraído foi precipitado pela mistura da fase aquosa com 0,125 mL de etanol absoluto, e incubação a 25°C por 5 minutos. A etapa seguinte consistiu de nova centrifugação a 5.000 RPM por 4 minutos visando à sedimentação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 0,15 ml de solução de etanol 70% com auxílio de agitação em “vórtex” por 15 segundos e nova centrifugação a 5.000 RPM por 4 minutos. Em seguida, o etanol foi retirado do DNA total extraído e os tubos contendo o DNA foram colocados para secar na bancada a temperatura ambiente.

Posteriormente, o DNA foi ressuspendido em 35 µl de tampão TE (Tris HCl 10 mM – EDTA 1 mM) pH 8,0. Os extratos foram quantificados e a qualidade da extração (pureza) das amostras foi verificada através da leitura da densidade ótica (DO) a 260nm e 280 nm utilizando o aparelho Nanodrop® Spectrophotometer ND 1000. Os extratos foram corrigidos para uma concentração de 20 ng de DNA por µl para as alíquotas de trabalho, realizada através de uma diluição com água milli-Q estéril. As alíquotas de trabalho foram utilizadas nas reações de amplificação pela técnica de PCR.

3.3.4 Amplificação da região 16S rDNA do DNA extraído das plantas de cana pela reação em cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA extraído foi submetido a uma reação de “nested – PCR” com o objetivo de se evitar a amplificação de plastídeos conforme já observado por CHELIUS E TRIPLETT (2001). Na primeira reação de amplificação foram utilizados os iniciadores 799F e 1492R que produziram um fragmento de aproximadamente 700 pb. Já na segunda reação (utilizando produtos de PCR da primeira reação) foram utilizados os iniciadores 968FGC (contém o grampo de GC) e 1401R que produziram um fragmento de aproximadamente 430pb.

a) 1º Reação de amplificação (PCR) utilizando os iniciadores 799F e 1492R

Inicialmente foi realizada uma amplificação com os iniciadores utilizados por CHELIUS e TRIPLETT (2001) visando eliminar a amplificação de seqüências derivadas de cloroplastos (

Tabela 3). Esta decisão foi tomada após analisar as seqüências dos iniciadores utilizados para PCR-DGGE para a região 16S rDNA e verificar a ocorrência de similaridade com seqüências de algumas plantas como por exemplo, tomate e cana-de-açúcar. A reação de PCR foi constituída dos iniciadores 799F e 1492R na concentração de 0,12 µM cada, tampão de reação (10 mM), MgCl₂ (3,0 mM), dNTPs (0,2 mM cada), albumina bovina (25 µM), Taq DNA polimerase (2 U) e aproximadamente 80 ng de DNA para um volume final de 50 µL por reação. As condições de reação foram as mesmas descritas pelos autores acima: desnaturação inicial de 95°C por 3 min; seguida de 30 ciclos com 20 seg. a 94°C, 40 seg. a 53°C e 40 seg. a 72°C; seguidos de uma extensão final de 72°C por 7 min.

Tabela 3: Iniciadores utilizados nas reações de amplificação para “nested” - PCR e respectivas seqüências de nucleotídeos

Iniciador	Seqüência (5' – 3')
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T
799F	AAC MGG ATT AGA TAC CCK G

* M: A ou C; K: G ou T

b) 2º Reação de amplificação (PCR-DGGE) usando os iniciadores 968FGC e 1401R

Foi realizada a otimização da reação de PCR da região 16S para as espécies alvo com o objetivo de se obter uma melhor resolução de bandas no gel de DGGE (Boa Sorte, dados não publicados). Os extratos de DNA das amostras das bactérias foram submetidos a amplificação pela técnica de PCR utilizando os iniciadores para PCR-DGGE para análise da comunidade microbiana segundo GELSOMINO et al., (1999). A reação de PCR foi constituída dos iniciadores 968F-GC e 1401R na concentração de 0,17 µM cada, tampão de reação (10 mM), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM cada), Taq DNA polimerase (2 U) e 1µL do produto da reação anterior para um volume final de 50 µL por reação. As seqüências dos iniciadores estão listadas na Tabela 4. As condições da reação foram as mesmas descritas pelos autores acima exceto pela temperatura de anelamento que foi aumentada de 55°C para 61°C, desnaturação inicial de 93°C por 5 min; seguida de 35 ciclos com 1 min a 94°C, 1 min a 61°C e 2 min a 72°C; seguidos de uma extensão final de 72°C por 5 min.

Tabela 4: Iniciadores utilizados nas reações de amplificação para análise por DGGE e respectivas seqüências de nucleotídeos.

Iniciador	Seqüência (5' – 3')
1401R	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG
968FGC	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC

3.3.5 Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação – DGGE

O produto de amplificação da reação de PCR foi aplicado em Gel com Gradiente de Desnaturação (DGGE) e submetido a uma eletroforese de 100 volts por 16 horas em uma cuba vertical contendo tampão TAE 0,5X conforme a metodologia descrita por MUYZER et al. (1996).

a) Montagem do gel

Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical (INGENYphorU – 2) com espaçador de 1,0 mm para 32 amostras. Os espaçadores e o pente foram limpos com álcool. As placas de vidro foram limpas nos 2 lados com uma solução de KOH/metanol e após serem lavados com água corrente, foram rinsados com água destilada e secas com papel absorvente para retirar restos de poliacrilamida. Depois de serem lavadas (detergente e esponja macia) e passadas em água deionizada, as placas foram limpas com etanol em abundância, secas com papel absorvente e montadas no sistema.

O gradiente químico de desnaturação de uréia-formamida utilizado para as análises em DGGE foi de 55% a 65%. Foram preparadas duas soluções com menor e maior concentração de uréia-formamida com 6% de poliacrilamida para volume final de 48 mL para o gel de corrida, sendo que o gel concentrador utilizado foi com 8% de poliacrilamida (5mL) sem o desnaturante. O gel concentrador ficou localizado na parte superior do gel acima do gradiente para receber as amostras. Para formar o gradiente do gel desnaturante foi utilizado uma bomba peristáltica com fluxo aproximado de 2,2mL/min.

Este sistema utiliza uma coluna de acrílico para misturar as soluções de uréia-formamida em gradiente da maior (65%) para a menor concentração (55%). Depois da polimerização do gel de corrida (meia hora) retirou-se toda a água depositada sobre o gel (com papel absorvente), e se adicionou a solução de poliacrilamida sem agente desnaturante para a formação do gel concentrador com o auxílio de uma pipeta automática de 1 mL. O pente para 32 amostras foi aplicado sobre esse gel concentrador. Após a polimerização do gel, o cassete (aparato contendo o gel) foi colocado na cuba de corrida contendo 17 litros de tampão TAE 0,5x pré-aquecido a 60°C.

b) Aplicação das amostras

Foram utilizados os produtos de amplificação da reação de PCR de estirpes conhecidas e já definidas como padrão, BR 11335, BR 11504, BR 11115, BR11281, e BR 11366 (constitui as estirpes do inoculante padrão). Em cada alíquota de 20 µl do produto amplificado foram misturados 5 µL de corante (0,5% azul de bromofenol, 40% sacarose, 0,1 mol/L de EDTA, 5% de SDS) e aplicados nos poços do gel. O gel foi submetido a uma eletroforese vertical com voltagem de 100 v por 16 horas.

c) Coloração

Após a eletroforese vertical o gel foi submetido ao processo de coloração que foi feita com nitrato de prata (AgNO₃) segundo a metodologia descrita por Creste (2001). O gel foi imerso

em uma solução de fixação (Álcool etílico 10% + Ácido acético 1%) por 10 minutos, em seguida passou por uma lavagem com água destilada gelada durante 1 minuto. Em seguida, foi submetido a uma solução de pré-tratamento (Ácido nítrico 1,5%), lavado novamente e submetido a solução de impregnação (AgNO_3 2%) por 20 minutos, mantido no escuro. Foram então feitas duas lavagens de 30 segundos cada e adicionado a solução de revelação (Carbonato de sódio 3% + formaldeído 0,162%) até a total visualização das bandas, seguido da aplicação da solução de bloqueio (Ácido acético 5%) para evitar o escurecimento excessivo do gel. Promoveu-se então a lavagem final com água gelada e o gel foi envolvido em papel celofane usando uma placa de vidro como suporte e mantido por aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente até a desidratação completa.

d) Análise dos géis de DGGE utilizando o programa GelCompar II

Uma vez desidratado, o gel foi escaneado a 200 dpi e analisado utilizando o software Gelcompar2, versão 3.1. Foi então gerado um Dendrograma de similaridade seguido pela matriz de presença e ausência de bandas conforme estabelecido pela plataforma do programa. Foi utilizado o coeficiente de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento foi o UPGMA (MUELLER-DOMBOIS & ELLEMBERG, 1974).

Os dados gerados pela matriz de ausência e presença de bandas foram contabilizados e tabulados para posterior representação gráfica da ocorrência de bandas correspondentes às bactérias contidas no inoculante e análise de frequência das estirpes identificadas.

3.4 Efeito da Inoculação das Bactérias Diazotróficas Endofíticas sobre as Características Agronômicas utilizadas

3.4.1 Análise de produtividade de colmos

A análise da produtividade de colmos (peso fresco) foi feita aos 12 meses após o plantio. Realizou-se o corte e limpeza dos colmos retirando as palhas secas e a bandeira (parte superior da planta de cana-de-açúcar), seguido da pesagem da área útil da parcela em balança analógica. As médias obtidas foram comparadas pelo teste Scott Knott em nível de 10% de significância.

3.4.2 Análise do teor de nitrogênio

Foram realizadas coletas de material vegetal aos doze meses após o plantio, momentos antes da colheita para análise do teor de Nitrogênio nos tecidos vegetais. A amostragem foi realizada segundo MALAVOLTA et al. (1989), através da coleta do terço médio da folha (3+) livre da nervura principal de um total de 10 plantas de cana-de-açúcar por parcela. As plantas de cana-de-açúcar foram escolhidas de forma aleatória para todos os tratamentos analisados. Prosseguiu-se então com a secagem e moagem para posterior pesagem e análise do N-Total, realizada pelo método clássico de Kjeldahl como descrito por ALVES et al., (1994).

3.5 Dados Meteorológicos das Cidades onde se Localizaram os Experimentos

Os experimentos apresentaram condições adversas de precipitação na qual o experimento I foi favorecido com maiores taxas totalizando 1376 mm contra 1156 mm do experimento II no período de 12 meses de condução dos experimentos (Figura 2). O experimento I além de apresentar as maiores taxas de precipitação foi favorecido com irrigação por pivô central.

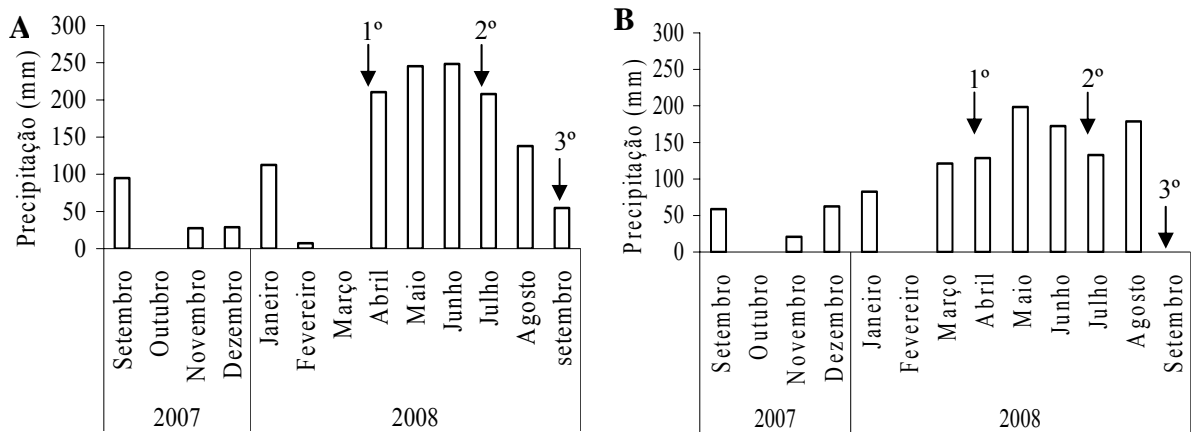


Figura 2: Precipitação acumulada mensal em mm no período de setembro de 2007 a Agosto de 2008 (www.itep.gov.br). Setas indicam as épocas de coleta para análise molecular. **A** – Experimento I (Usina Maravilha), **B** - Experimento II (Usina Olho D'Água).

As diferentes condições climáticas provavelmente estão ligadas à localização geográfica de cada experimento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Definição dos Padrões para os Géis de DGGE

Os géis de DGGE possuem um gradiente químico desnaturante constituído por uréia e formamida que permite a diferenciação de produtos amplificados por PCR que apresentem a mesma massa molecular. Logo, permite diferenciar produtos de PCR que apresentam a mesma altura nos géis de agarose.

A amostra de DNA quando em fita dupla passa livremente pelo gradiente, porém a medida que vai sendo desnaturada ocorre uma diminuição da velocidade de migração de tal forma que quando está quase completamente desnaturada praticamente para de migrar no gel. Amostras com menor conteúdo de GC tendem a permanecerem na região superior do gel pois são desnaturadas primeiro enquanto amostras com maior conteúdo de GC necessitam de um maior poder desnaturante tendendo a paralisar na região inferior do gel (NAKATSU, 2007).

Os nucleotídeos GC apresentam três ligações de pontes de hidrogênio enquanto que os nucleotídeos AT apresentam apenas duas ligações, Isto explica em partes a necessidade de maior poder desnaturante para moléculas de DNA com maior conteúdo de GC.

A amplificação por PCR é realizada com iniciadores que apresentem um grampo de GC para evitar que a amostra migre em excesso e caia do gel além de aumentar o poder de separação entre indivíduos semelhantes (Figura 3).

As bactérias contidas no inoculante (

Tabela 2) foram utilizadas para extração do DNA bacteriano total seguido da amplificação pela PCR utilizando os iniciadores da Tabela 4. O produto da reação de amplificação foi aplicado nos géis de DGGE para obter um perfil padrão de bandas correspondente ao inoculante e permitir a localização de bactérias correspondentes a estas bandas nas amostras de tecido vegetal de cana-de-açúcar. Com isso foi realizado o monitoramento das bactérias contidas no inoculante nas amostras de tecido vegetal (nó da base). Embora a confirmação total só possa ser realizada com o sequenciamento destas bandas, procedimento este não realizado neste trabalho.

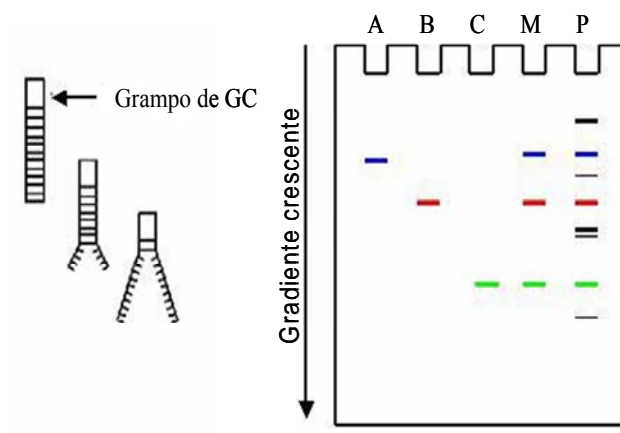


Figura 3: Esquema representativo do comportamento das amostras apresentando o grampo de GC em DGGE. Gel a direita mostrando a separação de diferentes microrganismos: A, B e C – diferentes microrganismos; M – Mistura das amostras A, B e C e P – Representa microrganismos presentes em amostras de planta.

Os géis de DGGE necessitam de um padrão de bandas para ser utilizado nas extremidades e no meio do gel de poliacrilamida visando verificar a possível formação do gradiente quando o perfil formado após a corrida de eletroforese e coloração do gel é analisado. As bandas correspondentes as estirpes bacterianas usadas no inoculante da cana-de-açúcar foram definidas como padrão para o monitoramento das cinco bactérias contidas no inoculante (Figura 4). Conforme mostra a figura, o Gel de DGGE tem a capacidade de separar amostras de mesma massa molecular quando os géis de agarose não conseguem (Figura 4). Isto se dá porque estes géis separam as amostras pela sua constituição nucleotídica, mais precisamente pela quantidade de GC presente na sequência de DNA.

Conforme observado na Figura 4B as bactérias utilizadas constituem um bom padrão devido a separação das bandas. Foi observada uma boa separação inclusive para as amostras 1 e 2 que constituem duas espécies do mesmo gênero *Herbaspirillum*. O perfil de bandas gerados no gel foi condizente com o gradiente crescente de agente desnaturante e a porcentagem das bases nucleotídicas GC da região amplificada, sendo que como esperado as amostras com menor conteúdo de GC permaneceram na região superior do gel e amostras com maior conteúdo de GC migraram mais até alcançarem a região inferior do gel (Figura 4B e Tabela 5).

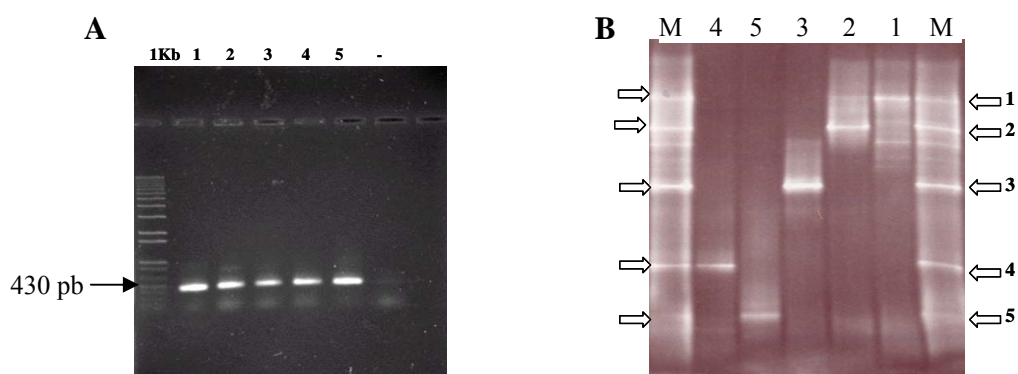


Figura 4: **A** – Gel de Agarose contendo o produto de amplificação por PCR das estirpes bacterianas utilizadas como inoculante para cana-de-açúcar: 1Kb – Marcador de massa molecular, Gel corado com brometo de etídio. **B** – Gel de DGGE corado com Syber Gold e contendo as estirpes utilizadas no gel A. 1 – 5: estirpes bacterianas. 1 - BR11281 – *Gluconacetobacter diazotrophicus*, 2 - BR 11366 – *Burkholderia tropica*, 3 - BR 11115 - *Azospirillum amazonense*, 4 - BR 11335 – *Herbaspirillum seropedicae* e 5 - BR 11504- *Herbaspirillum rubrisubalbicans*.

Tabela 5: Porcentagem das bases nucleotídicas GC da região amplificada pelos iniciadores utilizados nas espécies utilizadas no inoculante.

Espécie	Estirpe	% GC da região amplificada
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	M4	54,96
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Z67	55,19
<i>Azospirillum amazonense</i>	Y2	57,04
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	PAL5	57,27
<i>Burkholderia tropica</i>	Ppe8	57,74

- Informações obtidas do Banco de Dados NCBI.

4.2 Estudo da Comunidade de Bactérias Diazotróficas em Cana-de-Açúcar Analisada Através da Técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

As plantas de cana-de-açúcar são anatomicamente divididas em parte aérea, formada por colmos, folhas, inflorescências, frutos e parte subterrânea constituída de raízes e rizomas (MONZABANI et al., 2006). O colmo é dividido em nó e entrenó. O entrenó, região formada entre dois nós apresentam acúmulo de sacarose crescente dos entrenós mais jovens para os maduros (WHITAKER & BOTTA 1997).

O nó, nódio ou região nodal é uma região muito importante para a descrição das variedades, pois engloba a gema, o anel de crescimento, a cicatriz foliar e a zona radicular bastante variável entre os genótipos de cana (MONZABANI et al., 2006).

A anatomia interna do nó difere do entre-nó, composto de feixes vasculares ramificados, com pouco tecido do parênquima tendo assim uma alta porcentagem de fibra e uma baixa porcentagem de caldo. O caldo do nó imaturo tem uma porcentagem mais alta de °Brix que o entre-nó, com o tempo os teores de sacarose do entre-nó invertem isto e o entre-nó passa a ter maior °Brix (FERNANDES E BENDA, 1985). Como conseqüência da alta quantidade de fibra e do baixo conteúdo de caldo o nó contém menos sacarose em comparação ao entre-nó (HUSSAIN et al., 2004).

O estudo da comunidade de bactérias diazotróficas endofíticas foi realizado no nó da base das plantas de cana-de-açúcar aos 6, 9 e 12 meses após o plantio. A escolha desta região da planta teve como objetivo, a busca por uma melhor representação da colonização da parte aérea das plantas de cana-de-açúcar, pois apresenta modificações anatômicas de forma que os vasos condutores não estão antiparalelos como nos entrenós, existindo inclusive alguns vasos que não chegam à parte aérea ocorrendo uma ruptura no nó (Figura 5).

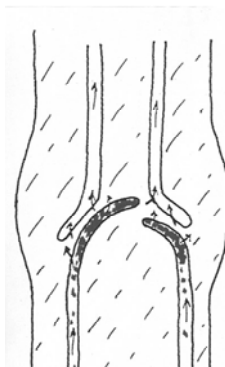


Figura 5: Esquema representativo do nó de plantas de cana de açúcar da variedade Ja 60-5 mostrando a desconinuidade dos feixes vasculares. DONG et al., 1997.

Nestas modificações possivelmente ocorre uma maior colonização por bactérias diazotróficas endofíticas uma vez que estas ficam retidas. Isso pode ser uma das explicações da baixa colonização da parte aérea em comparação com as raízes (DONG et al., 1997). JAMES et al., 1997 contestam dizendo que estas modificações ocorrem nas variedades americanas mas não nas brasileiras uma vez que se verifica um grande número de bactérias na parte aérea das variedades de plantas de cana-de-açúcar brasileiras.

Contudo JAMES et al., 1997 relatam em sua revisão que GRACIOLLI e RUSCHEL (1981) e REIS (1991) tenham também mostrado que, em comum com *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (KAO E DAMANN, 1980), *G. diazotrophicus* está particularmente concentrada dentro do nó do colmo, provavelmente porque o xilema está enrolado nestes pontos e assim impede o fluxo de solutos (mais bactérias) pelo xilema para os próximos entrenós (BULL et al., 1972;

TEAKLE et al., 1978; CLEMENTS, 1980; HARRISON AND DAVIS, 1988). Então, como as bactérias parecem acumular no nó é provável que elas escapam do xilema para colonizar os espaços intercelulares (DONG et al., 1994). Isto foi demonstrado com *Herbaspirillum* (JAMES et al., 1997 e OLIVARES et al., 1997), e também é sugerido pelo estudo de PATRIQUIN et al., (1980).

Os feixes vasculares, também chamados de “fibras” nas análises tecnológicas, que são praticamente paralelos ao longo dos entrenós, mas que se entrelaçam nos nós, de forma a permitir suas diversas ramificações necessárias para dirigirem-se às bainhas e folhas da planta, São os canais de água e nutrientes entre o sistema radicular e todas as demais partes da planta, afinal os vasos xilema e floema estão inseridos dentro dos feixes vasculares (SCARPARI et al., 2008). Como ocorre o transporte de bactérias via vasos condutores acredita-se que ocorre um acúmulo de bactérias nas modificações dos feixes vasculares encontrados no nó das plantas de cana-de-açúcar. Sendo assim, esta região da planta foi escolhida com a finalidade de se ter uma melhor representação da colonização da parte aérea das plantas inoculadas.

Após a extração de DNA das amostras de tecido vegetal foram realizadas as reações de amplificação por “nested-PCR.” Esta técnica foi adotada afim de se evitar a amplificação de cloroplastos como descrito por CHELLIUS E TRIPLET, 2001. O produto obtido foi aplicado em gel de agarose a 1% para confirmação do fragmento esperado de 700 pb para a primeira reação e de 430pb para a segunda reação. Em seguida seguiu se com a aplicação das amostras em gel de poliacrilamida para análise de DGGE.

O gel de poliacrilamida após eletroforese vertical foi envolto em papel celofane semipermeável e passou por um processo de desidratação a temperatura ambiente por um período de aproximadamente 24 horas. Após totalmente desidratado o gel foi escaneado e analisado no programa gelcompar na qual gerou um dendrograma de similaridade e uma matriz binária de ausência e presença de bandas (Figura 6). O dendrograma de similaridade permitiu fazer os agrupamentos e a matriz de ausência e presença de bandas possibilitou localizar bandas na mesma posição correspondente às bactérias contidas no inoculante da cana-de-açúcar. Com as informações das matrizes binárias de ausência e presença de bandas foi montado uma tabela relacionando o local onde se localizou cada experimento (usina), variedades de cana-de-açúcar utilizadas e época de coleta para cada tratamento utilizado (Tabela 6). Esta tabela foi utilizada para gerar os gráficos que estão discutidos no decorrer deste trabalho.

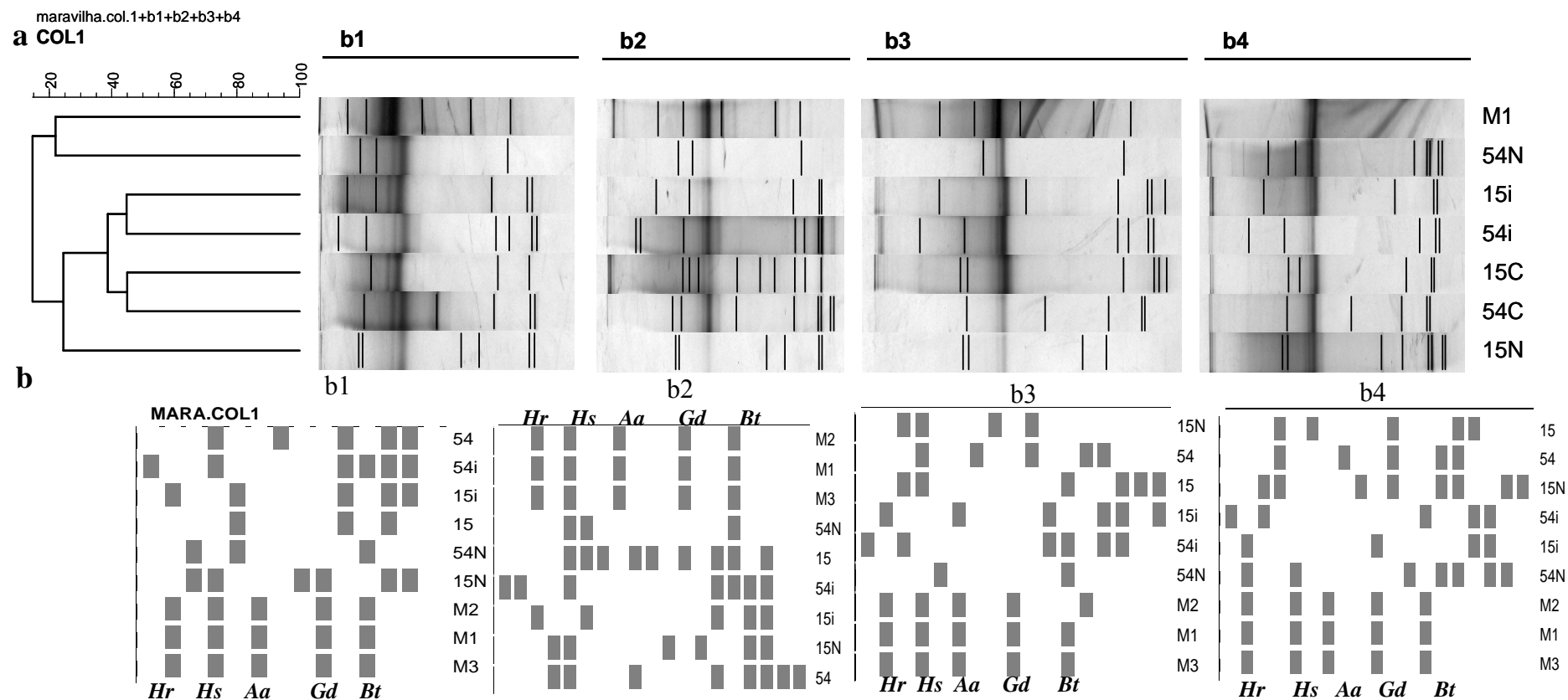


Figura 6: a) Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE com o programa GelCompar II, seguido do Gel de poliacrilamida em posição horizontal. 1ª coleta (6 meses) Foi analisada a similaridade pelo Coeficiente de Jaccard $\{(Tol\ 1,3\% - 1,3\%) (H > 0\%, S > 0\%) [0\% - 100\%]\}$. 15 e 54 correspondem, respectivamente, às variedades RB867515 e RB72454; N – tratamentos adubados com adubo nitrogenado; i – tratamentos inoculados; C – Controle; M – Marcadores contendo as cinco bactérias utilizadas no inoculante e utilizadas como padrão Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*. b) Matriz binária de ausência e presença de bandas obtida na análise em (a) evidenciando bandas que se encontram na mesma altura das bandas correspondentes às bactérias inoculadas e as demais bactérias que integram a diversidade endofítica das plantas de cana-de-açúcar. b1 – b4, blocos de 1 a 4.

Tabela 6: Distribuição de bandas correspondentes as bactérias contidas no inoculante e bandas não identificadas (NI) por época de coleta nos dois experimentos. Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedica*, e, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*.

Usinas	Variedade	Tratamentos	1º coleta (6 meses)							2º coleta (9 meses)							3º coleta (12 meses)							Total Geral
			Hr	Hs	Aa	Gd	Bt	Total	NI	Hr	Hs	Aa	Gd	Bt	Total	NI	Hr	Hs	Aa	Gd	Bt	Total	NI	
Maravilha	RB867515	Controle	0	2	0	1	2	5	17	2	3	0	0	1	6	62	0	1	1	0	0	2	16	
		Inoculado	4	0	1	1	0	6	14	4	4	2	1	1	12	75	0	2	1	0	0	3	6	
		Nitrogenado	0	3	0	1	0	4	20	3	4	0	0	1	8	74	0	2	1	0	0	3	9	
		Total	4	5	1	3	2	15	51	9	11	2	1	3	26	211	0	5	3	0	0	8	31	342
	RB72454	Controle	0	3	0	0	0	3	20	3	3	0	0	1	7	61	0	0	0	0	0	0	18	
		Inoculado	0	2	0	0	4	6	18	4	3	0	2	2	11	65	0	0	0	0	0	0	15	
		Nitrogenado	1	2	0	0	3	6	9	2	3	0	0	1	6	62	1	0	0	0	0	1	28	
		Total	1	7	0	0	7	15	47	9	9	0	2	4	24	188	1	0	0	0	0	1	61	336
Olho D'Água	RB867515	Controle	0	3	1	3	0	7	25	0	2	0	1	0	3	16	1	0	4	1	0	6	54	
		Inoculado	0	3	1	0	0	4	16	0	0	0	0	0	0	19	1	1	0	0	0	2	23	
		Total	0	6	2	3	0	11	41	0	2	0	1	0	3	35	2	1	4	1	0	8	77	175
	RB72454	Controle	0	3	0	0	1	4	19	0	0	0	0	0	0	49	3	0	0	0	0	3	35	
		Inoculado	0	3	1	2	2	8	23	0	1	0	0	0	1	18	1	0	0	0	0	1	32	
		Nitrogenado	0	3	2	0	3	8	26	0	1	0	0	0	1	10	1	1	1	0	0	3	31	
		Total	0	9	3	2	6	20	68	0	2	0	0	0	2	77	5	1	1	0	0	7	98	272
	Total Geral			5	27	6	8	15	61	207	18	24	2	4	7	55	511	8	7	8	1	0	24	267

Os experimentos foram conduzidos no estado do Pernambuco, porém apresentaram características diferentes de clima, solo e manejo. O experimento I conduzido na Usina Maravilha apresentou condições de umidade mais favoráveis devido às maiores taxas de precipitação além do uso de irrigação por pivô central. O experimento II conduzido na Usina Olho D'Água situou-se em uma localidade bem mais seca, na divisa com o estado da Paraíba e não foi favorecido com irrigação artificial.

Durante o monitoramento das bactérias inoculadas aos 6 meses após o plantio (1ª coleta) no experimento I foi observado bandas correspondentes a bactéria *G. diazotrophicus* somente na variedade RB867515 mas não para a variedade RB72454 (Figura 6, b). É possível que os sítios de colonização tenham influenciado o estabelecimento da bactéria na planta, já que bactérias diazotróficas endofíticas como *H. seropedicae* apresentam diferentes sítios de infecção (SILVA, 2001). Outra explicação poderia ser devido a população desta bactéria estar em um número baixo, dificultando assim sua detecção por métodos diretos.

Ao realizar o monitoramento das bactérias diazotróficas endofíticas utilizadas no “inoculante da cana” aos 9 meses após o plantio (2ª coleta), observa-se no experimento I (Usina Maravilha) bandas correspondentes às bactérias *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *A. amazonense*, *G. diazotrophicus* e *B. tropica* nos tratamentos de inoculação referentes às duas variedades de cana utilizadas (Anexo D). No caso do experimento II (Usina Olho D'Água) só foram observadas bandas correspondentes às bactérias *G. diazotrophicus* e *H. seropedicae*. Bandas correspondentes a bactéria *H. seropedicae* foram as mais encontradas com uma frequência de ocorrência pouco acima de 60% na variedade RB867515 e de 100% para a variedade RB72454 (Figura 10), embora o número de bandas tenham sido relativamente baixo em relação as demais coletas (Figura 7).

Diversos autores têm observado uma ampla ocorrência desta bactéria quando avaliadas através do crescimento em meio de cultura semi-seletivo (REIS, 1991; REIS et al., 1994; REIS JR., et al., 2000; PERIN et al., 2004). Como a técnica utilizada (DGGE) analisa a população total existente no momento da coleta é possível que a presença de outras bactérias possa ter dificultado a detecção de *G. diazotrophicus*.

Por outro lado, bandas correspondentes a bactéria *H. seropedicae* foram mais abundantes para todos os tratamentos analisados nos dois experimentos (Anexo B

e Figura 6 b), sugerindo uma maior ocorrência desta bactéria nas plantas estudadas. Foi observado inclusive uma banda correspondente a *H. seropedicae* na variedade RB72454 adubada com 120 kg N ha⁻¹ assim como no controle não inoculado do experimento I (Figura 6, b), enquanto no experimento II ocorreu uma ampla ocorrência em todos os tratamentos (Anexo B). Situação bastante semelhante da ocorrência de bandas em tratamentos não inoculados também ocorreu com *B. tropica* para as duas variedades estudadas (Figura 6, b e Anexo B).

Aos 9 meses (2ª coleta) também foi observado bandas correspondentes as bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* em plantas que não foram inoculadas em ambos experimentos (Anexo D, a – d; g - h).

Assim como aos 12 meses (3ª coleta), no experimento I foi observado a presença de bandas correspondentes as bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Azospirillum* usadas no inoculante em tratamentos não inoculados (Anexo F, b - d). Para bactérias do gênero *Azospirillum* este tipo de infecção é mais comum, uma vez que esta bactéria apresenta uma alta sobrevivência no solo (BASHAND e LEVANOY, 1990), logo não pode ser descartada a hipótese da planta ter adquirido estas bactérias deste ambiente. Podendo inclusive colonizar as mais diversas espécies de plantas, o que torna a sua ocorrência em plantas não inoculadas algo bastante frequente. Além disso, alguns artigos reportam a disseminação desta bactéria pelo ar (BASHAN, 1991). O mesmo ocorreu para o experimento II também para as bactérias *H. seropedicae*, *A. amazonense* e *B. tropica*, sugerindo que estas bactérias podem ter sido

adquiridas do solo ou por dispersão. Bandas correspondentes a *H. rubrisubalbicans* foram encontradas em todos os tratamentos sejam eles inoculados, adubados ou controle (Anexo F, f).

Esta ocorrência pode ser devido às diferentes formas de disseminação da bactéria conforme já relatado por REIS JR (2002). Uma das possibilidades seria a colonização destas bactérias nas plantas hospedeiras uma vez que bactérias do gênero *Herbaspirillum*, assim como do gênero *Azospirillum* identificadas no Anexo B

, b - d são encontradas em diversas plantas assim como da família *Poaceae* (OLIVARES et al., 1996), tornando possível sua permanência no campo e posterior disseminação para as plantas de cana-de-açúcar (REIS JR, 1998). Outra característica deste gênero, que pode explicar a ocorrência destas bactérias em plantas não inoculadas, é a permanência destas bactérias no solo em estágio viável, mas não culturável (OLIVARES et al., 1996). Neste caso, a bactéria sofre um desvio do metabolismo natural devido aos estresses ocorridos no solo de forma que não ocorre divisão celular em meio de cultura, embora, em contato com as plantas a bactéria sofre um estímulo de forma que retorna o processo de divisão celular (ROSZAK & COLEWELL, (1987) citados por REIS JR. (1998)). Existe ainda a possibilidade desta bactéria está presente na semente durante a propagação como citado por DOBEREINER & BALDANI, (1995).

A ocorrência de bandas correspondentes a *G. diazotrophicus* nos tratamentos não inoculados também foi observada como mostrado na Figura 6, b (experimento I) e no Anexo B

, b - d (experimento II). Para esta bactéria esta ocorrência também pode ser explicada pelas diferentes formas de dispersão desta bactéria. Uma possibilidade são os resíduos de tecidos de plantas, como mostrado por REIS, (1991), onde o palhço da cana possivelmente apresenta estas bactérias podendo ocorrer a dispersão desta espécie diazotrófica endofítica em áreas de canavial sem queima. Outra possibilidade seria sua transmissão via insetos sugadores como as cochonilhas uma vez que esta bactéria foi isolada de uma espécie deste inseto (ASHBOLT & INKERMAN, 1990). Fungos micorrízicos também podem ser transmissores desta bactéria uma vez que foram detectadas no interior dos esporos de *Glomus clarum*, *Acaulospora sp.*, e *Gigaspora gigantea* coletados em área de cultivo com bata doce não inoculada com esta bactéria (PAULA et al., 1993).

A análise geral do experimento I (Usina Maravilha) mostrou que os tratamentos apresentaram um número inferior de bandas correspondentes às bactérias contidas no inoculante quando comparados com a segunda coleta (Figura 7 e 8). Contudo para o experimento II observa-se o contrário, ou seja, um número superior de bandas referentes ao inoculante na época da primeira coleta (6 meses).

GOMES et al., (2005) observaram um efeito de flutuação populacional entre variedades de cana-de-açúcar aos 90 dias após o plantio onde a variedade comercial SP70-1143 apresentou 100 vezes mais células de *G. diazotrophicus* que a variedade *Chunee* e 10 vezes mais aos 180 dias que o híbrido SP79-2312. Estes autores verificaram ainda que estas populações não acompanharam o final do ciclo ocasionando assim uma redução na população desta espécie bacteriana.

Porém, neste estudo em questão se avaliou a diversidade de espécies e não a população de cada bactéria. Ao se analisar toda a diversidade considerando as bandas não identificadas observa-se um menor número de bandas em comparação com a coleta posterior para os dois experimentos (Figura 8). Sendo assim, se tem uma menor diversidade na primeira coleta em comparação com a segunda.

Em adição, os resultados não mostraram efeito negativo da adubação nitrogenada sobre a diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas, em contraste com a literatura que tem demonstrado um efeito prejudicial da adubação nitrogenada na diversidade de bactérias

diazotróficas endofíticas (Figura 9). Este efeito negativo foi observado em canaviais no México e na Índia (FUENTES-RAMÍRES et al., 1993, 1999; MUTHUKUMARASAMY, 1999). No Brasil REIS JR. (2000 a) observou que doses superiores das recomendadas (300 kg N ha⁻¹) diminuíram a população de *G. diazotrophicus*, mas não afetaram a população de *H. seropedicae*. Portanto, como está sendo avaliada a diversidade microbiana total, a possível diminuição de uma espécie microbiana pode favorecer o desenvolvimento de outras de forma que não se observa redução da diversidade entre os tratamentos adubado e o controle não adubado. Além disso, a dose de adubação nitrogenada utilizada neste experimento foi menor que a metade da dose utilizada pelos autores citados acima (120 kg N ha⁻¹).

Ao se analisar o experimento II fica evidente uma baixa frequência de bandas correspondentes às bactérias contidas no inoculante assim como das bandas não identificadas nas três coletas analisadas (Figura 8).

As baixas taxas de precipitação e ausência de irrigação suplementar resultando em um estresse hídrico podem ter propiciado a diminuição da diversidade bacteriana endofítica neste experimento (Figura 2), uma vez que esta condição é um dos fatores limitantes nos processos fisiológicos das plantas.

Em condições de campo REIS JR, (1998) também observou diminuição na população de bactérias diazotróficas endofíticas ao realizar coletas de tecido de plantas de cana-de-açúcar em períodos de baixa precipitação utilizando a técnica de NMP (Número Mais Provável). O autor sugere que a população de *G. diazotrophicus* no interior das plantas de cana-de-açúcar seja sensível a fatores como estresse hídrico e variações sazonais. A paralisação do crescimento vegetal, acúmulo de carboidratos e a diminuição da taxa fotossintética, ocasionada pelo fechamento estomático para a diminuição da perda de água são mudanças que ocorrem em plantas de cana-de-açúcar quando em estresse hídrico e que podem afetar a população de bactérias que residem no interior do vegetal (REIS JR. 1998).

Este trabalho, portanto, corrobora com esses resultados e ainda adiciona que este efeito é sobre toda a diversidade endofítica uma vez que representa a diversidade total e não apenas a diversidade dos microrganismos fixadores de N. A explicação para este fato pode ser as mudanças metabólicas desenvolvidas pelas plantas em condições de estresse hídrico.

A análise da diversidade microbiana tem-se mostrado bastante sensível, apresentando variação a perturbações, sendo dependente de mudanças ambientais e por isso pode inclusive ser um parâmetro indicador de qualidade do solo como sugerido por SMIT et al., (2001) e JOHNSON et al., (2003). No caso das plantas, este aspecto pode não ser muito diferente uma vez que a planta reflete as condições de estresse ao qual os microrganismos estão submetidos, podendo a qualquer momento desenvolver mecanismos para se adequar as condições adversas do ambiente.

O inoculante não afetou a diversidade microbiana nativa no experimento I (Usina Maravilha), pois não se observa um deslocamento da população nativa em função do tratamento de inoculação, porém no experimento II (Usina Olho D'Água) observa-se uma redução desta população para os tratamentos inoculados (Figura 9). Este resultado sugere que o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas sobre a diversidade microbiana é dependente das variáveis de clima e solo.

A análise da diversidade apresentou um maior número de bandas para o experimento I sugerindo uma maior diversidade endofítica durante a idade fenológica da cultura (Figura 8). É possível que as boas condições hídricas deste experimento devido a irrigação utilizada tenham influenciado na população de bactérias endofíticas e isso inclui as diazotróficas.

Ao se analisar a 3ª coleta aos 12 meses observa-se uma redução no número de bandas que sugerem uma diminuição da diversidade endofítica (Figura 7), e indicam a ocorrência de um controle da diversidade endofítica pelas plantas de cana-de-açúcar no decorrer do ciclo da cultura.

Resultados semelhantes, porém, da diminuição da população de bactérias diazotróficas endofíticas no final do ciclo da cultura foram encontrados por REIS JR. (1998) e por GOMES et al. (2005).

GOMES et al. (2005) estudaram a variação dos teores de açúcar solúveis totais, °BRIX e sacarose em relação a população de *G. diazotrophicus* e *Herbaspirillum spp.* Os autores verificaram um aumento crescente do teor de sacarose até os 360 dias, a partir do qual os valores começaram a diminuir. Os autores observaram ainda, uma relação entre o aumento de sacarose na base do colmo com o aumento do número de *G. diazotrophicus* no ápice do colmo. Segundo estes autores, a população desta bactéria em diferentes genótipos de cana-de-açúcar em várias partes da planta apresentou maiores populações até os 180 dias após o plantio, a partir do qual começou a cair. Na parte aérea variou de 100 a 10.000 células e não acompanhou o crescimento da planta decaindo com a proximidade do final do ciclo. Por outro lado as populações de *Herbaspirillum spp.* apresentaram-se mais estáveis no decorrer do ciclo da cultura.

REIS JR et al. (2000) também observaram uma redução na população de *G. diazotrophicus* na base do colmo de plantas de cana-de-açúcar maior que 10 vezes entre o sétimo e o décimo quinto mês após o plantio, contudo as populações de *Herbaspirillum sp.* permaneceram estáveis ou aumentaram com o fim do ciclo. Estes autores observaram ainda um maior número destas bactérias nas raízes diferindo estatisticamente da base do colmo, ápice do colmo e da folha. O número destas bactérias nas demais partes da planta não diferiu estatisticamente.

Munoz-Rojas & Caballero-Mellado (2003) observaram que a dinâmica populacional de estirpes de *G. diazotrophicus* inoculadas em diferentes variedades de cana-de-açúcar declinou drasticamente com a idade da planta, independente da variedade, genótipo ou da estirpe bacteriana.

Os resultados aqui apresentados se assemelham com os autores acima citados mostrando que ao se aproximar o final do ciclo da cultura ocorre uma redução considerável no número de bandas na época da terceira coleta (Figura 7). Isto pode ser explicado pelo aumento dos teores de sacarose, deslocamento destas bactérias para sítios específicos, ou ainda como uma resposta negativa da planta devido já está no final do ciclo e não necessitar mais manter estas bactérias.

Contudo, no presente trabalho se realizou a análise da diversidade endófitica e não da quantidade de cada espécie localizada no interior dos colmos das plantas de cana-de-açúcar. Porém os resultados foram semelhantes, sugerindo que no nó basal das plantas de cana-de-açúcar ocorre uma diminuição da diversidade endofítica total e não apenas das bactérias diazotróficas endofíticas. Embora, a redução populacional pode ter afetado a identificação desta espécie ficando abaixo do nível de detecção da técnica de forma que pode ter subestimado a análise da diversidade.

Os resultados da análise de agrupamento correspondente a primeira coleta (6 meses após o plantio) do nó basal das plantas de cana-de-açúcar foram diferentes para os dois experimentos analisados. No experimento I (Usina Maravilha) observa-se que o inoculante bacteriano promoveu uma alteração bastante expressiva na diversidade microbiana endofítica das plantas de cana-de-açúcar quando comparado com os demais tratamentos, conforme pode ser constatado pelo agrupamento formado no dendrograma de similaridade gerado a partir do gel de poliacrilamida (Figura 6, a).

Foi observado um agrupamento próximo a 20% de similaridade quando todos os tratamentos foram comparados e uma separação clara em dois grupos, sendo um constituído dos tratamentos inoculados e o outro com o tratamento controle. Ambos os grupos apresentaram similaridade de aproximadamente 50% entre si. Estes resultados evidenciam

assim um efeito direto da inoculação sobre a comunidade bacteriana endofítica na base do colmo das plantas de cana-de-açúcar, uma vez que ocorre esta separação entre os tratamentos inoculados e o controle.

Em contraste, no experimento II (Usina Olho D' Água), pode-se observar que os tratamentos se agruparam com uma similaridade de 42% (Anexo A). Houve um agrupamento separando as variedades de cana utilizada no presente estudo, de forma que não foi observado um efeito da inoculação sobre a diversidade microbiana endofítica nos tecidos analisados (nó da base do colmo).

A variedade RB72454 agrupou com a variedade RB867515 ao nível de similaridade de 42%. Os tratamentos de inoculação e o nitrogenado agruparam com uma similaridade de 55% dentro da primeira variedade enquanto para a segunda variedade o agrupamento foi entre o tratamento controle e o tratamento inoculado a 47% de similaridade. Sendo assim, prevaleceu um efeito varietal.

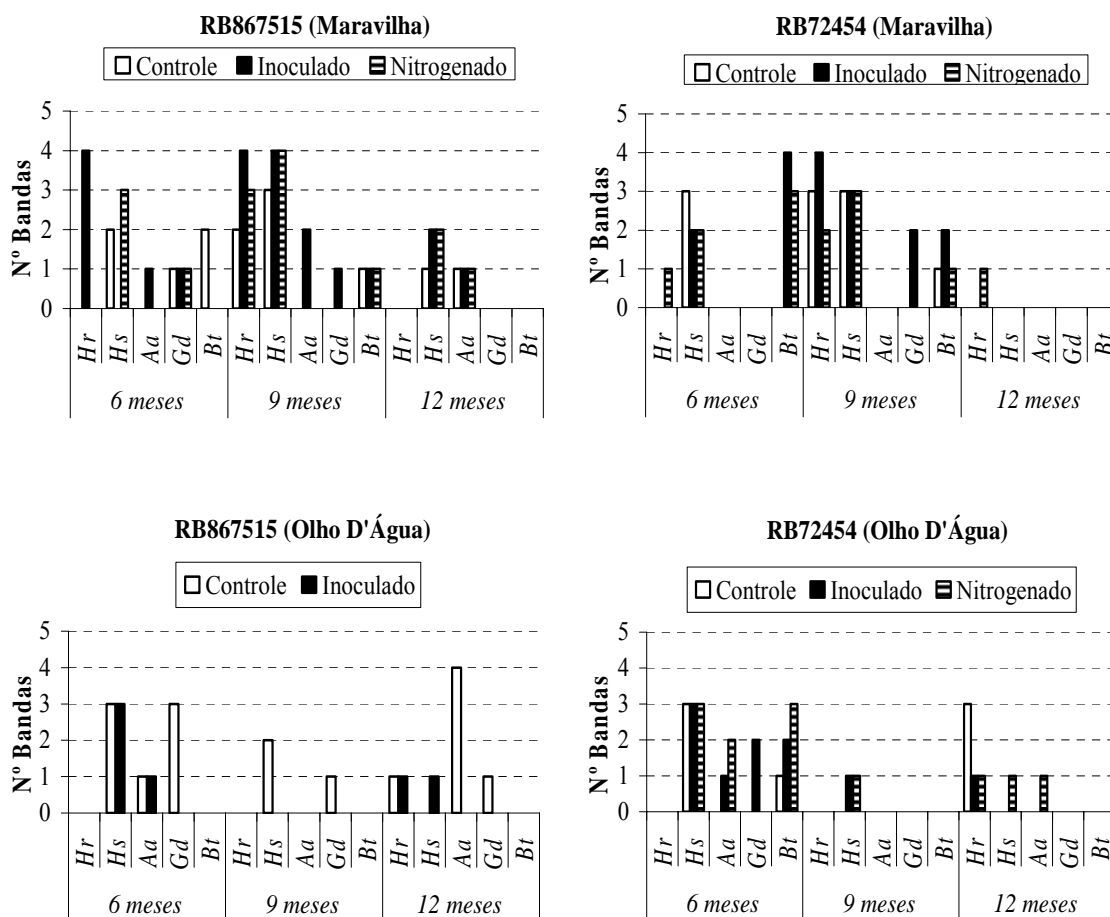


Figura 7: Análise do número de bandas referentes as bactérias contidas no inoculante da cana-de-açúcar. Variação por época de coleta para as duas variedades estudadas nos dois experimentos. Bactérias utilizadas no inoculante e utilizadas como padrão. Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*

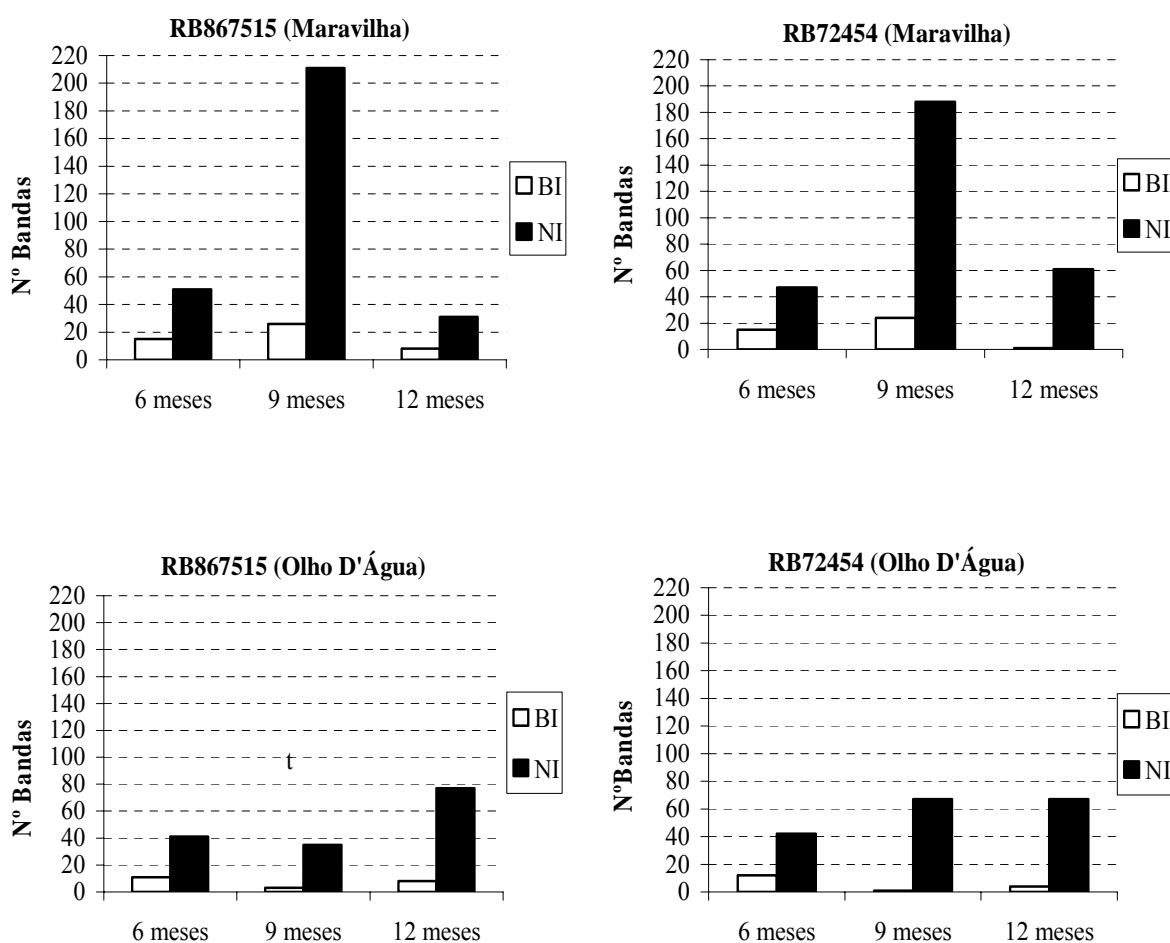


Figura 8: Análise do número total de bandas para as variedades de cada experimento. BI – Bandas Identificadas referentes as bactérias contidas no inoculante; NI – Não Identificadas, corresponde as demais bandas que encontradas. 6, 9 e 12 meses – Época de coleta.

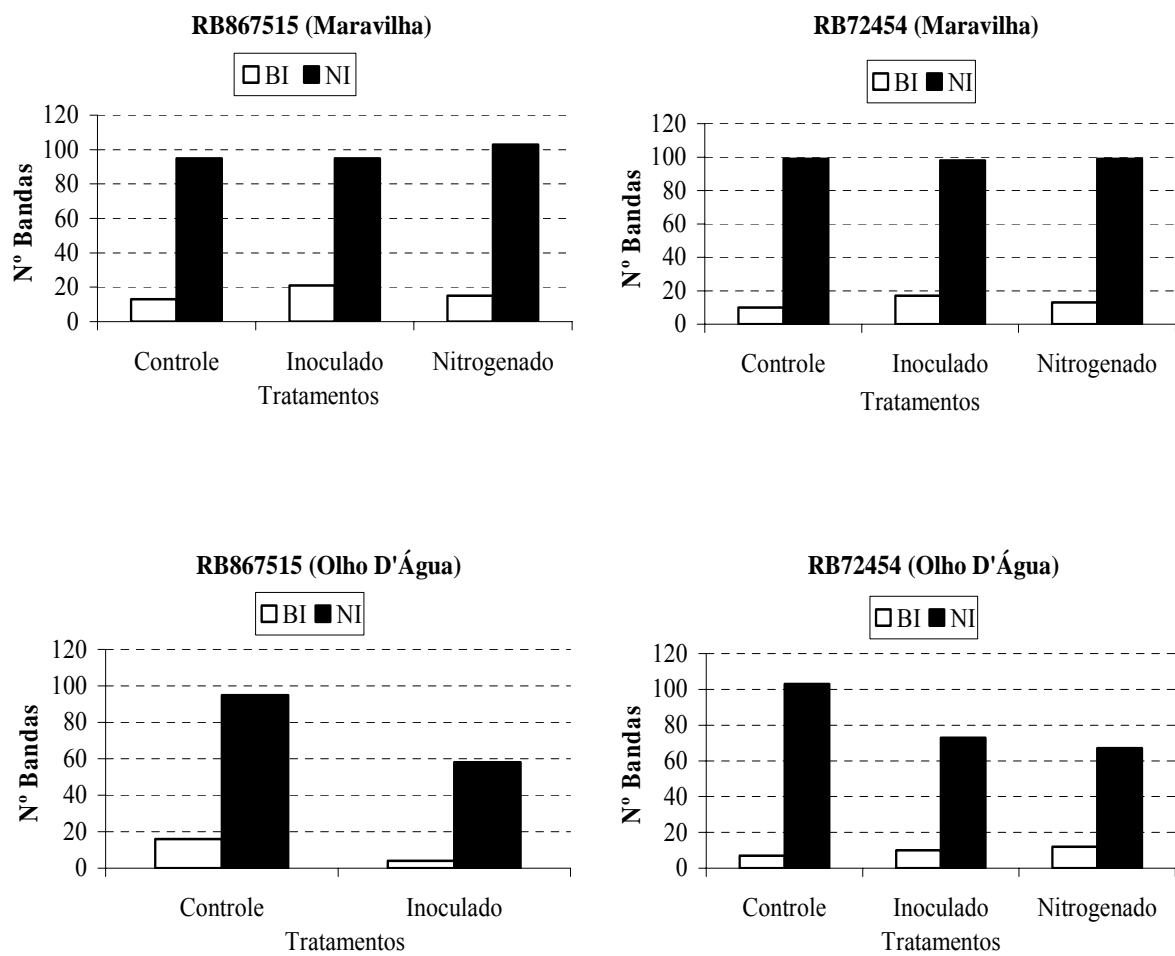


Figura 9: Análise do número total de bandas por tratamento para as variedades de cada experimento. BI – Bandas Identificadas referentes as bactérias contidas no inoculante; NI – Não Identificadas, correspondente as demais bandas encontradas.

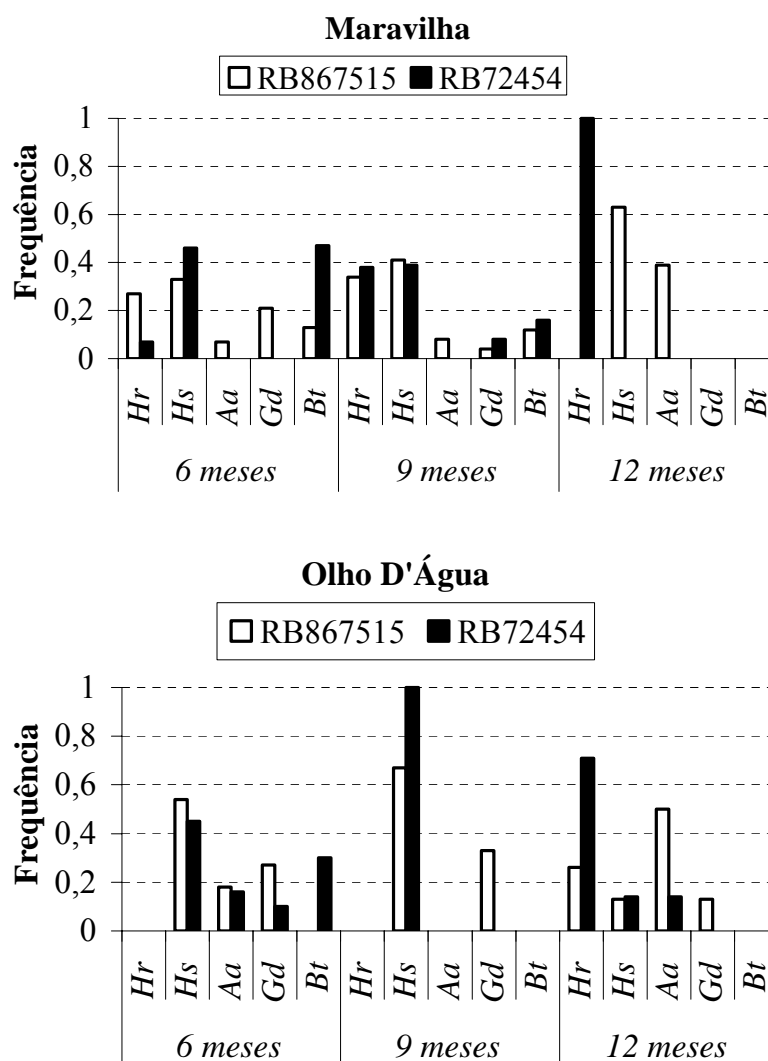


Figura 10: Frequência da ocorrência de cada estirpe bacteriana dentro de cada variedade em cada época de coleta. Separação por experimento. Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*. Variedades: RB867515 e RB72454.

Aos 9 meses após o plantio, no experimento I a diversidade microbiana endofítica agrupou de acordo com as variedades de cana-de-açúcar utilizadas, com uma similaridade superior a 42% (Anexo C, a), e não em função dos tratamentos de inoculação como na coleta anterior. Estes resultados contrastam com a primeira coleta (Figura 6) e sugerem um efeito da variedade de cana-de-açúcar maior que a do inoculante padrão.

Estudos de inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas em plantas da família *Poaceae* não mostraram efeito das variedades das plantas utilizadas ou do tipo de solo. Como exemplo citamos os trabalhos de RODRIGUES et al., (2006) que avaliaram duas variedades de arroz com o uso de NMP e isolamento por meios de cultura semi-sólidos seletivos; REIS JR, (2000 b) com diferentes variedades de cana-de-açúcar e PERIN, (2007) ao estudar a diversidade de *Burkholderia spp.* em cana-de-açúcar. Porém, as condições experimentais e as ferramentas utilizadas neste estudo são diferentes das utilizadas pelos autores acima.

A técnica de DGGE foi utilizada de forma a representar a diversidade microbiana endofítica total das plantas de cana-de-açúcar e não somente a comunidade diazotrófica como

nos experimentos acima. Resultados de agrupamento por variedade das plantas utilizadas foram observados por FERREIRA, (2008) ao trabalhar com duas variedades de arroz irrigado, sendo uma de alta e outra de baixa resposta a FBN. O autor sugere que exista uma interação genótipo-estirpe bacteriana inoculada e não apenas espécie-estirpe bacteriana.

O tratamento adubado foi o que mais se aproximou do inoculado com uma similaridade de aproximadamente 46% para a variedade RB72454 e 42% para a variedade RB 867515. Entretanto, não se pode concluir que este efeito seja da inoculação, pois os valores de similaridade estão muito próximos, sugerindo portanto a existência de efeito da variedade na formação dos grupos.

A análise das amostras correspondente ao segundo experimento mostrou que a diversidade microbiana endofítica agrupou de acordo com os tratamentos de inoculação e não mais com as variedades utilizadas. Os tratamentos inoculados apresentam 47% de similaridade entre si, seguido pelo tratamento adubado com 40% de similaridade com os inoculados (Anexo C, b). Enquanto que os tratamentos controle agruparam-se com 32% de similaridade separando dos tratamentos inoculados em 75%. Desta forma, os tratamentos controle foram os que mais se diferiram dos inoculados evidenciando assim um efeito da inoculação sobre a diversidade microbiana endofítica.

O efeito da inoculação sobre a diversidade endofítica ocorreu na época da segunda coleta (9 meses após o plantio), três meses mais tarde que o experimento I. Talvez este efeito se deva as condições edafoclimáticas deste experimento, uma vez que foi conduzido na Usina Olho D' água localizada próximo a divisa com o estado da Paraíba, onde apresentou menores taxas de precipitação que a usina Maravilha (Figura 2). Certamente, estes fatores vem influenciar a diversidade microbiana endofítica, contribuindo para que ocorra os diferentes tipos de agrupamentos entre os tratamentos.

Na análise da terceira e última coleta realizada momentos antes da colheita dos experimentos observa se para o experimento I uma formação de grupos que apresentaram uma similaridade próxima a 20%. Destaque é dado ao primeiro grupo para a variedade RB867515 entre tratamento inoculado e o adubado com uma similaridade de 43%, e o segundo na variedade RB72454 para os mesmo tratamentos com uma similaridade de 34%, mostrando assim uma maior semelhança entre tratamentos adubados e inoculados no final do ciclo da cultura em comparação com o tratamento controle (Anexo E, a).

No experimento II a diversidade microbiana endofítica estudada também agrupou pela variedade de cana utilizada (Anexo E, b), como observado para a mesma coleta do experimento I (Anexo E, a), e não mais pelo efeito de inoculação como detectado na 2ª coleta. Todos os tratamentos agruparam-se a 40% de similaridade. A variedade RB72454 agrupou-se com uma similaridade próxima a 60% para todos os tratamentos, sendo que os que mais se aproximaram foi o tratamento inoculado com o controle apresentando uma similaridade de aproximadamente 70%.

A Inoculação com bactérias dizotróficas endofíticas em plantas de cana de açúcar exerce influencia sobre a diversidade microbiana destas plantas. No inicio (1ª coleta – 6 meses) foi observado a formação de grupos evidenciando o efeito do inoculante no experimento I. Embora, com o tempo, nas coletas posteriores este efeito foi diluído de forma que os agrupamentos passaram a ser pela variedade de cana-de-açúcar.

O clima e as demais condições as quais cada experimento foi submetido também exerceram influencia direta sobre a diversidade endofítica, na qual se observou uma maior diversidade bacteriana no experimento I conduzido na Usina Maravilha sob boas condições de umidade uma vez que se utilizou irrigação artificial. Em contraste, o experimento II apresentou uma diversidade reduzida provavelmente devido as condições de baixa umidade devido as condições climáticas e a ausência de irrigação artificial. Logo, este trabalho sugere que o clima influencia não somente na quantificação de populações de espécies, mas também

no número de espécies de tal forma que ocorre um aumento da diversidade microbiana endofítica em plantas de cana-de-açúcar em condições de boa umidade.

Finalmente, o estado fenológico da cultura também parece exercer uma ação direta na diversidade endofítica de forma que se tem uma diminuição da diversidade com a aproximação do fim do ciclo da cultura. REIS JR et al., 2000 e GOMES et al 2005 observaram uma redução na população de *G. diazotrophicus* sem alteração na população de *Herbaspirillum sp.*, contudo estes resultados evidenciam a redução de outras espécies de tal forma que se tem uma menor diversidade microbiana no final do ciclo da cultura.

A baixa detecção de bactérias utilizadas no inoculante pode ser devido a limitações metodológicas da técnica de DGGE como a amplificação preferencial de genes (NAKATSU, 2007). Além de limitações referentes ao próprio processo de amostragem, que deve ser o mais representativo possível, o método de extração de DNA também pode ter sido limitante, haja vista que pode ser mais eficiente na lise de um grupo microbiano específico (NAKATSU, 2007). Além disso, a própria especificidade dos iniciadores na reação de PCR atrelada a formação de artefatos podem contribuir para a representação de forma errônea da diversidade microbiana (NAKATSU, 2007). Por fim, Alguns microrganismos podem estar em uma população muito baixa e necessitam de pré-crescimento em meio de cultura para serem identificados (EDENBORN et al., 2007).

Foi observado uma grande variação entre os blocos como se observa no Anexo B, Anexo D e Anexo F. Resultados semelhantes foram encontrados por ZILLI, (2004) trabalhando com a técnica de DGGE em experimentos com aplicação de herbicidas na cultura da soja. Mostrando assim grande sensibilidade da microbiota às condições adversas, uma vez que se trata de um sistema biológico na qual a microbiota, tanto do solo quanto das plantas, apresentam ampla variação. Contudo, para a realização das análises de agrupamento buscou se utilizar as ferramentas do programa de análises dos géis de DGGE (GelCompar) de tal forma que se avaliou o efeito dos tratamentos a fim de diminuir o impacto da variação entre blocos nas análises de agrupamento.

Numa análise geral, verifica-se que a diversidade microbiana apresentou variações nas diferentes idades fenológicas das plantas de cana-de-açúcar. Isso pode ter ocorrido devido a diversos fatores tais como o processo de inoculação, clima e fisiologia das plantas, sugerindo uma relação direta entre as condições ambientais, genótipo vegetal, idade fenológica e as estirpes bacterianas utilizadas como inoculante.

4.3 Efeito da Inoculação das Bactérias Diazotróficas Endofíticas Sobre as Características Agrônômicas Utilizadas.

No experimento I (Usina Maravilha) não houve efeito da inoculação sobre a produção de colmos (Tabela 7). Por outro lado, a adubação com 120 kg de N ha⁻¹ promoveu um aumento significativo na produtividade da ordem de 15 e 25%, respectivamente para as mesmas variedades. A produtividade foi superior a média nacional de 80 Mg ha⁻¹, sendo que o tratamento mais produtivo (160 toneladas de colmos ha⁻¹) foi com aplicação de 120 kg N ha⁻¹ para a variedade RB867515. Embora o percentual de nitrogênio tenha sido ligeiramente maior para os tratamentos inoculados também não se observa diferença estatística (Tabela 7).

Efeitos negativos na produção de colmos de cana-de-açúcar, em resposta a tratamentos de inoculação foram observados por OLIVEIRA et al., (2006). Os autores utilizaram a mesma mistura de bactérias como inoculante nas variedades SP701143 e SP813250 para diferentes tipos de solos e encontraram resultados negativos na cana planta, mas, que vieram a ser positivos na cana soca para a variedade SP813250 conduzida em um Planossolo. Os autores também observaram incrementos de até aproximadamente 28% na produção de colmos para a variedade SP701143 e concluíram que os benefícios provenientes da inoculação dependem da

mistura de bactérias utilizadas, do genótipo vegetal e do tipo de solo. Confirmando a interação planta, microrganismo e ambiente. Desta forma, os resultados negativos obtidos neste estudo podem não se repetir para as próximas colheitas e podem inclusive diferenciar positivamente visto que os benefícios da inoculação podem ser maiores em determinadas situações para a cana soca (OLIVEIRA et al., 2006).

Analisando o experimento II (Usina Olho D'Água) ainda, respostas positivas a inoculação foram ligeiramente superiores as observadas no tratamento controle, apresentando incremento de 4 e 7% para as variedades RB867515 e RB72454 respectivamente, embora também não tenham apresentado diferença estatística. Os teores de nitrogênio nas folhas foram idênticos para os tratamentos inoculados e o controle (Tabela 7). Foram observados valores de produtividade inferiores ao controle no tratamento adubado com 120 Kg N ha, sugerindo que o Nitrogênio não é o fator limitante ou a dose aplicada ter sido muito alta para estas condições, de modo a provocar toxicidade nas plantas. Portanto o benefício da cultura pela inoculação pode ser explicado não somente pela FBN, mas também pela produção de fitormônios estimuladores do crescimento (OLIVEIRA et al., 2005).

Os efeitos positivos da inoculação de algumas estirpes de bactérias na produtividade das plantas podem estar associados ao processo da FBN, à síntese de hormônio de crescimento produzidos pelas bactérias, ou a um efeito de sinergismo entre esses dois fatores atuando nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas (CANUTO et al., 2003).

No caso de *Azospirillum* sp., respostas positivas à inoculação têm sido observadas em plantas, inclusive quando cultivadas com altos níveis de nitrogênio, o que indica que as respostas da planta não ocorrem apenas em razão do N₂ fixado, mas, também, da produção de outras substâncias como o ácido indol-acético (AIA) (DOBBELAERE et al., 2003). Os autores relatam ainda que o AIA é conhecido por produzir tanto respostas rápidas (aumento da alongação celular) como lentas (divisão e diferenciação celular). Estas substâncias podem promover um maior desenvolvimento do sistema radicular, permitindo assim, um maior aproveitamento dos nutrientes do solo pelas plantas, uma vez que se tem uma maior área de solo explorada pelas raízes (DOBBELAERE et al., 2003).

Bactérias do gênero *Azospirillum* secretam fitohormônios, principalmente o AIA, que desempenham papel essencial na promoção de crescimento das plantas em geral (BASHAN & HOLGUIM, 1997). KUSS et al., (2007) isolaram diferentes isolados de endofíticos em raízes de arroz e observaram produção de AIA por todos isolados obtidos, observando inclusive produções maiores que os padrões utilizados. Estes resultados sugerem que bactérias de outros gêneros além do *Azospirillum* podem estar atuando no estímulo de crescimento vegetal pela produção de auxinas.

Em uma plantação de cana-de-açúcar a produtividade de colmos é o dado de maior interesse, pois na prática é o que vai para a usina. Em termos econômicos, é o que é vendido para os usineiros, originado capital para o produtor. O efeito da inoculação na produção de colmos e a contribuição da FBN de cana-de-açúcar são influenciados pelo tipo de mistura de bactérias utilizadas no inoculante, genótipo da planta, tipo de solo e fertilização nitrogenada (OLIVEIRA et al., 2006).

A produtividade de colmos mostra-se bastante discrepante nos dois experimentos, o que pode ser explicado pelas diferentes condições edafoclimáticas. Apesar dos experimentos terem sido conduzidos em um solo classificado como Argissolo, não significa que os dois sejam totalmente iguais. Existe um efeito de local com diferença estatística entre os dois experimentos e uma das causas provavelmente é a utilização de irrigação no experimento I que veio a proporcionar grandes ganhos na produtividade de colmos (Tabela 8).

Tabela 7: Produtividade de colmos em Megagrama por ha e teor de N na folha (%) de plantas de cana-de-açúcar. RB867515 e RB72454 - Variedades de cana utilizadas. Nitrogenado (120 kg N ha⁻¹). Análise realizada separadamente por experimento.

Usinas	Variedades	Tratamentos	Colmos (Mg ha ⁻¹)	%N
Maravilha	RB867515	Controle	135,5 B	1,25 A
		Inoculado	128,5 B	1,37 A
		Nitrogenado	155,5 A	--
	RB72454	Controle	109,7 B	1,22 A
		Inoculado	111,0 B	1,42 A
		Nitrogenado	137,5 A	--
Olho D'Água	RB867515	Controle	77,8 A	1,36 A
		Inoculado	80,8 A	1,35 A
		Nitrogenado	--	--
	RB72454	Controle	69,6 A	1,50 A
		Inoculado	74,4 A	1,51 A
		Nitrogenado	65,6 A	--

* Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 10% de significância

O conhecimento das interações existentes entre bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em plantas de cana de açúcar são pouco estudados apesar dos benefícios obtidos em um grande número de experimentos já realizados. Neste estudo embora os resultado da inoculação na produtividade da cultura não tenha apresentado diferença estatística, observou-se uma pequena contribuição no experimento II (Usina olho D'Água).

A diversidade microbiana mostrou se bastante sensível no decorrer do ciclo da cultura para os diferentes experimentos. Os resultados positivos na produtividade para o experimento II talvez possam ser explicados pelo efeito do inoculante ter sido na época de maior acúmulo de N pela planta aos 9 meses.

De uma maneira geral se observou bandas predominantes correspondentes ao gênero *Herbaspirillum* o que sugere uma maior predominância destas bactérias no ambiente endofítico das plantas de cana-de-açúcar. Estes dados condizem com os resultados de OLIVEIRA et al., (2008) que observou maior agressividade deste gênero em experimento de inoculação “in vitro” ao realizar testes com diferentes misturas das bactérias dizotróficas utilizadas como inoculante neste presente trabalho. Estes autores fizeram uso de NMP e sondas para Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) e observaram uma maior agressividade de colonização das espécies de *Herbaspirillum* em virtude de uma maior intensidade de sinal, sendo que as duas espécies ocupavam sítios diferentes parecendo haver um efeito antagônico entre as mesmas. Desta forma *H. seropedicae* mostrou se mais agressivo que *H. rubrisubalbicans*. Os autores observaram ainda não ocorrer diminuição da população quando inoculadas em mistura ou individualizadas. O mesmo não ocorreu para *G. diazotrophicus* que teve sua população diminuída em 10 vezes quando inoculada em mistura. Sendo assim deve ocorrer uma competição na colonização também entre a diversidade nativa das plantas de cana-de-açúcar em experimentos de inoculação de campo que não necessariamente pode resultar em efeito negativo na produção.

Tabela 8: Análise conjunta dos experimentos

Produção de Colmos						
Locais	Variedades				Média dos Locais	
	RB72454		RB867515			
Olho d'água	72,00	aB	79,30	aB	75,65	B
Maravilha	110,37	bA	132,00	aA	121,18	A
Média das Variedades	91,18	b	105,65	a		

Teor de Nitrogênio						
Locais	Variedades				Média dos Locais	
	RB72454		RB867515			
Olho d'água	1.36	bA	1.51	aA	1.43	A
Maravilha	1.31	aA	1.32	aB	1.31	B
Média das Variedades	1.33	a	1.41	a		

Produção de Colmos						
Locais	Tratamentos				Média dos Locais	
	Controle		Inoculado			
Olho d'água	73.70	aB	77.60	aB	75,65	B
Maravilha	122.62	aA	119.75	aA	121,18	A
Média dos Tratamentos	98.16	a	98.67	a		

Teor de Nitrogênio						
Locais	Tratamentos				Média dos Locais	
	Controle		Inoculado			
Olho d'água	1.43	aB	1.43	aA	1.43	A
Maravilha	1.23	bA	1.39	aA	1.31	B
Média dos tratamentos	1.33	a	1.41	a		

Produção de Colmos						
Variedades	Tratamentos				Média das Variedades	
	Controle		Inoculado			
RB72454	89.67	aB	92.70	aB	91,18	B
RB867515	106.65	aA	104.65	aA	105,65	A
Média dos tratamentos	98.16	a	98.67	a		

Teor de Nitrogênio						
Variedades	Tratamentos				Média das Variedades	
	Controle		Inoculado			
RB72454	1.30	aA	1.36	aA	1.33	A
RB867515	1.36	aA	1.46	aA	1.41	A
Média dos tratamentos	1.33	a	1.41	a		

* Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 10% de significância, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas.

Diversos experimentos de inoculação em plantas da família *poaceae* com bactérias diazotróficas endofíticas já foram conduzidos em diversos países do mundo e o Brasil foi o pioneiro nesta pesquisa com os primeiros trabalhos realizados pela Dra. Johana Döbereiner e sua equipe na década de 50.

Várias características já foram analisadas no decorrer destes anos e muitos efeitos já foram observados nas diferentes culturas desta família de plantas, principalmente em cana-de-açúcar. Contudo, a utilização de ferramentas moleculares como o DGGE para avaliação do monitoramento das bactérias inoculadas e ao mesmo tempo se verificar o efeito da inoculação na população bacteriana nativa desta cultura ainda não tinham sido realizados.

Este trabalho permitiu observamos um aumento da diversidade bacteriana endofítica até os nove meses, a partir do qual, começou a diminuir até o final do ciclo da cultura. O sítio de produção da Cana influenciou diretamente na diversidade bacteriana principalmente devido às diferenças hídricas existentes em cada local. Logo, foi verificada maior diversidade bacteriana nos experimentos conduzidos em boas condições hídricas (Usina Maravilha – experimento I), na qual também foi detectado uma maior quantidade de bandas correspondentes as bactérias contidas no inoculante da cana. Porém a resposta na produtividade de colmos foi muito pequena e não apresentou diferença significativa uma vez que se observou produtividade acima da média nacional até para os tratamentos controles.

No entanto, para o experimento II (Usina Olho D'Água) que apresentou déficit hídrico, os ganhos com a inoculação chegaram a 7% na produtividade de colmos para a variedade RB72454, embora, também não tenha apresentado diferença estatística. Talvez este efeito positivo da inoculação para este sítio possa ser explicado por um pequeno deslocamento da população nativa, aqui designados como não identificados (NI) e pelos agrupamentos no dendrograma de similaridade onde houve uma separação em dois grupos, tratamentos inoculados e não inoculados, evidenciando um efeito de inoculação aos nove meses que é a época de maior acúmulo de N pelas plantas de cana. No monitoramento das bandas correspondentes às bactérias contidas no inoculante não foi observada a ocorrência de todas as bactérias inoculadas, que pode ter ocorrido devido está população está abaixo do nível de detecção da técnica de DGGE ou está localizada em outros sítios da planta uma vez que se analisou o nó da base do colmo. Por fim, foi observada maior frequência de bactérias do gênero *Herbaspirillum* spp em ambos os experimentos analisados.

Os estudos com bactérias diazotróficas vêm crescendo com o passar dos anos e a perspectiva de promover uma economia na produção agrícola em consórcio com um manejo mais sustentável decorrente da diminuição de insumos agrícolas pela geração de inoculante para as diversas culturas vem impulsionar estes estudos. A fim de se ter um maior conhecimento da utilização destas bactérias contidas no inoculante da cana sugere se utilizar outras técnicas de biologia molecular como reações de PCR utilizando iniciadores específicos para genes envolvidos no processo de FBN como os genes *nifH* e para cada gênero e espécie específicos a fim de se ter uma identificação mais precisa da bactéria de interesse sem que tenha influência de outros organismos ali presentes que não são o foco de estudo. Sugere se ainda a utilização de reações de sequenciamento para se ter conhecimento de quais grupos de bactérias predominam nos diferentes tratamentos de inoculação e a sua relação com os resultados positivos ou negativos na produção.

5 CONCLUSÕES

→ Houve baixo estabelecimento das bactérias presentes no inoculante conforme a análise de DGGE - não foi possível a detecção de todas as bactérias inoculadas.

→ Foi observada uma maior frequência de bandas correspondentes ao gênero *Herbaspirillum* em todos tratamentos, sugerindo uma maior população destas bactérias nos tecidos das plantas avaliadas em campo.

→ Foi observado a ocorrência de bandas (baixa frequência), correspondentes as bactérias inoculadas, nos tratamentos não inoculados, sugerindo a transmissibilidade ou dispersão das bactérias inoculadas.

→ A quantidade de bandas correspondentes às bactérias presentes no inoculante foi menor do que as referentes às não identificadas.

→ O local e época de coleta influenciaram na diversidade de bactérias endofíticas detectadas nos tecidos das plantas.

→ Os agrupamentos bacterianos ocorreram em função do genótipo ou da inoculação e variaram com o ciclo da cultura, sugerindo um controle da planta sobre a diversidade microbiana endofítica.

→ Não foi observado efeito significativo da inoculação na produtividade de colmos e no teor de N das plantas.

→ O local influenciou na produtividade das variedades.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, B. J. R.; SANTOS, J. C. F.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S., (Ed). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa – SPI, (Embrapa-CNPAP. Documentos, 46), p. 409-449, 1994.

ASBOLT, N. J. & INKERMAN, P.A. Acetic acid bacterial biota of the Pink sugarcane mealbug *Saccharococcus sacchari* and its environs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 707-712, 1990.

AZEREDO, D. F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, M.; VIEIRA, J. R. Nitrogênio em cana-planta, doses e fracionamento. **STAB**, Piracicaba, v. 4, n. 5, p. 26-32, 1986.

BALDANI J I, CARUSO L, BALDANI V L D, GOI S R E DÖBEREINER J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Local v. 29, n. p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D. E DÖBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane - reasons for success in Brazil. **Funct. Plant Biol.**, v. 29, p. 417-423, 2002.

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

BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A. de B.; BALDANI, J.I. and DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v. 90, p. 35-46, 1986.

BASHAN Y, HOLGUIN G. Azospirillum-plant relations: environmental and physiological advances (1990–1996). **Can J Microbiol.** v. 43, p. 103–121, 1997.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of Azospirillum inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 591-605, 1990.

BASHAN, Y.; LEVANONY E WHITMOYER, R. E. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. **Journal of General Microbiology** v. 137, p. 187-196, 1991,

BOA SORTE, P. M. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; SILVA, J. F. E BALDANI, J. I. Estudo da Transmissibilidade de Bactérias Diazotróficas Endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar crescidas sob condições de campo. XXVII Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, XI Reunião Brasileira Sobre Micorrizas, IX Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, VI Reunião Brasileira de Biologia Do Solo – **Fertbio** – Bonito-MS, 2006.

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 889-895, 2001.

BODDEY, R. M.; SOARES, L. H. B.; ALVES, B. J.R. AND URQUIAGA, S. Bio-Ethanol Production in Brazil. **Biofuels, Solar and Wind as Renewable Energy Systems**, Springer Netherlandes, v., n. p. 321-356, 2008.

BRASIL, M. da S. **Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz**. 105f. Tese (Doutorado em Fitotecnia), Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005.

Bull, T. A., Gayler, K. R., and Glasziou, K. T.. Lateral movement of water and sugar cross xylem in sugarcane stalks. **Plant Physiol.**, v. 49, p. 1007–1011, 1972.

Caballero-Mellado, J.; Carcano-Montiel, M.; Mascarua-Esparza, M. A. Field inoculation of wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum brasilense* under temperate climate. **Symbiosis** v. 13, p. 243-253, 1992.

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

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W.; The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L., **Microb. Ecol.** v. 41, p. 252– 263, 2001.

Clements, H. F.. *Sugar Cane Crop Logging and Crop Control: Principles and Practices*. **Pitman**, London, 1980.

COCKING, E. C.; STONE, P. J. AND DAVEY, M. R. Intracellular colonization of roots of arabidopsis and crop plants by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Biol. Plant** v. 42, p. 74–82, 2006.

COELHO, M. R. R; V. MARJON de; CARNEIRO, N. P., MARRIE, I. E. D.; PAIVA, E. e SELDIN, L. Diversity of nifH gene pools in the rhizosphere of two cultivars of sorghum (*Sorghum bicolor*) treated with contrasting levels of nitrogen fertilizer. **FEMS (Federation of European Microbiological Societies)** Microbiol Lett, v. 279, p. 15–22, 2007.

COLWELL, R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of industrial Microbial and Biotechnology**, v. 18, p. 302-307, 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. www.Conab.gov.br; acessado em Agosto de 2008

CRESTE, S.; NETO, A.T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Report**, v. 19, p. 299-306, 2001.

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

DÖBEREINER J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, v. 13(1/3), p. 1-13, 1992.

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

DOBEREINER, J. & BALDANI, V. L. D. Endophytic diazotrophs other than *Rizobia*. In: 7th International Symposium on Microbial Ecology Abstracts, Santos, p.14. 1995.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; CULLY, M. E. M.; ROBOREDO, M. R.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E. AND RODÉS, R. A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems. A New Role for the Apoplast. **Plant Physiol**, v. 105, p. 1139-1147, 1994.

DONG, Z.; McCULLY, M. E.; CANNY, M. J. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. **Annals of Botany**, London, v. 80. p. 147-158, 1997.

EDENBORN, S. L. and SEXSTONE, A. J. DGGE fingerprinting of culturable soil bacterial communities complements culture-independent analyses. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 1570–1579, 2007.

FERNANDES, A.N. AND BENDA, G.T.A. Distribution patterns of brix and fibre in the primary stalk of sugar cane. **Sugar Cane**, v. 5: p. 8–13, 1985.

FERREIRA, J. S **Inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado: qualidade do inoculante e necessidade da reinoculação**. 69f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

FREITAS, S. S. Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agronômico,. p. 1 – 30, 2007.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus* a endolactic producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v. 154, p. 145-150, 1993.

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

GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A. C.; CACCO G.; VAN ELSAS, J. D. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Microbiological Methods**, 102 Amsterdam, v. 38, n. 1, p. 1–15, 1999.

GILLAN, D. C.; SPEKSNIJDER, A. G. ZWART, G.; De RIDDER, C. Genetic diversity of the biofilme covering *Montacula ferruginosa* (Molusca, bivalvia) as evaluated by desnaturing gradient eletroforesis gel eletroforesis analysis and cloning of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA . **Applied and environmental Microbiology**, v. 64, p. 3464-3472, 1998.

GRACIOLLI, L. A. and RUSCHEL, A. P. Microorganisms in the phyllosphere and rhizosphere of sugar cane. In: VOSE, P. B. and RUSCHEL, A. P. **Associative N₂-Fixation** Vol. II. pp. 91–101., Eds., CRC Press, Boca Raton, 1981.

HARRISON, N. A. and DAVIS, M. J. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon-stunting disease. **Phytopathology**, v. 78, p. 722–727, 1988.

HEUER, H., SMALLA, K., Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H. (Eds.), **Modern Soil Micro-biology**, Marcel Dekker, New York, v. p. 353–373, 1997.

HUSSAIN, A.; KHAN, Z. I.; GHAFOOR, M. Y.; ASHRAF, M.; PARVEEN, R. e RASHID, M. H. Sugarcane, sugar metabolism and some abiotic stresses. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 6, n. 4, 2004. pag??????

HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 278-285, 1998.

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

JONSON, M. J.; LEE, K. Y.; SCOW, K. M. DNA fingerprint reveals links among agricultural crops, soil properties, and the composition of soil microbial communities. **Geoderna**, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 279-303, 2003.

KAO, J. AND DAMANN, K. E.. “*In situ*” localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugar cane. **Can. J. Bot.**, v. 58, p. 310–315, 1980.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J. D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 197-212, 2001.

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

KUSS, A. V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T. E FLORES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

LEITE, R. C. C.; LEAL M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos**, v. 78 CEBRAP, p. 15-21, 2007.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C. E OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: Princípios e aplicações**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 201 p, 1989.

MELO, I. S. Recursos genéticos microbianos. In: MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. **Recursos genéticos e melhoramento – Microrganismos**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 1-48, 2002.

MONZAMBANI, A. E.; PINTO, A. S.; SEGATO, S. V. E MATTIUZ, C. F. M. História e morfologia da cana-de-açúcar. IN: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E. E NÓBREGA, J. C. M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Editora??? Onde??? p. 11-19, 2006.

MOREIRA, F.M.S. Fixação Biológica de Nitrogênio Atmosférico. In: MOREIRA, F. M. S. e SIQUEIRA, J. O. (Eds.) **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, p. 449-476, 2006.

MOREIRA, F.M.S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas. In: **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. e BRUSSARD, L. (Eds.) **Título livro???? – Lavras: UFLA, p. pág. Capítulo???**, 2008.

MUELLER-DOMBOIS, D. & ELLEMBERG, H. Aims and methods of vegetation ecology. New York, **Jonh Wiley**, 1974. **pág.**

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

MURRAY, A. E.; PRESTON, C. M.; MASSANA, R.; TAYLOR, L. T.; BLAKIS, A.; WUK; DELONG, E. F. Seazonal and spatial variability of bacterial and archeal assemblages in the coastal waters near Anvers island Antarctic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2585-2595, 1998.

MUTHUKUMARASAMY, R., REVATHI, G. & LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility Soils**, v. 2, p. 7-14, 1999.

MUTHUKUMARASAMY, R., & REVATHI, *Gluconacetobacter diazotrophicus* associations in sugar cane cultivation in South India. **Tropic Agricultural** (Trinidad), v. 76, n. 3, p. 171-178, 1999.

MUYZER, G., DE WALL, E. C.; UINTTERLINDENN A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G., HOTTENTRÄGER, S., TESKE, A., WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA: A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities. In: Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., de Bruijn, F.J. (Eds.), **Molecular Microbial Ecology Manual**, 3.4.4, Kluwer, Dordrecht, p. 1–27, 1996.

NAKATSU, C. H. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. **Molecular-Based Approaches to Soil Microbiology symposium**, v. 71, n. 2, p. 562-571, 2007.

NJOLOMA, J.; TANAKA, K. SHIMIZU, T.; NISHIGUCHI, T.; ZAKRIA, M.; AKASHI, R.; OOTA, M. & AKAO, S. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum* sp. B501gfp1. **Biol Fertil Soils**, v. 43, p. 137–143, 2006.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biol. Biochem.**, v. 26, p. 1591-1601, 1994.

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

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytol.**, v. 135, p. 723–737, 1997.

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

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L; URQUIAGA, S; REIS, V. M. E BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. p. 26-32, 2006.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S; DOBEREINER, J; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂ – fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, A. L. M; BOA SORTE, P. M. F.; CANUTO, E. L.; KENNEDY, C.; BODDEY, R.M., REIS, V. M. E BALDANI, J. I. Inoculação de Estirpes selvagens e Mutantes nif- de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. **XXX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**. Recife-PE, 2005. CD-ROM

OLIVEIRA, A.L.M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **Eur. J. Soil Biol.**, 2008, [paginas???](#)

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

PATRIQUIN, D. G., GRACIOLI, L. A., AND RUSCHEL, A. P.. Nitrogenase activity of sugar cane propagated from stem cuttings in sterile vermiculite. **Soil Biol. Biochem.**, v. 12, p. 413–417, 1980.

PAULA, M. A. DE; SIQUEIRA, J. O. e DOBEREINER, J. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e de bactérias diazotróficas na cultura de batata-doce. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 17, p. 349-356, 1993.

PERIN, L.; SILVA, M.F. DA; FERREIRA, J.F.; CANUTO, E.L.; MEDEIROS, A.F.A.; OLIVARES, F.L.; REIS, V. M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia**, v. 37, p. 47-53, 2003.

PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n. 8, p.763-770, 2004.

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

PERIN, L. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica***. 103f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

POLZ, M. F.; CAVANAUGH, C. M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 64, p. 3724-3730, 1998.

RAMOS, H. J.O.; RONCATO-MACCARI, L. D.B.; SOUZA, E. M.; SOARES-RAMOS, J. R.L.; HUNGRIA, M. & PEDROSA, F. O. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. **Journal of Biotechnology**. v. 97, p. 243–252, 2002.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Amsterdam v. 151, n. 3 p. 167–177, 2000.

REIS Jr., F.B. **Influência do genótipo da planta, micropropagação e fertilização nitrogenada sobre a população de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 160p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) Instituto de Agronomia, - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1998.

REIS JUNIOR, F. B. dos; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v. 219, p. 153-159, 2000a.

REIS JUNIOR, F. B. dos; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 985-994, 2000b.

REIS Jr., F. B. **Ecologia e diversidade do gênero *Herbaspirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria* sp.** 98p. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo)-Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2002.

REIS, V. M., **Aspectos ecológicos e fisiologia da bactéria fixadora de N₂ *Acetobacter diazotrophicus*.** 119p. Tese (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio Janeiro, Seropédica, RJ, 1991.

REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; AND DÖBEREINER J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10, p. 101–104, 1994..

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas.** Viçosa, MG. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.432; p. 153-174, 2006.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; SILVA, M. F.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M. AND URQUIAGA, S. **Biological Nitrogen Fixation.** Ed. Dakota, 2008. **pág.**

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

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

ROSWALL, T. Nitrogen losses from terrestrial ecosystems: global, regional and local considerations. In: **International Meet. Global Impacts of Applied Microbiology.** v. 5, p. 17-26, 1979.

Sindicato das Industrias de Adubos e corretivos Agricolas do estado de são Paulo (Siacesp). www.siacesp.com.br, acesso em 12 de novembro de 2008.

SEGATO, S. V. Fisiologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E. E NÓBREGA, J. C. M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar,** Editora?? Onde??? p. 11-19, 2006

SIEVERT, S. M. BRINKHOFF, T. MUYZER, G. ZIEBIS, W. KUEVER, J. Spatial heterogeneity bacterial populations along an environmental gradient at a shallow submarine hydrothermal vent near Milos Island (Greece). **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p. 3834-3842, 1999.

SILVA, L. G. **Estudos da colonização em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) por *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum spp.* utilizando técnicas imunológicas**. Tese (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio Janeiro, Seropédica, RJ, 1999. **pág.**

SILVA, R. A. da. **Caracterização anatômica da interação entre bactérias diazotróficas endofíticas e plântulas de arroz (*Oryza sativa*)**, 82p., Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo), Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2001.

SILVA, M. F.; REIS V. M. Técnica de adsorção para obtenção de soro policlonal estirpe específico de bactérias diazotróficas. **Embrapa Agrobiologia**, Seropédica, 10p, 2005. (Comunicado Técnico n. 76)

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; VAN DEN BROEK, J.; VAN, M. S.; WERNARS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2284 - 2291, 2001.

SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A. K.; YADAV, R. L. Improving Sugarcane Growth and Nutrient Uptake by Inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant and Soil**, v. 47, n. 2-3, p. 155-162, 2005.

TEAKLE, D. S., APPLETON, J. M., AND STEINDL, D. R. L. An anatomical basis for resistance of sugar cane to ratoon stunting disease. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 12, p. 83–91, 1978.

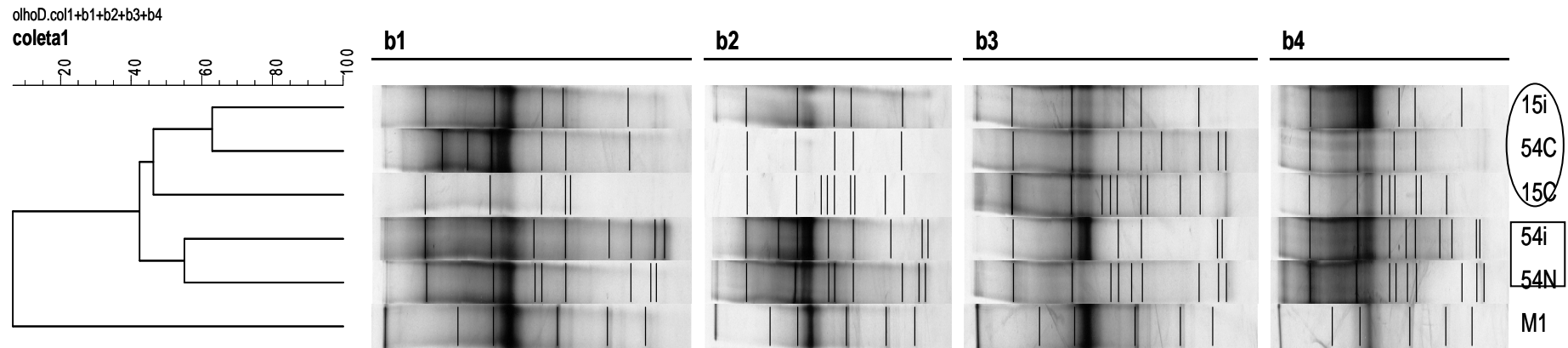
URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, p. 105-114, 1992.

ZILLI, J. E. **Avaliação do impacto de herbicidas à base de glyphosate e imazaquin na comunidade bacteriana do solo e associada às raízes de plantas de soja**. 114p. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2004.

WHITTAKER, A. BOTHA, F. C. Carbon partitioning during sucrose accumulation in sugarcane internodal tissue. **Plant Physiology**, v. 115, p. 1661-1659, 1997.

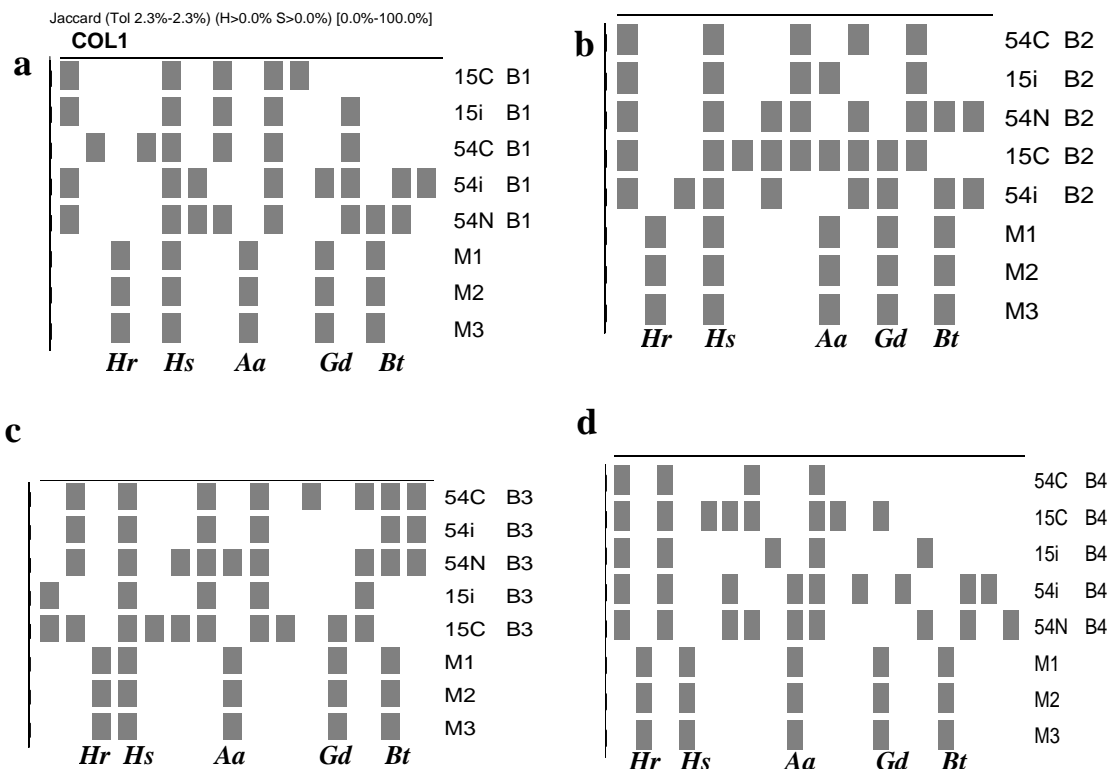
7 ANEXOS

Anexo A



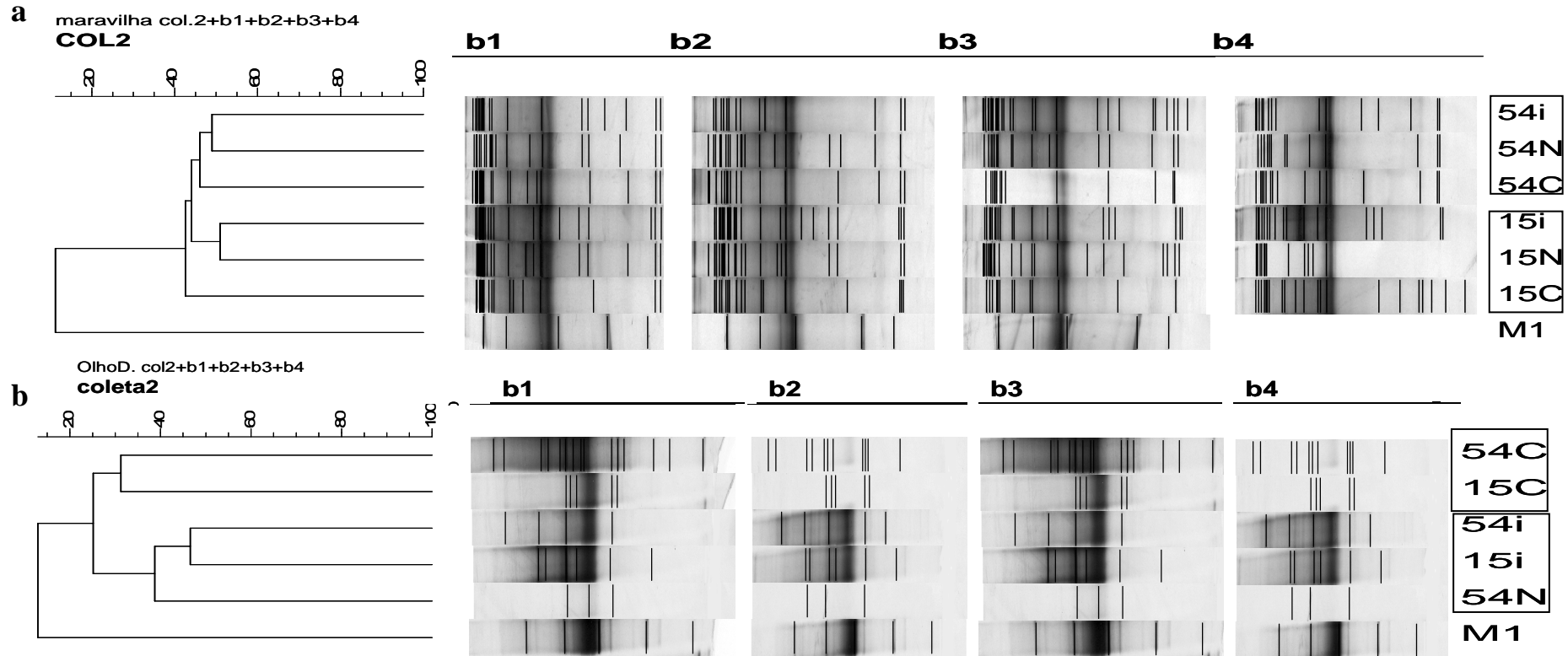
Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelCompar II, seguido do Gel de poliacrilamida em posição horizontal. 1º coleta (6 meses) do experimento II (Usina Olho d'água). Foi realizada análise de similaridade usando o Coeficiente de Jaccard $\{(Tol\ 1,3\% - 1,3\%) (H > 0\%, S > 0\%) [0\% - 100\%]\}$. 15 e 54 correspondem respectivamente às variedades utilizadas RB867515 e RB72454; N – tratamentos adubados com adubo nitrogenado; i – tratamentos inoculados; C – Controle; M – Marcadores contendo as cinco bactérias utilizadas no inoculante e utilizadas como padrão. *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *A. amazonense*, *G. diazotrophicus* e *B. tropica*. b1 – b4: blocos de 1 a 4.

Anexo B



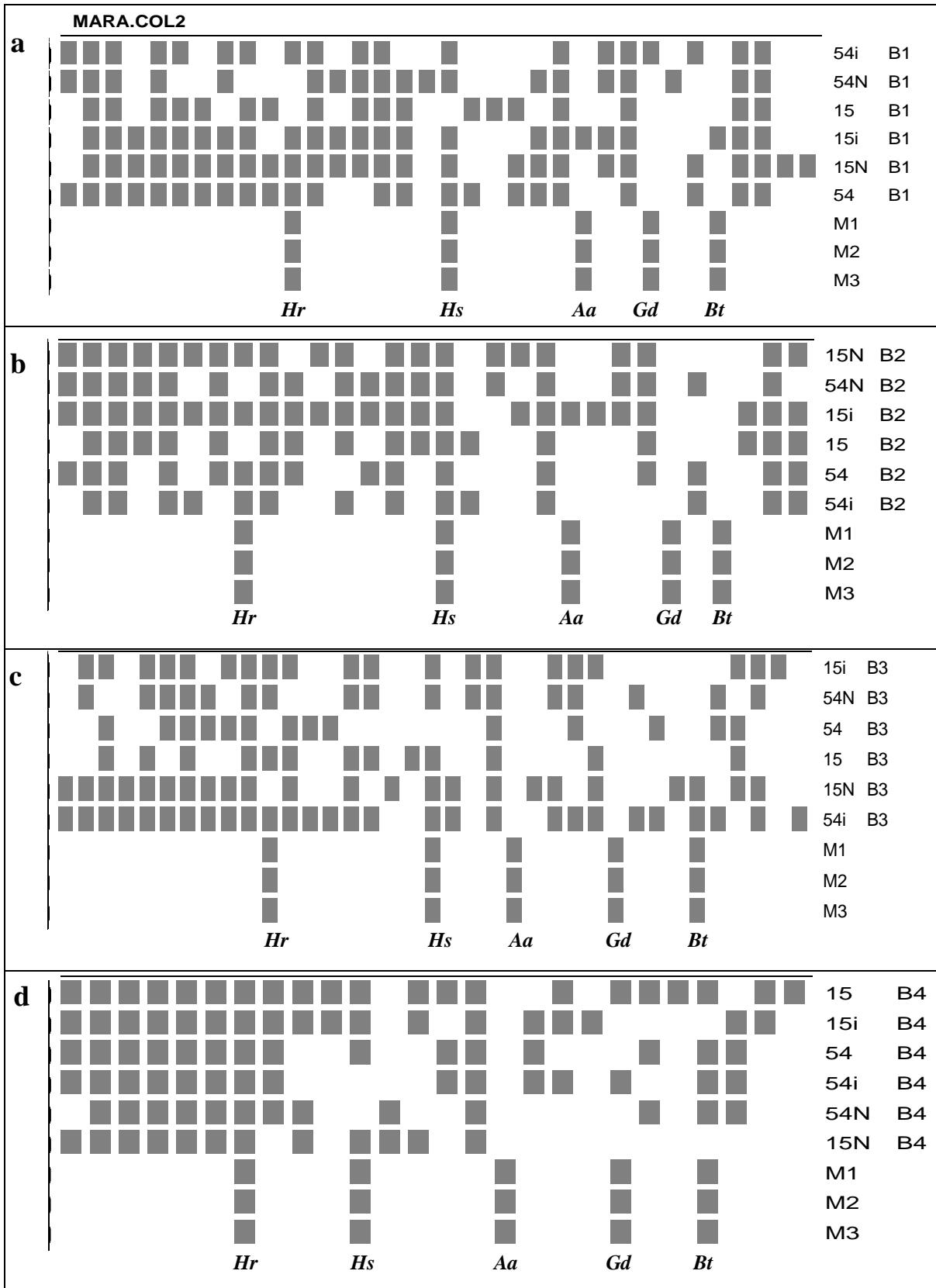
Matriz binária de ausência e presença de bandas obtidas a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelComparII. 1º coleta (6 meses) do experimento II (Usina Olho d'água). 15 e 54 correspondem respectivamente às variedades utilizadas RB867515 e RB72454; N – tratamentos adubados com adubo nitrogenado; i – tratamentos inoculados; C – Controle; M – Marcadores contendo as cinco bactérias utilizadas no inoculante e utilizadas como padrão. Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*. B1 – B4, blocos de 1 a 4.

Anexo C

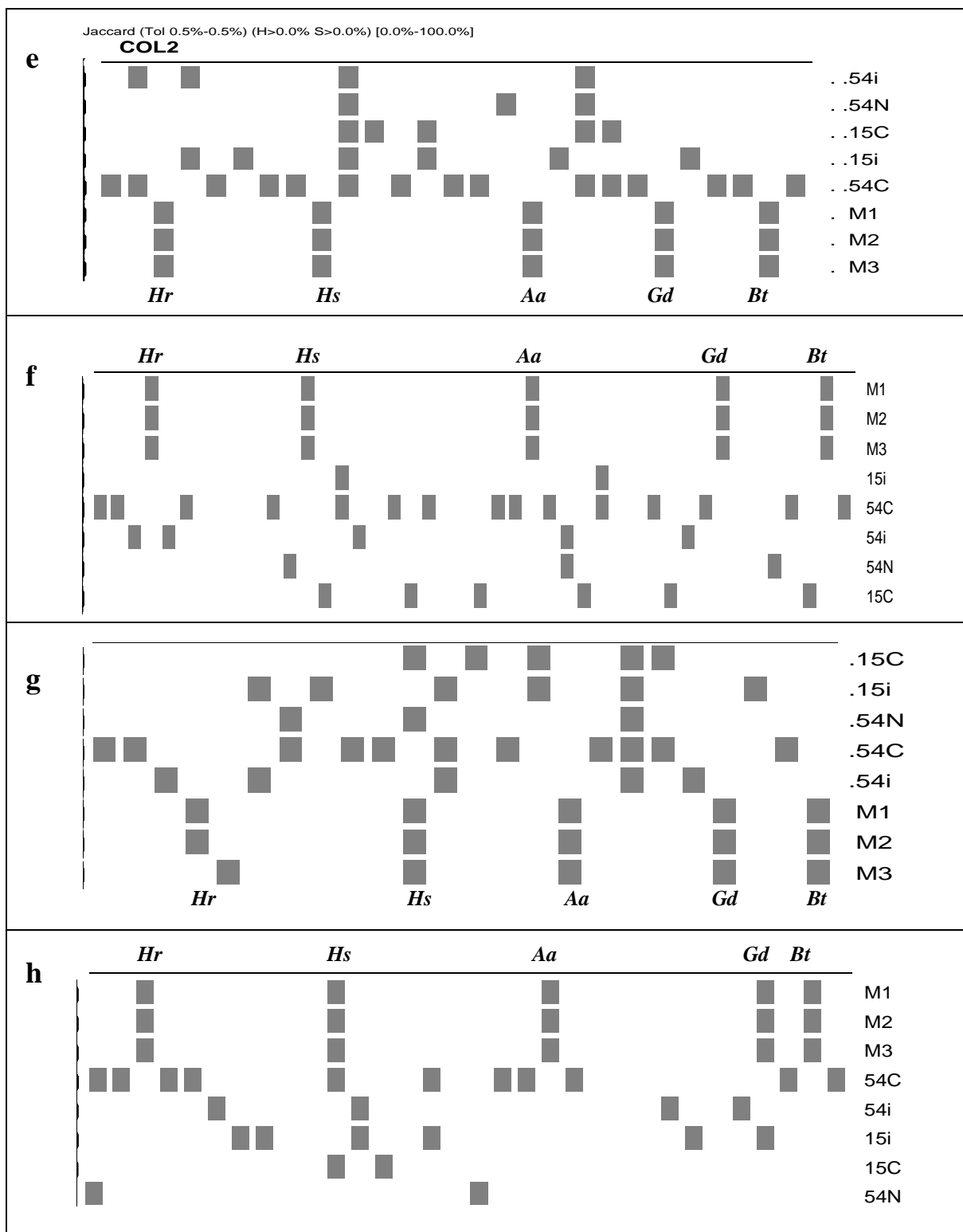


Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelCompar II, seguido do Gel de poliacrilamida em posição horizontal. 2º coleta (9 meses) Foi realizada análise de similaridade usando o Coeficiente de Jaccard $\{(Tol\ 2,7\% - 2,7\%) (H > 0\%, S > 0\%) [0\% - 100\%]\}$. 15 e 54 correspondem respectivamente às variedades utilizadas RB867515 e RB72454; N – tratamentos adubados com adubo nitrogenado; i – tratamentos inoculados; C – Controle; M1 – Marcadores contendo as cinco bactérias utilizadas no inoculante e utilizadas como padrão: *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *A. amazonense*, *G. diazotrophicus* e *B. tropica*. A – Experimento I (Usina Maravilha), B – Experimento II (Usina Olho D'Água); b1 – b4, blocos de 1 a 4.

Anexo D

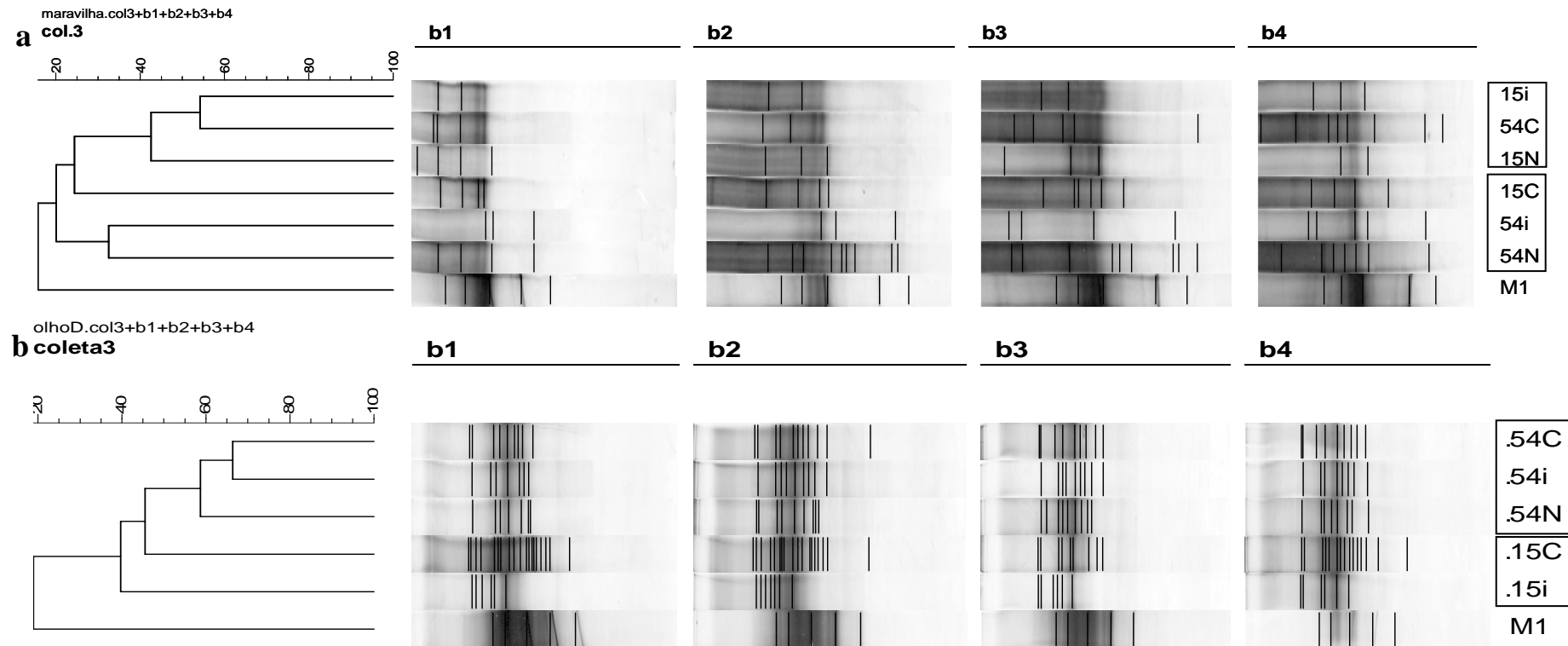


continuação



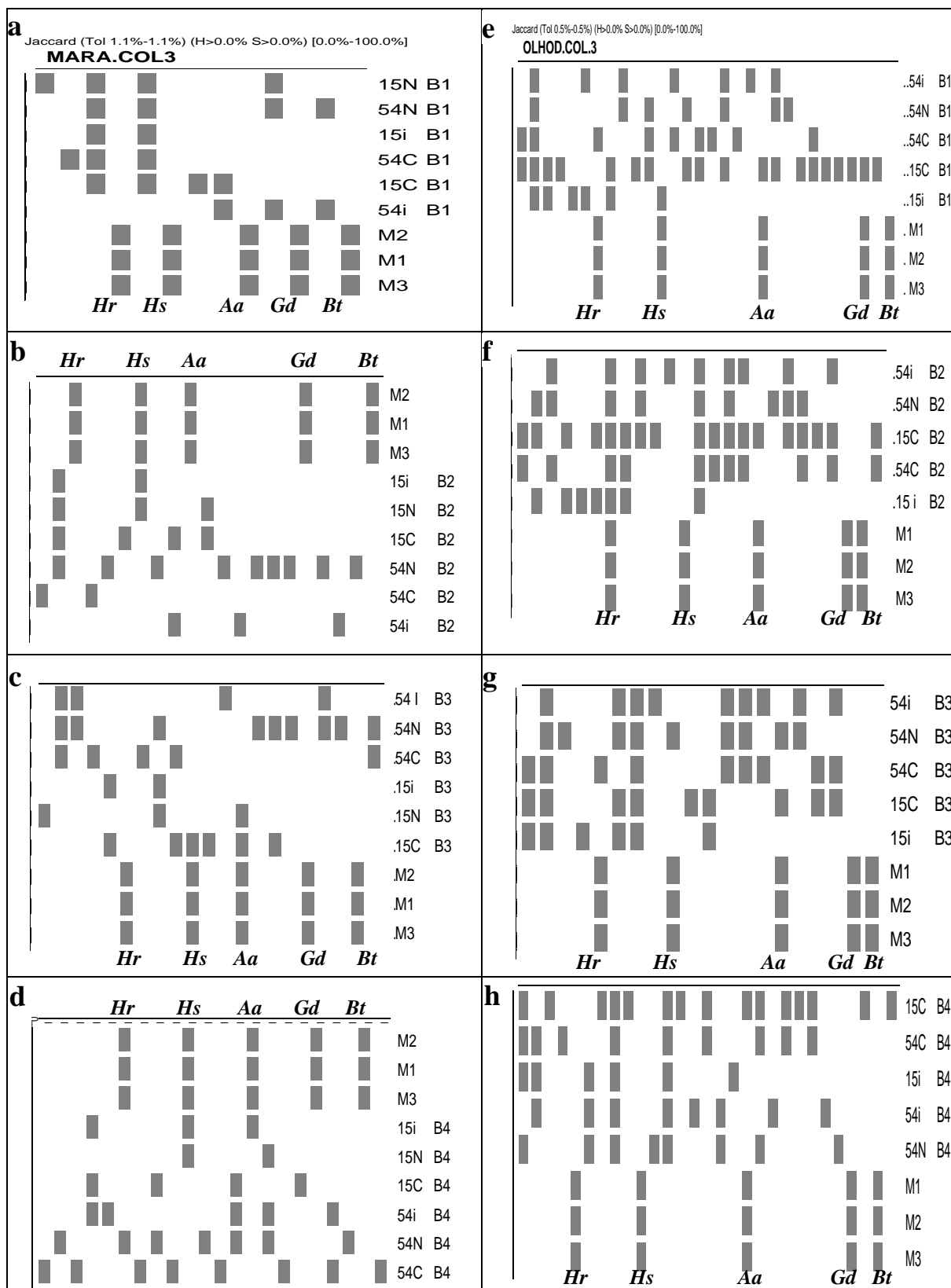
Matriz de ausência e presença de bandas dos géis de DGGE das amostras da 2ª coleta (9 meses) geradas pelo software Gelconpar2, versão3.1. 15 e 54 correspondem respectivamente às variedades RB867515 e RB72454; N – tratamentos adubados com adubo nitrogenado; i – tratamentos inoculados; C – Controle; M – Marcadores contendo as cinco bactérias utilizadas no inoculante e utilizadas como padrão. *Hr* – *H. rubrisubalbicans*, *Hs* – *H. seropedicae*, *Aa* – *A. amazonense*, *Gd* – *G. diazotrophicus* e *Bt* – *B. tropica*. A – D, experimento I (Usina Maravilha); E – H, experimento II (Usina Olho D'Água); B1 – B4, blocos de 1 a 4.

Anexo E



Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE utilizando o programa GelCompar II, seguido do Gel de poliacrilamida em posição horizontal. 3º coleta (12 meses) Foi realizada análise de similaridade usando o Coeficiente de Jaccard $\{(Tol\ 1,1\% - 1,1\%) (H > 0\%, S > 0\%) [0\% - 100\%]\}$. 15 e 54 correspondem respectivamente às variedades utilizadas RB867515 e RB72454; N – tratamentos adubados com adubo nitrogenado; i – tratamentos inoculados; C – Controle; M1 – Marcadores contendo as cinco bactérias utilizadas no inoculante e utilizadas como padrão. *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *A. amazonense*, *G. diazotrophicus* e *B. tropica*. A – D, experimento I (Usina Maravilha); E – H, experimento II (Usina Olho D'Água); b1 – b4, blocos de 1 a 4.

Anexo F



Matriz de ausência e presença de bandas dos gêis de DGGE das amostras da 3ª coleta (12 meses) geradas pelo software Gelconpar2, versão 3.1. 15 e 54 correspondem às variedades RB867515 e RB72454; N – tratamentos adubados com nitrogênio; i – tratamentos inoculados; C – Controle; M – Marcadores contendo cinco bactérias utilizadas no inoculante. Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*. A – D, experimento I (Usina Maravilha); E – H, experimento II (Usina Olho D'Água); B1 – B4, blocos de 1 a 4.