

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TALES ROMANO

INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM CANA-DE-AÇÚCAR:  
EFEITO DO NITROGÊNIO E GENÓTIPO VEGETAL

CURITIBA-PR

2016

TALES ROMANO

INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM CANA-DE-AÇÚCAR:  
EFEITO DO NITROGÊNIO E GENÓTIPO VEGETAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. João Carlos Bernaldo Filho  
Co-orientador: Dr. Daniel Renato Lammel

CURITIBA-PR

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR -  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, MARCIA CRISTINA FUCHS CRB 9 /1321  
COM OS DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Romano, Tales  
R759i Inoculação de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar: efeito do nitrogênio e genótipo vegetal / Tales Romano. - Curitiba, 2016. 74 f.: il., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal.  
Orientador: João Carlos Bespalhok Filho  
Coorientador: Daniel Renato Lammel

1. Cana-de-açúcar - Cultivo. 2. Bactérias diazotróficas. 3. Nitrogênio - Fixação. 4. Crescimento (Plantas). I. Bespalhok Filho, João Carlos. II. Lammel, Daniel Renato. III. Título. IV. Universidade Federal do Paraná.

CDU 633.61

## TERMO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL

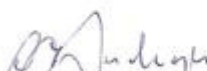


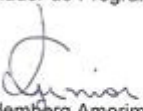
### PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pelo candidato **TALES ROMANO**, sob o título "INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM CANA-DE-AÇÚCAR: EFEITO DO NITROGÊNIO E GENÓTIPO VEGETAL", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

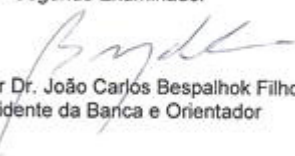
Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato são de parecer pela "APROVAÇÃO" da Dissertação.

Curitiba, 04 de Março de 2016.

  
Professor Dr. Cicero Deschamps  
Coordenador do Programa

  
Professor Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior  
Primeiro Examinador

  
Professor Dr. Daniel Renato Lammel  
Segundo Examinador

  
Professor Dr. João Carlos Bespalhok Filho  
Presidente da Banca e Orientador

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a meus pais, Aldegar e Lucilene, por me ensinarem os verdadeiros valores que um homem deve possuir. Aos meus irmãos, pelos quais tenho imensa admiração e amor Giovana, Paula e Andrei; e a Marcela, grande amor da minha vida, companheira de todas as horas, sempre prestativa e solícita, amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por colocar pessoas tão especiais em minha vida e por abrir muitas portas.

Ao programa de Pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal, em especial à Lucimara Antunes e ao Prof. Dr. Cícero Deschamps.

A todos os professores do referido programa pelos ensinamentos e conselhos, em especial os Professores do grupo da cana-de-açúcar, Professor Dr. Edelclaiton Daros, Dr. Ricardo Augusto de Oliveira, Dr. José Luís Camargo Zambom, Dra. Lucimeris Ruaro, Dr. Heroldo Weber e Dr. João Carlos Bessalho Filho.

Ao meu orientador Professor Doutor João Carlos Bessalho Filho, pelos ensinamentos e momentos de descontração.

Ao Doutor Daniel Renato Lammel, pelas contribuições e ensinamentos desde a minha inserção no programa de Pós-graduação.

Aos grandes amigos da cana Grodzki, Samantha, Cissa, Paulo, Berton, entre tantos outros que fizeram parte desses dois anos de Mestrado.

Aos colegas de pós-graduação, pela convivência e parceria.

Aos técnicos, Maria Emília, Virgínia, Carlos, Roger, por auxiliarem em diversos momentos.

A RIDESA e ao INCT - Fixação Biológica de Nitrogênio por viabilizarem a realização deste trabalho.

À CAPES pela auxílio na forma de bolsa de estudos.

Ao núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio, em especial aos Professores Fábio Pedrosa e Emanuel Maltempo.

Ao Finep pela compra dos reagentes.

Aos estagiários da RIDESA, pelo auxílio nos experimentos.

Muito obrigado!

## RESUMO

O Brasil é líder mundial em produção de cana-de-açúcar, sendo esta, responsável por abastecer o mercado interno e externo, impactando no Produto Interno Bruto brasileiro e na geração de empregos. Alternativas visando obter aumento de produtividade e sustentabilidade em plantas da família Poacea vem sendo testadas, com destaque para as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal. Dentro desta classe de microrganismos, as bactérias do gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum* vem ganhando destaque devido apresentar resultados significativos com relação a incremento de produtividade, principalmente em milho, trigo e arroz, sendo seu efeito ainda não evidenciado na cultura da cana-de-açúcar. Evidencias apontam que a adubação pode ser um fator importante quando se busca otimizar esta interação, sendo prejudicada principalmente por altas doses de nitrogênio aplicado aos cultivos. Estas bactérias possuem a capacidade de produzir compostos que aumentam o sistema radicular das plantas, conseqüentemente, aumentando a capacidade de absorção de nutrientes e minerais, bem como a resistência a fatores abióticos. No entanto a falta de evidencias em monitorar a bactéria presente nas culturas ao longo de seu ciclo tem sido buscada, uma vez que a presença em alta quantidade no interior dos tecidos vegetais ou associado as raízes é que pode garantir o efeito desejado quando se faz uso desta tecnologia. O objetivo geral do trabalho foi avaliar a resposta das cultivares micropropagadas com dois inoculantes bacterianos *Herbaspirillum seropedicae* SMR1 e *Azospirillum brasilense* FP2. No primeiro capítulo foi avaliado a resposta do cultivar RB867515 em solo agrícola com metade da adubação nitrogenada recomendada para o plantio da cana-de-açúcar, em cana planta. Obteve-se maiores ganhos de massa seca da parte aérea nos tratamentos com a presença da adubação nitrogenada e os inoculantes *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SMR1. No segundo capítulo foi verificada a promoção de crescimento nos cultivares RB867515, RB855536 e RB966928 em vasos contendo vermiculita com adição de solução nutritiva sem nitrogênio. Observou-se relação entre o inoculante e o cultivar para o ganho de massa de matéria seca da parte aérea e de raiz, com destaque para RB867515. Novos estudos com o RB966928 precisam ser refeitos para verificar a responsividade deste cultivar a inoculantes bacterianos.

**Palavras-chave:** Nitrogênio. ambiente competitivo. *Azospirillum brasilense* FP2. *Herbaspirillum seropedicae* SMR1.

## ABSTRACT

Brazil is the world leader in sugarcane production, which is responsible for supplying the domestic and foreign markets, impacting on the Brazilian Gross Domestic Product and jobs creation. Alternatives aiming to increase productivity and sustainability in plants of the Poacea family have been tested, with emphasis on plant growth promoting rhizobacteria (PGPB). Within this class of microorganisms, the bacteria of the genus *Azospirillum* and *Herbaspirillum* have been gaining prominence due to the significant results in relation to productivity increase, especially in maize, wheat and rice, and its effect is not yet evident in the sugarcane crop. Evidences show that fertilization can be an important factor when optimizing this interaction, being affected mainly by high doses of nitrogen applied to crops. These bacteria have the ability to produce compounds that increase the root system of plants, consequently increasing the capacity of absorption of nutrients and minerals, as well as resistance to abiotic factors. However, the lack of evidence to monitor the bacteria present in crops throughout their cycle has been sought, since the presence in high quantity in the interior of the plant tissues or associated with the roots is that can guarantee the desired effect when making use this technology. The general objective of this work was to evaluate the response of the sugarcane micropropagated cultivars with two bacterial inoculants *Herbaspirillum seropedicae* SMR1 and *Azospirillum brasilense* FP2. In the first chapter the response of cultivar RB867515 was evaluated in agricultural soil with half of the nitrogen fertilization recommended for the sugarcane plant (first cycle). An increase in aerial dry mass was observed in treatments with the presence of nitrogen fertilization and the inoculants *A. brasilense* FP2 and *H. seropedicae* SMR1. In the second chapter it was verified the plant growth promotion in cultivars RB867515, RB855536 and RB966928 in pots containing vermiculite with addition of nutrient solution without nitrogen. The relationship between inoculant and cultivar was observed for aerial shoot and root dry matter gain, with emphasis on RB867515. New studies with RB966928 need to be redone to verify the responsiveness of this cultivar to bacterial inoculants.

**Key words:** Nitrogen. Competitive environment. *Azospirillum brasilense* FP2. *Herbaspirillum seropedicae* SMR1.



## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Aplicação de fertilizantes nitrogenados em 2008. Fonte: RICE, et al., (2012).....	13
<b>FIGURA 2:</b> Modelo de interação plantas, bactérias e fungos. Fonte: Hardoim, et al., 2015. ....	14
<b>FIGURA 3:</b> Representação gráfica da adesão no sistema radicular e colonização dos tecidos foliares e caules por <i>H. seropedicae</i> (pontos vermelhos) em plantas arroz. Fonte: Monteiro, et al., (2012). ....	22
<b>FIGURA 4:</b> Diluições seriais para contagem no número de unidades formadoras de colônias de <i>H. seropedicae</i> SMR1 pelo método da microgota. ....	35
<b>FIGURA 5:</b> Diluição seriada para obtenção da curva padrão de raízes estéreis do cultivar RB867515 de cana-de-açúcar para quantificação em PCR tempo real.....	36
<b>FIGURA 6:</b> Massa seca da parte aérea ao longo de 60 dias para o cultivar RB867515 em relação aos inoculantes <i>A. brasilense</i> FP2, <i>H. seropedicae</i> SMR1, controle e presença de adubação nitrogenada. DAI: dias após a inoculação, MSPA: matéria seca da parte aérea. ....	40
<b>FIGURA 7:</b> Produção de matéria seca sob efeito da adição de nitrogênio mineral (CN e SN) em interação com bactérias promotoras de crescimento vegetal ( <i>A. brasilense</i> FP2, <i>H. seropedicae</i> SMR1 e controle) e o cultivar RB867515 oriundo de cultura de tecidos via cultura de meristemas aos 60 dias. CN: plantas adubadas com nitrogênio; SN: plantas sem fonte de nitrogênio; MSPA: matéria seca da parte aérea.....	41
<b>FIGURA 8:</b> Monitoramento da produção de matéria seca da parte aérea ao longo de 60 dias em interação com os inoculantes bacterianos <i>H. seropedicae</i> SMR1, <i>A. brasilense</i> FP2 e controle. MSPA matéria seca da parte aérea. ....	42
<b>FIGURA 9:</b> Curva padrão de diluição para quantificação de DNA bacteriano pela PCR quantitativa. ....	42
<b>FIGURA 10:</b> Gráfico da curva de melting para determinação da funcionalidade e especificidade do primer AzoR2.1 utilizado na PCR em tempo real. ....	43
<b>FIGURA 11:</b> Relação da matéria seca da parte aérea e a quantificação de DNA de <i>A. brasilense</i> FP2 por PCR quantitativa aos 60 DAI em cana-de-açúcar. ....	44
<b>FIGURA 12:</b> Relação da massa de matéria seca da parte aérea e a contagem de <i>A. brasilense</i> FP2 pelo método da microgota aos 60 DAI em cana-de-açúcar.....	44
<b>FIGURA 13:</b> Produção de matéria seca parte aérea indica comportamento dos cultivares de cana-de-açúcar RB867515, RB855156 e RB966928 em relação aos	

inoculantes bacterianos ( <i>A. brasilense</i> FP2 e <i>H. seropedicae</i> SMR1 e controle).	
MSPA: massa seca da parte aérea aos 60. ....	58
<b>FIGURA 14:</b> Produção de matéria seca parte aérea indica comportamento dos cultivares de cana-de-açúcar RB867515, RB855156 e RB966928 em relação aos inoculantes bacterianos ( <i>A. brasilense</i> FP2 e <i>H. seropedicae</i> SMR1). MST: massa seca total aos 60 dias.....	59

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Concentração de DNA das amostras utilizadas na PCR quantitativa.....	37
TABELA 2: Tabela da análise de variância (ANOVA). .....	38
TABELA 3: Efeito da dose de nitrogênio na obtenção da massa de matéria seca da parte aérea avaliado pelo teste F da análise de variância a 5% de probabilidade. ...	38
TABELA 4: Teste F da análise de variância para a interação do tratamento tempo com a dose de nitrogênio.....	38
TABELA 5: Desdobramento da interação entre os fatores avaliados pelo teste F da análise de variância a 5% de probabilidade. ....	39
TABELA 6: Análise de variância da massa de matéria seca da parte aérea para os cultivares RB867515, RB855156 e RB966928.....	55
TABELA 7: Análise de variância da massa seca da parte aérea para os fatores cultivar, inoculante e sua interação.....	56
TABELA 8: Efeito da interação do inoculante para obtenção da massa de matéria seca da parte aérea obtidos pelo teste F da análise de variância. ....	56
TABELA 9: Comparação de médias para a variável massa de matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz e matéria seca total em relação ao fator cultivar.....	56
TABELA 10: Avaliação dos fatores inoculante e cultivar e a interação para obtenção da massa seca de raiz. ....	57
TABELA 11: Análise de variância em fatorial dos fatores inoculante e cultivar e sua interação para massa seca total.....	57
TABELA 12: Efeito do inoculante nos cultivares para obtenção da matéria seca total. ....	57
TABELA 13: Análise de variância em fatorial dos cultivares em relação aos inoculantes. ....	58

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
2.1 Cana de açúcar .....	12
2.2 Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) .....	14
2.3 Mecanismos diretos na promoção de crescimento .....	16
2.3.1 Fixação de nitrogênio .....	16
2.3.2 Solubilização de compostos minerais.....	17
2.3.3 Produção de fitohormônios.....	18
2.4 Mecanismos indiretos na promoção de crescimento vegetal .....	19
2.4.1 Indução de resistência sistêmica.....	19
2.4.2 Produção de sideróforos .....	20
2.5 <i>Azospirillum brasilense</i> .....	20
2.6 <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	21
2.7 Técnicas utilizadas na detecção de organismos microbianos .....	22
<b>2.8 REFERÊNCIAS</b> .....	25
<b>Capítulo 1: Inoculação de <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SMR1 no cultivar de cana-de-açúcar RB867515.</b> .....	30
<b>3 INTRODUÇÃO</b> .....	32
<b>3.1 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1.1 Delineamento experimental.....	33
3.1.2 Material vegetal .....	33
3.1.3 Preparo do inoculante e inoculação .....	34
3.1.4 Monitoramento bacteriano.....	35
3.1.5 PCR quantitativa (qPCR).....	36
3.1.6 Análise estatística .....	37
<b>3.2. RESULTADOS</b> .....	38
<b>3.3 DISCUSSÃO</b> .....	45

<b>3.4 CONCLUSÃO</b> .....	47
<b>3.5 REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>Capítulo 2: Promoção de crescimento em cultivares micropropagadas de cana-de-açúcar frente a inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> FP2 e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SMR1.</b> .....	50
<b>RESUMO</b> .....	50
<b>4 INTRODUÇÃO</b> .....	52
<b>4.1 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	53
4.1.1 Material vegetal .....	53
4.1.2 Preparo do inoculante e inoculação .....	54
<b>4.2 RESULTADOS</b> .....	55
4.2.1 Massa seca da parte aérea .....	55
4.2.2 Massa seca de raiz .....	57
<b>4.3 DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>4.4 CONCLUSÃO</b> .....	63
<b>4.5 CONCLUSÕES GERAIS</b> .....	64
<b>4.6 REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, porém, quando se leva em consideração a produtividade por hectare, países como a Austrália e a Colômbia apresentam melhores resultados. Diversos fatores contribuem para a alta produtividade da cultura, como a escolha correta das cultivares, tendo em vista a diversidade encontrada nos ambientes de produção brasileiros, bem como tecnologias que visam impactar positivamente na obtenção de melhores rendimentos da cultura.

O nitrogênio na cadeia produtiva da cana-de-açúcar, assim como para outras culturas, é essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas visto que é constituinte de aminoácidos, proteínas e clorofila (MALAVOLTA, 1981; TAIZ E ZEIGER, 2006). A principal via de disponibilização do nitrogênio para as plantas é feita sob a forma de adubação mineral, fixado por processo industrial contribuindo para a emissão de gases do efeito estufa. A fixação do nitrogênio é possível após a quebra da ligação tripla entre os átomos do gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) que acontece sob altas temperaturas e pressão. Necessitando de elevadas quantidades de combustíveis fósseis em sua cadeia produtiva. O aumento da contribuição da fixação biológica na cultura da cana-de-açúcar ajudaria as políticas que visam a diminuição da emissão de gases, devido aos danos ambientais que causam (IFA, 2000).

A adubação nitrogenada também tem efeitos indiretos na sustentabilidade do ambiente. A baixa capacidade de absorção no nitrogênio pelas plantas (ERISMAN, 2016) faz com que o nitrogênio aplicado ao solo em excesso seja lixiviado ocasionando a eutrofização de lagos, rios e lençóis freáticos. A adição de elevadas doses de adubos nitrogenados nas culturas impacta de forma negativa a microbiota do solo. Aumentando a liberação de gases responsáveis pelo efeito estufa em sua cadeia produtiva, ou pela liberação de óxido nitroso pelo excesso aplicado no solo.

Uma forma de mitigar os efeitos da adubação nitrogenada é utilizar a fixação biológica como fonte de parte do nitrogênio requisitado pela planta. A utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal e que fixam nitrogênio vem ganhando destaque no cenário nacional e internacional, visto a capacidade que estas apresentam de fornecer, de diversos modos, mecanismos para o desenvolvimento das plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a promoção de crescimento pelas bactérias *Azospirillum brasilense* FP2 e *Herbaspirillum seropedicae* SMR1 nas cultivares de cana-de-açúcar RB855156, RB867515 e RB966928.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cana de açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente à família Poacea com importância mundial, sendo cultivada principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, sendo considerado o sudeste da Ásia sua região de origem (MIRANDA et al. 2008). As cultivares de cana-de-açúcar utilizadas comercialmente no Brasil são híbridos clonais interespecíficos, oriundas de cruzamentos e da seleção da característica de rusticidade das espécies de *Saccharum spontaneum* e do acúmulo de grande quantidade de açúcar de *S. officinarum* (PEDROZO et al., 2008).

Atualmente, as variedades utilizadas para melhoramento e seleção de novos materiais são obtidas de cruzamento feitos a partir de cana-de-açúcar chamadas de canas nobres, por apresentarem altos teores de sacarose nos colmos. O processo de seleção utilizado pelos programas de melhoramento genético brasileiro é derivado de cruzamentos iniciais que foram feitos com as espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*, seguidos, ou não, de retrocruzamentos para obtenção de novos clones. A diferença cromossômica existente entre as espécies utilizadas para obtenção dos novos clones permite um alto nível de ploidia e aneuploidia entre as cultivares (BLACKBURN, 1984; JANOO, et al., 1999).

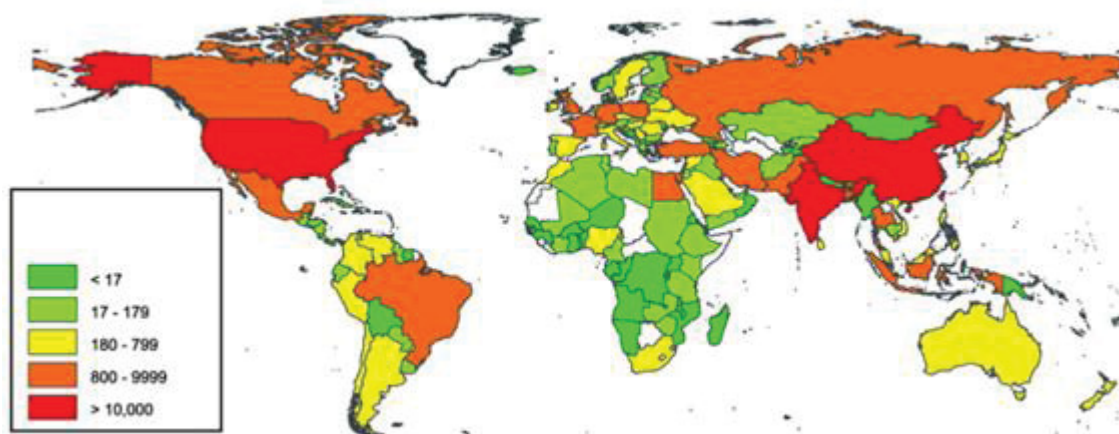
A cultura se destaca mundialmente por ser uma das melhores opções dentre as fontes de energias renováveis e com discutível papel social, já que no seu cultivo e processo, gera diversos empregos diretos e indiretos. Em 2010, o setor gerou no país cerca de 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos (NEVES e CONEJERO 2010).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e de acordo com dados da Companhia Nacional do Abastecimento (CONAB, 2015). No balanço da última safra o estado de São Paulo liderava o ranking como o maior produtor, seguido por Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Paraná, que está em quinto colocado com uma área estimada em 6,8% da área total.

A cultura instalou-se no Brasil graças a programas de incentivo à produção de açúcar e ganhou ainda mais força para a produção de etanol frente à crise que o mundo passava por conta da quebra do valor do barril de petróleo. Foi criado então, na década 1970, o Programa Nacional do Alcool, chamado de PROALCOOL seguido da adoção de etanol à gasolina, que atualmente está em 27%. Com a tecnologia *flex*

*fuel* dos carros, o setor sucroalcooleiro brasileiro ganhou impulso para alavancar a produtividade e expandir os canaviais.

A produtividade da cultura da cana-de-açúcar no Brasil é menor quando comparada a países como a Colômbia e Austrália. Diversos fatores devem ser levados em consideração quando se busca aumentar os níveis de produtividade da cultura, dentre eles o uso de fertilizantes minerais, escolha dos cultivares adequados para cada ambiente de produção e a adoção e utilização de novas tecnologias de plantio, colheita e processamento industrial. A nutrição mineral é um dos principais quesitos para buscar aumento de produtividade e longevidade dos canaviais, bem como possui relação direta com a escolha correta do genótipo em interação com o ambiente de produção. A adubação nitrogenada é um dos componentes que está relacionado diretamente a produtividade da cultura. No Brasil a utilização do nitrogênio ainda é reduzida quando comparada a outros países produtores de cana-de-açúcar. O Brasil tem um consumo na faixa de 800 a 9999 toneladas sendo inferior aos Estados Unidos da América, China e Índia (Figura 1).



**FIGURA 1:** Aplicação de fertilizantes nitrogenados em 2008. Fonte: RICE, et al., (2012).

No cultivo cana-de-açúcar no Brasil são utilizadas doses de nitrogênio entre 30 e 60 Kg ha<sup>-1</sup> para cana-planta e entre 60 e 120 Kg ha<sup>-1</sup> para cana soca, sendo que em outros países esses valores podem ser até 100% maiores, sem, no entanto, aumentar a produtividade da cultura (CANTARELLA et al. 2007). O nitrogênio é um dos componentes minerais mais importantes para as plantas e principalmente para a família Poacea, como cana-de-açúcar, milho, sorgo que apresentam rápido crescimento (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A importância desse elemento se dá por

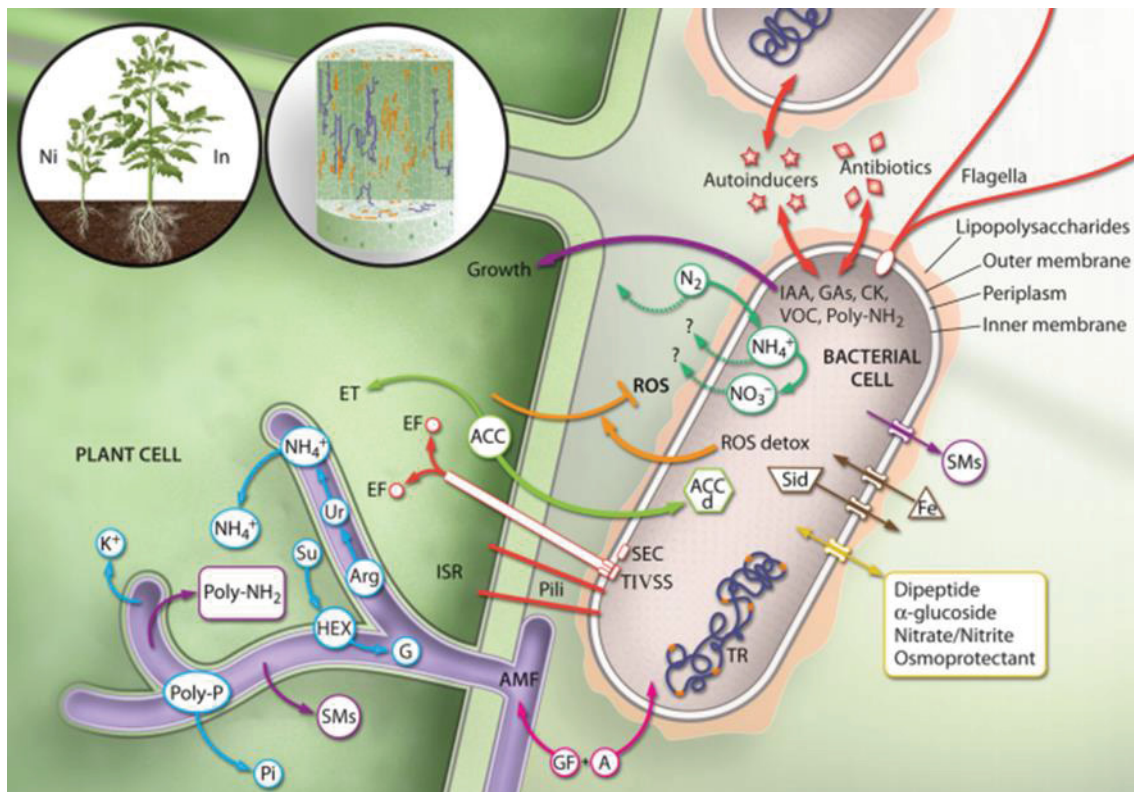


sua presença em aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, coenzimas e amidas que são essenciais no desenvolvimento das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2002).

A aplicação de nitrogênio via adubação mineral é um custo para o sistema produtivo que é agravado pelo uso ineficiente do nitrogênio pelas plantas e as perdas por lixiviação. O uso de bactérias na cultura que fixam nitrogênio e atuam como promotoras de crescimento vegetal (BPCV) surge como alternativa para redução de custos com consequente ganho de mercado e apresentando ganhos relacionados a sustentabilidade vem ganhando destaque.

## 2.2 Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV)

A rizosfera é a região próxima às raízes das plantas que por meio da produção e liberação de fotoassimilados (exsudatos) é responsável por suprimir ou estimular a microbiota local e ou favorecer determinado grupo de microrganismos (MIHALACHE et al., 2015). Um modelo clássico, proposto por Hiltner 1904, classifica como rizosfera a região que situa, aproximadamente, entre 1 a 3 milímetros (mm), podendo chegar até 5 mm no entorno das raízes e é nela onde há maior incidência de microrganismos de diferentes grupos, como bactérias, actinomicetos e fungos (Figura 2).



**FIGURA 2:** Modelo de interação plantas, bactérias e fungos. Fonte: Hardoim, et al., 2015.

As classes de microrganismos encontradas habitualmente no solo são em grande parte pertencentes aos reinos *Fungi* e *Bacteria* (SILVEIRA, 2008; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). O reino *Bacteria* é mais conhecido e que apresenta papel importante na promoção de crescimento vegetal (MIHALACHE et al., 2015; VRIEZE, 2015; SAHARAN e NEHRA 2011; e HAYAT et al., 2010). A diversidade no solo é tamanha que o tipo de interação pode ser variado, sendo que fatores como defesa da planta, mobilidade e capacidade de infecção bacteriana fatores importantes para a colonização, podendo esta ocorrer de forma benéfica, neutra ou deletéria. Um exemplo de interação deletéria e é a interação da bactéria *Herbaspirillum rubrisubalbicans* com o cultivar de cana-de-açúcar B4362 ocorrendo a doença estria mosqueada (OLIVARES et al., 1997).

No Brasil estudos relacionados a interação das bactérias com o sistema radicular das plantas iniciou-se com a pesquisadora Johanna Dobereiner na década de 70 na Embrapa Agrobiologia em Seropédica no Rio de Janeiro. O termo rizobactérias promotoras de crescimento de plantas foi adotado da tradução livre do inglês. No entanto, o termo modificou-se, chamado atualmente de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV).

A primeira bactéria descoberta no Brasil foi isolada de solos ácidos da baixada fluminense e identificada como *Azotobacter* por possuir capacidade de fixar nitrogênio (DOBEREINER 1966). A partir dessa descoberta abriram-se os horizontes brasileiros para estudos relacionando bactérias promotoras de crescimento e plantas, ao passo que ainda na mesma década foi isolada a primeira bactéria na cultura da cana-de-açúcar, chamada de *Beijerinckia fluminensis* (DOBEREINER e RUSCHEL, 1958).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal atuam de forma benéfica e possuem diferentes modos de promoção de crescimento atuando de forma direta ou indireta. Os mecanismos diretos responsáveis pela promoção de crescimento são fixação de nitrogênio atmosférico, solubilização de fosfatos e produção de fitohormônios. Os modos indiretos de promoção de crescimento vegetal são produção de sideróforos, antibióticos, competição por nutrientes, produção de enzimas quitinase, celulose e  $\beta$ -1,3 glucanase, protease ou lipases, indução de resistência sistêmica e aumento de resistência a fatores abióticos (MIHALACHE et al., 2015).

## 2.3 Mecanismos diretos na promoção de crescimento

### 2.3.1 Fixação de nitrogênio

O nitrogênio ( $N_2$ ) é o elemento mais abundante na atmosfera (78%) e apresenta papel fundamental no desenvolvimento das plantas, porém, na forma encontrada na atmosfera é indisponível para as plantas e algumas espécies de microrganismos (Moreira e Siqueira, 2006). A forma mais utilizada para suprir a demanda de nitrogênio necessária para o desenvolvimento das plantas é feita pela adição de fertilizantes, composto, principalmente de nitrogênio, fósforo e potássio. O nitrogênio é elemento mais caro dentre os macronutrientes frequentemente utilizados nos fertilizantes (MALAVOLTA, 1981).

A fixação do nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) na forma de fertilizante requer um processo industrial. O processo utilizado para síntese de amônia foi idealizado por Fritz Haber em 1908 que propôs um modelo em pequena escala que utiliza altas pressões e temperaturas (ERISMAN et al., 2008). Em 1913 ao se associar com Carl Bosch foi possível a ampliação para escala industrial, fato que revolucionou o século e conferiu aos autores o prêmio Nobel em 1931. A síntese da amônia apresenta como característica a alta demanda energética que associado a utilização de derivados de petróleo contribuem para a liberação de gases responsáveis pelo efeito estufa.

A síntese industrial de amônia permitiu uma maior disponibilidade de adubos nitrogenado aumentando a produção das culturas. No entanto a capacidade de captação pelas plantas do nitrogênio fornecido via fertilização é em torno de 40%, sendo que o restante desse montante pode ser lixiviado, poluindo lençóis freáticos; e sofrer volatilização. Uma alternativa para reduzir os danos ambientais causados tanto pela produção dos fertilizantes quanto pelo excesso aplicado no solo e fixação biológica de nitrogênio. Estima-se que a fixação biológica seja responsável por contribuir com mais que o dobro do que é fornecido via fertilizantes minerais (URQUIAGA et al. 1992).

As bactérias diazotróficas por diversos modos possuem a capacidade de suprir em partes a demanda de nitrogênio que as plantas necessitam (RAYMOND et al. 2005). A capacidade de disponibilizar o nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis pelas plantas é devido a presença de um complexo enzimático, presente principalmente em bactérias, chamado de complexo da nitrogenase. Esse complexo é responsável por catalisar a reação de redução do  $N_2$  atmosférico, transformando-o

em amônia, que é assimilável pelas plantas (BREDEMEIER e MUNDSTOCK, 2000). No entanto, o complexo enzimático é sensível a presença de oxigênio, resultando na baixa eficiência deste em disponibilizar nitrogênio para as plantas (REIS e TEIXEIRA, 2006).

### 2.3.2 Solubilização de compostos minerais

O fósforo é o composto mineral requerido em maior quantidade pelas plantas para o crescimento e desenvolvimento (EHRLICH, 1990), podendo ser encontrado na forma orgânica e inorgânica no solo (KUHAD et al., 2004). A exemplo do que acontece com o nitrogênio, boa parte do fósforo fornecido via adubação mineral é perdido ou ficam retidos nas partículas do solo tornando-se indisponível para as plantas.

As perdas relacionadas a adição de fósforo apresentam maior destaque quando são lixiviados ou carregados por erosão entrando em contato com a água, causando a eutrofização destes ambientes, culminando na promoção do crescimento de algas e, conseqüentemente, reduzindo a qualidade das mesmas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Agravando problemas das perdas, o nutriente tem sua oferta limitada por ser extraído de fontes minerais. Estimativas de que as fontes de fósforo vão se esgotar nos próximos 80 a 100 anos fazem com que se busquem alternativas para o fornecimento ou utilização mais eficiente.

O aumento da eficiência do uso do fósforo poderia acontecer pela maior disponibilização do fósforo acumulado nos solos. A microbiota presente no solo é capaz de solubilizar o fósforo tornando-o disponível para as plantas. A estratégia permitiria sustentar a produção agrícola mundial por cerca de 100 anos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A disponibilização dos fosfatos orgânicos e inorgânicos, indisponíveis para as plantas, poderia acontecer pela acidificação da região da rizosfera por microrganismos. A forma assimilável do fósforo ( $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$  e  $\text{HPO}_4^{-2}$ ) é dependente do pH e do tipo do solo (HAYAT, 2010). Alguns mecanismos de acidificação são a secreção de ácidos ou prótons e reações orgânicas e de trocas (HAMEEDA et al. (2008); RICHARDSON et al., 2009 e HAYAT, (2010). As bactérias que apresentam capacidade de solubilizar fósforo com maior eficiência são *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Serratia* (BHATTACHARYYA e JHA, 2012).

### 2.3.3 Produção de fitohormônios

Os hormônios vegetais responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas são divididos em cinco classes: auxinas, giberelinas, citocinina etileno e ácido abscísico. As classes de hormônios produzidas pelas bactérias promotoras do crescimento de plantas são auxinas, citocininas, etileno e giberelina (HAYAT, 2010). Os hormônios apresentam função secundária e regulam os mecanismos de resistência a fatores abióticos, indução ou supressão de genes para síntese de enzimas, metabólitos e pigmentos (TSAVKELOVA et al., 2006).

As auxinas atuam na divisão, extensão e diferenciação celular, desenvolvimento de raízes e iniciação do desenvolvimento de raízes laterais, respostas a luminosidade e aumento de resistência a estresses ambientais, (TAIZ e ZEIGER, 2006). Também é o fitohormônio mais relatado na literatura produzidos por bactérias promotoras de crescimento vegetal (PEREIRA et al., 2014) como por exemplo as bactérias *Azospirillum* spp., *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas* spp. e *Herbaspirillum seropedicae* (HOLGUIN et al., 1999; BABALOLA et al., 2010; MONTEIRO et al., 2012).

As giberelinas são a maior classe de fitohormônios sintetizadas entre plantas, fungos e bactérias, sendo que as plantas produzem 136, os fungos 28 e as bactérias 4 formas de giberelinas (MIHALACHE et al., 2015). Assim como as auxinas, as giberelinas possuem diversos papéis nas plantas, dentre eles a quebra de dormência de sementes, crescimento de caules e folhas, crescimento de raízes e de raízes laterais, entre outros (TAIZ e ZEIGER, 2006). As giberelinas apesar de serem metabólitos secundários das bactérias e fungos, apresentam importante papel como fator de sinalização para as plantas na interação com microrganismos (BOTTINI et al. 2004).

As primeiras bactérias descritas com a habilidade de produzir o hormônio giberelina foram *Azospirillum brasilense* (TIEN et al., 1979) e *Rhizobium japonicum* (WILLIAMS e SICARDI de MALLORCA, 1982). Desde então tem-se descoberto novos gêneros de microrganismos que também possuem a habilidade de produzir essa classe de hormônios (MIHALACHE et al., 2015).

A citocinina é outra classe de hormônio responsável pelo crescimento diferencial das plantas. O primeiro gene responsável pela produção de citocinina foi descrito em *Agrobacterium tumefaciens* (NESTER et al. 1984), sendo também encontrado em *Azospirillum* (TSAVKELOVA et al., 2006).

O etileno é o hormônio vegetal envolvido em processos de maturação, abscisão foliar, sendo que é geralmente produzido sob condições ambientais desfavoráveis como seca, altas temperaturas, estresse salino, entre outros (TAIZ e ZEIGER, 2006). Em altas concentrações é responsável por limitar o crescimento das plantas, porém, em baixas concentrações é estimulante do crescimento (PIERIK et al., 2006). A co-inoculação de bactérias como *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* pode reduzir os efeitos inibitórios de crescimento que é provocado por altas concentrações desse fitohormônio no interior dos tecidos (FELICI et al., 2008). A redução do efeito acontece através da degradação de seu precursor imediato da síntese do etileno pela enzima ACC deaminase, diminuindo o nível do hormônio, e conseqüentemente, favorecendo a promoção de crescimento.

## 2.4 Mecanismos indiretos na promoção de crescimento vegetal

### 2.4.1 Indução de resistência sistêmica

A indução de resistência sistêmica é uma via de prevenção de ataque de patógenos as plantas. São, primeiramente, desencadeadas respostas fisiológicas, no qual a planta produz espécies reativas de oxigênio no local do ataque, como uma forma primária de combate ao patógeno e, em seguida, sinaliza para a síntese de genes que sintetizam proteínas que além de possuírem função no local da infecção, são distribuídas ao longo de toda planta, chamada assim de resistência sistêmica induzida (ZAMIOUDIS et al., 2013). Esse termo foi alterando-se ao longo do tempo, sendo que em 1933, em uma das primeiras descrições, era chamado de imunidade fisiológica adquirida (RYAL et al., 1994).

Duas rotas hormonais estão ligadas a indução de resistência sistêmica nas plantas promovido pelas BPCV, a dos jasmonatos e do etileno (MITTER et al. 2013). No entanto, há outros hormônios responsáveis pelo desencadeamento de resistência sistêmica nas plantas, como ácido abscísico, auxinas, citocininas, brassinoesteróides e giberelinas, revelando que há uma grande relação entre esses hormônios e a indução de resistência sistêmica nas plantas (PIETERSE et al., 2009). A presença das BPCV pode influenciar rotas hormonais que apresentam função no desenvolvimento das plantas, sendo esta uma forma de supressão do patógeno (MITTER et al. 2013).

#### 2.4.2 Produção de sideróforos

As bactérias desenvolveram a habilidade de sobrevivência em solos com baixa concentração de ferro devido a capacidade de produção de sideróforos. Os sideróforos são pequenos peptídeos não ribossomais produzidos quando em baixas concentrações de ferro no solo (TAILOR e JOSHI, 2012). Fatores como disponibilidade de nutrientes (nitrogênio, fósforo e carbono), pH, teor e forma dos íons férricos influenciam a produção dos sideróforos pelas bactérias (MIHALACHE, 2015), sendo sua produção estimulada por  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e aminoácidos, obtendo melhores rendimentos com ureia (SAHARAN e NEHRA, 2011).

A forma mais frequente de íons férricos encontrados no solo é  $\text{Fe}^{+3}$ , sendo que a forma absorvida pelas plantas é a mais reduzida,  $\text{Fe}^{+2}$  (VASSEY, 2003). Há duas estratégias para absorção de ferro pelas plantas, uma estratégia das monocotiledôneas e outra das dicotiledôneas. As dicotiledôneas promovem a extrusão de prótons  $\text{H}^+$  acidificando o meio e reduzindo o  $\text{Fe}^{+3}$  para  $\text{Fe}^{+2}$  para absorção radicular. As monocotiledôneas, especificamente as gramíneas, sintetizam agentes quelantes de  $\text{Fe}^{+3}$ , formando o complexo chamado de fitosideróforos que são absorvidos por moléculas específicas de membrana (GAMALERO e GLICK, 2011).

Os sideróforos apresentam papel importante na proteção das plantas, principalmente quando exposta a condições ambientais desfavoráveis como alta concentração de metais pesados (GAMALERO e GLICK, 2011). A inoculação bacteriana, quando em ambientes com limitação de ferro no solo, produzem sideróforos, diminuindo os sintomas cloróticos que acometem as plantas (SHARMA et al. 2003).

#### 2.5 *Azospirillum brasilense*

A bactéria *A. brasilense* é de vida livre, podendo também ser endofítica facultativa. Sua classificação foi feita por Beijerinck que descreveu a espécie *Spirillum lipoferum*, mas em 1978 foi reclassificada devido a descrição de duas novas espécies do gênero *Azospirillum*, *A. lipoferum* e *A. brasilense* (TARRAND et al., 1978 apud Hungria et al., 2011). A dispersão da espécie ocorre em grande parte dos solos, principalmente em regiões tropicais, subtropicais e temperadas e em diferentes culturas da família Poacea (SIVASAKTHIVELAN e SARANRAJ, 2013). A bactéria *Azospirillum* spp. apresenta capacidade de promoção de crescimento em culturas de importância econômica, portanto, pode ser uma ferramenta de amplo uso nas culturas

atuais, minimizando os custos e ampliando a sustentabilidade em sistemas produtivos (OKON, Y. E LABANDERA-GONZALEZ (1994) *apud* SIVASAKTHIVELAN E SARANRAJ 2013).

## 2.6 *Herbaspirillum seropedicae*

A bactéria *H. seropedicae* foi isolada em 1984 a partir da rizosfera de milho, sorgo e arroz e foi classificada no mesmo ano por Baldani como *Azospirillum seropedicae*. No entanto, estudos de homologia entre DNA:DNA demonstraram a existência de um novo gênero e então *A. seropedicae* foi reclassificada como *H. seropedicae* (BALDANI et al., 1986; BALDANI e BALDANI, 2005; CHUBATSU et al., 2012 *apud* PEREIRA et al., 2014).

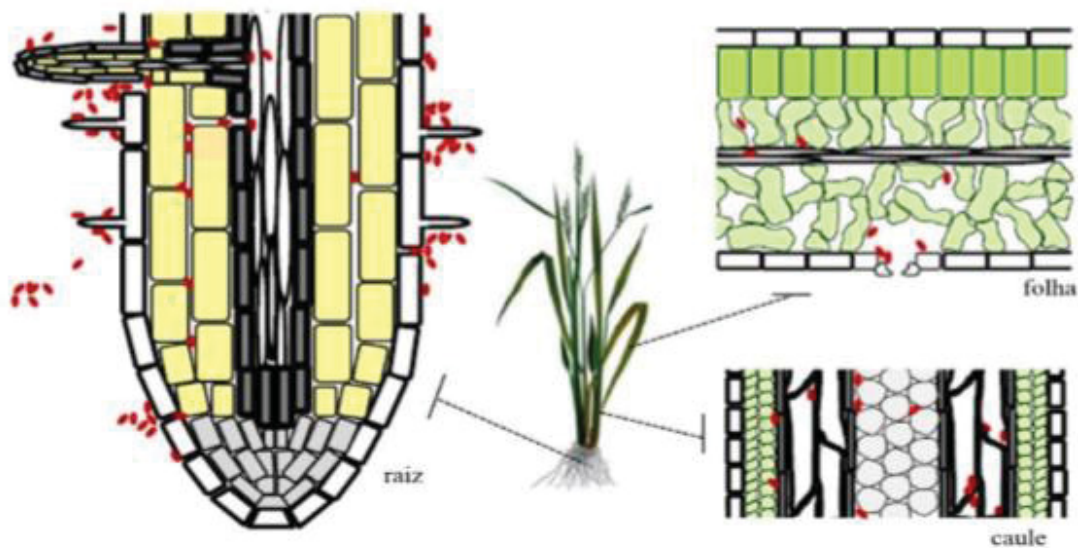
A bactéria é atraída pela liberação de exsudatos das raízes composto principalmente por fontes de carbono ocorrendo a colonização por meio dos pelos radiculares, penetrando as regiões de descontinuidade da epiderme como zonas de alongação e rachaduras (Figura 3). Podem colonizar também o aerênquima e o xilema, levando o *H. seropedicae* até as folhas e brotos (MONTEIRO et al., 2012). O processo de colonização da bactéria *H. seropedicae* SMR1 ocorre rapidamente após o contato com os exsudatos liberados pelas raízes e em seguida a colonização nos pontos de emergência das raízes laterais (Monteiro et al., 2012). No milho, a colonização ocorre após 30 minutos de contato, característica também observada em feijão (SCHMIDT et al., 2011; MONTEIRO et al., 2012) e na cana-de-açúcar (da SILVA et al., 2003).

A bactéria *H. seropedicae* pode ser encontrada em associação com diversas culturas de interesse econômico, porém, o completo entendimento dos mecanismos de infecção e colonização são necessários para aprimorar sua utilização como promotores de crescimento. A inoculação de *H. seropedicae* em plantas de arroz promoveu aumento de massa fresca 30 dias após a semeadura (BALDANI et al 2000), sendo que os principais mecanismos envolvidos na promoção de crescimento é a capacidade de fixar nitrogênio, produção de fitohormônios, ACC deaminase e produção de sideróforo (MONTEIRO et al., 2012).

Os efeitos benéficos associados ao ganho de massa em cana-de-açúcar podem variar de acordo com a espécie inoculada (OLIVEIRA et al., 2006). O ganho com a interação também depende de características do solo, como alta, média e baixa nutrição, sendo que os melhores resultados foram encontrados em solos com baixo e



média nutrição, principalmente relacionada a doses de nitrogênio. Os fatores abióticos também interferem na persistência da colonização durante o período de cultivo da cultura reduzindo os ganhos da interação.



**FIGURA 3:** Representação gráfica da adesão no sistema radicular e colonização dos tecidos foliares e caules por *H. seropedicae* (pontos vermelhos) em plantas arroz. Fonte: Monteiro, et al., (2012).

O monitoramento da presença da bactéria é importante (MONTEIRO et al., 2012; PEREIRA et al., 2014). A redução da colonização com o tempo restringe o efeito bioestimulante na cultura alvo. Necessitando de metodologias para monitoramento da bactéria que avaliem a persistência da bactéria em relação ao tempo de inoculação.

## 2.7 Técnicas utilizadas na detecção de organismos microbianos

A utilização de microrganismos promotores de crescimento vegetal vem crescendo tendo em vista os benefícios que os mesmos trazem as grandes culturas, principalmente milho, trigo e arroz (DE SOUZA et al., 2016). Nesse sentido, técnicas de detecção e monitoramento ambiental destes inoculantes faz-se necessário, uma vez que a sobrevivência destes no solo, bem como a presença ao longo do ciclo de cultivo das culturas pode ser um indicativo de promoção de crescimento.

Inicialmente as metodologias utilizadas na detecção de microrganismos eram realizadas por meio de cultivo seletivo para as bactérias, método que permitiu a prospecção de novos microrganismos, porém apresenta algumas limitações como a grande variação na contagem e contaminação dos meios.

No entanto, quando se busca verificar a presença dos inoculantes na cultura ao longo do seu ciclo, as técnicas relacionadas a contagem em placas podem

apresentar problemas, dentre eles o tempo de crescimento da colônia em placa, a grande variação na contagem, mesmo quando avaliado em repetição e também contaminação dos meios de cultura utilizados no plaqueamento.

Uma técnica utilizada na detecção destes microrganismos ao longo do ciclo de cultivo das culturas é a detecção do DNA alvo pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Por meio desta técnica é possível classificar como presente ou ausente, determinado microrganismo, baseado em uma sequência específica utilizada para detecção do mesmo (oligonucleotídeos iniciadores). Esta técnica é um modo qualitativo de detecção que necessita de tratamentos posteriores para classificar como presente ou ausente o microrganismo em determinada amostra. Dentre as variações existentes em metodologias de monitoramento de populações a reação em cadeia da polimerase ganhou destaque, visto a maior acurácia, quando comparada a contagem em placas. Na técnica da PCR são utilizados oligonucleotídeos iniciadores, responsáveis pela ligação ao DNA molde, amplificando-o por meio da enzima DNA polimerase (MULLIS, 1987).

Uma variante que vem ganhando destaque na quantificação de microrganismos é a PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR). Esta metodologia tem sido usada com sucesso na quantificação de inoculantes biológicos (STETS et al., 2015; BOA SORTE, et al., 2015; PEREIRA et al., 2014).

A qPCR é uma variante da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que vem ganhando destaque visto sua acurácia, alta qualidade e velocidade (SØRENSEN et al., 2009; COUILLEROT et al., 2009). Esta técnica é baseada na ligação de um corante que possui afinidade a duplas fitas de DNA, sendo que a cada ciclo sua luminescência é aumentada, podendo assim, ser verificada a amplificação em tempo real. Ao final de cada ciclo o corante se dissocia da dupla fita de DNA, diminuindo a luminescência, podendo então ser quantificado o DNA.

A curva de amplificação na PCR em tempo real apresenta três fases distintas, sendo a fase basal ou lag, quando não há quantidade suficiente de produto amplificado, fase log, quando é perceptível que a cada ciclo o número de produto amplificado dobra e a fase *plateau* quando não ocorre o aumento dos produtos da reação, seja pelo consumo dos reagentes, seja pela inibição da reação pelos subprodutos como pirofosfato (ARYA et al., 2005). Na PCR quantitativa é utilizado um limiar de detecção chamado de *Ciclo Threshold* (Ct), que é utilizado para quantificar amostras desconhecidas a partir de amostras conhecidas. A partir dos valores de Ct

é possível obter uma curva padrão e então calcular a quantificação de amostras desconhecidas.

## 2.8 REFERÊNCIAS

- ARYA, M.; SHERGILL, I. S.; WILLIAMSON, M.; GOMERSALL, L.; ARYA, N.; PATEL, H. R. H. "Basic principles of real-time quantitative PCR". **Expert review of molecular diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209-219, 2005.
- BABALOLA, O. O.; "Beneficial bacteria of agricultural importance". **Biotechnology Letters**, 2010 Nov. 32 (11):1559-70. doi: 10.1007/s10529-010-0347-0. 2010.
- Baldani, J. I., Baldani, V., Seldin, L., & Döbereiner, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 36(1), p.86-93. 1986.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. An **Acad Bras Cienc**, v. 77, n. 3, p. 549-79, 2005.
- BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and Burkholderia spp.. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.485–491, 2000.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.
- BLACKBURN, F. Sugar-cane. **Tropical Agriculture Series** 1º Edição, Longman, London and New York, 414 p. 1984.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M.; Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v.30, n.2, p. 365-372, 2000.
- CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C. Nitrogênio e enxofre na cultura da cana-de-açúcar. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S.; VITTI, G. C. (Eds.). Nitrogênio e Enxofre na Agricultura Brasileira. Piracicaba: **International Plant Nutrition Institute**, p. 349–412, 2007.
- CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; BONATTO, A. C.; HUERGO, L. F.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, 2012.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, "Acompanhamento de Safra Brasileira de Cana-de-açúcar" Segundo Levantamento, Agosto, 2015.
- COUILLEROT, O., BOUFFAUD, M.L., BAUDOIN, E., MULLER, D., CABALLERO-MELLADO, J. AND MOENNE-LOCCOZ, Y. Development of a Real-time PCR Method to Quantify the PGPR Strain *Azospirillum Lipoferum* CRT1 on Maize Seedlings. **Soil Biology & Biochemistry** v. 42, p. 2298-2305, 2010.
- DALLA SANTA, O.R., HERNANDEZ, R.F., ALVAREZ, G.L.M., RONZELLI, P., SOCCOL, C.R. *Azospirillum* sp inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Braz Arch Biol Technol.** 2004; 47:843–850. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132004000600002>.

- DE SOUZA, Rocheli; SCHOENFELD, Rodrigo; PASSAGLIA, L. M. P. Bacterial inoculants for rice: effects on nutrient uptake and growth promotion. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 4, p. 561-569, 2016.
- DE VRIEZE, Jop. The littlest farmhands. **Science**, v. 349, n. 6249, p. 680-683, 2015.
- DÖBEREINER, J.. *Azotobacter paspali* sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de Paspalum. **Pesq Agropec Bras** 1: 357-365, 1966.
- DÖBEREINER, J. E RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de Beijerinckia. **Rev Biol** 1: 261-272, 1958.
- EHRlich, P. R.; EHRlich, A. H. The population explosion. **New York: Simon and Schuster**, 1990.
- Ehrlich HL Geomicrobiology, 2nd ed. Dekker, New York, p 646, 1990.
- EHTESHAMUL-HAQUE, S., GHAFAR, A. Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean. **Journal of phytopathology**, v. 138, n. 2, p. 157-163, 1993.
- ERISMAN, J W. From Field to Table: A Systems Approach to Increase N Efficiency and Limit N Losses. In: **2016 AAAS Annual Meeting AAAS**, 2016.
- ERISMAN, J. W.; SUTTON, M. A.; GALLOWAY, J.; KLIMONT, Z.; WINIWARTER, W. "How a century of ammonia synthesis changed the world". **Nature Geoscience** 1, 636 - 639. doi: 10.1038/ngeo325, 2008.
- FELICI, C.; VETTORI, L.; GIRALDI, E.; FORINO, L. M. C.; TOFFANIN, A.; TAGLIASACCHI, A. M.; NUTI, M. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 2, p. 260-270, 2008.
- GAMALERO E., GLICK B.R., Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria, in Bacteria in Agrobiolgy: **Plant Nutrient Management** (D. K. Maheshwari, eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, 2011.
- GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.
- HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological research**, v. 163, n. 2, p. 234-242, 2008.
- HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.
- HOFFMANN, R. 2006 Segurança alimentar e produção de etanol no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.13, p.01-05.
- HOLGUIN, G.; PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. **Biology and fertility of soils**, v. 29, n. 1, p. 10-23, 1999.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja**, 2011.

IFA, International Fertilizer Industry Association, “O Uso de Fertilizantes Minerais e o Meio Ambiente” Revised Edition, Paris, February, 2000. Disponível em: [http://www.anda.org.br/multimidia/fertilizantes\\_meio\\_ambiente.pdf](http://www.anda.org.br/multimidia/fertilizantes_meio_ambiente.pdf). Acesso em: 10 de Novembro de 2015.

JANNOO, N, GRIVET, L., DOOKUN, A. D’HONT, A., GLASZMANN, J. C. Evaluation of the genetic base of sugarcane cultivars and structuration of the diversity at the chromosome level using molecular markers. **Food and Agricultural Research Council**, Réduit, Mauritius, p.123-135, 1999. Disponível em <http://encountermauritius.gov.mu/portal/sites/ncb/moa/farc/amas99/s41.pdf> Acesso em Dezembro de 2015.

KUHAD R., KOTHAMASI D., TRIPATHI K.K., SINGH A., Diversity and Functions of Soil Microflora in Development of Plants, in Plant Surface Microbiology (A. Varma et al., eds.), **Springer**, Berlin, Heidelberg, 2004.

LOPES, V. R.; “Melhoramento genético de cana-de-açúcar em associação com bactérias promotoras de crescimento vegetal”. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) Universidade Federal do Paraná, PR, p.25-26, 2013.

MALAVOLTA, E. Manual de química agrícola: adubos e adubação. 3º Ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 596p, 1981.

MICHIELS, K.; CROES, C. L.; VANDERLEYDEN, J. “Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* sp7 to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 137, p. 2241-2246, 1991.

MIHALACHE, G.; ZAMFIRACHE, M-M.; STEFAN, M. “Root associated bacteria – friends or enemies? A review”. **Memoirs of the Scientific Sections of the Romanian Academy Tome V. 38**, 2015.

MIRANDA, L. L. D.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. Cana-de-açúcar, **Instituto Agronômico de Campinas**, Campinas, 882p, 2008.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C.; SCHMIDT, M. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; PANKIEVICZ, V. C. S.; CRUZ, L. M. CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. Herbaspirillum-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, 2012.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2ª ed., Editora UFLA. 729p, 2006.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of dna *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain-reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

Nester, E. W., Gordon, M. P., Amasino, R. M., Yanofsky, M. F. Crown gall: a molecular and physiological analysis. **Annu Rev Plant Physiol** 35:387–413, 1984.

NEVES, M. F.; CONEJERO, M. A.; “Estratégias para a cana no Brasil: um negócio classe mundial”. São Paulo, Atlas, p.288, 2010.

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

PAPAVIZAS, G.C.; DAVEY, C.B. Saprophytic behavior of *Rhizoctonia* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v.51, p.693-699, 1961.

PEDROZO, C. Â.; BARBOSA, M. H. P.; RESNDEE, M. D. V.; PETERNELLI, L. A.; COSTA, P. M. A.; SILVA, F. L. "Eficiência da seleção em fases iniciais no melhoramento da cana-de-açúcar". **Revista Ceres**, 55: 1-8, 2008.

PEREIRA T. P., do AMARAL F.P., DALL'ASTA P., BROD F. C. A., Arisi A. C. M. Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. **Mol Biotechnol**, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-014-9742-4>.

PIERIK, R., THOLEND, D., POORTER, H., VISSER, E. J. W., VOESENEK, L.A. C. J., The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. **Trends in plant science**, v. 11, n. 4, p. 176-183, 2006.

PIETERSE, C. M. J., LEON, R. A., VAN DER ENT, S., VAN WEES, S. C. M. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nat. Chem. Biol.** 5, 308–316, 2009.

RAYMOND, J., SIEFERT, J. L., STAPLES, C. R. & BLANKENSHIP, R. E., The natural history of nitrogen fixation. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

RICHARDSON, A. E., BAREA, J. M., MCNEILL, A. M., PRIGENT-COMBARET, C., Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and soil**, v. 321, n. 1-2, p. 305-339, 2009.

BRAGATO, I. R., ALVES CORRÊA, D., dos SANTOS, M. R. & OSWALDO, C. Y., Responsabilidade Social Corporativa No Setor Sucroalcooleiro: Um Estudo Sobre Percepções Das Externalidades Junto Ao Público Externo. DOI: 10.15600/1679-5350/rau. v10n3p162-182. **Revista de Administração da Unimep-Unimep Business Journal-B2**, v. 10, n. 3, p. 162-182, 2012.

RYALS, J., UKNES, S., WARD, E., Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, v. 104, n. 4, p. 1109, 1994.

SAHARAN, B. S., NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 21, n. 1, p. 30, 2011.

SCHMIDT, M. A., SOUZA, E. M., BAURA, V. A., WASSEM, R., YATES, M. G., PEDROSA, F. O., MONTEIRO, R. A. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 3, p. 182-185, 2011.

SHARMA A, JOHRIA B. N., SHARMA A. K., GLICK B. R. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP 3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 7, p. 887-894, 2003.

- SILVA, L. G.; MIGUENS, F. C.; OLIVARES, F. L.; *Herbaspirillum seropedicae* and sugarcane endophytic interaction investigated by using high pressure freezing electron microscopy. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 69-71, 2003.
- SILVEIRA, A. B. Isolamento e caracterização de linhagens de *Bacillus* e *Paenibacillus* promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul. Tese de doutorado em genética e biologia molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- SIVASAKTHIVELAN, P.; SARANRAJ, P. *Azospirillum* and its formulations: A Review. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 3, p. 275-287, 2013.
- SØRENSEN, J., NICOLAISEN, M. H., RON, E., SIMONET, P. Molecular tools in rhizosphere microbiology-from single-cell to whole-community analysis. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 483-512, 2009.
- STETS, M. I.; ALQUERES, S. M. C.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; CRUZ, L. M.; Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 Bacteria in Wheat Roots by Strain-Specific Quantitative PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6700-6709, 2015.
- TAILOR A.J., JOSHI B.H., Characterization and optimization of siderophore production from *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from sugarcane rhizosphere. **Journal of Environmental Research and Development**, v.6, n. 3A, 2012.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Plant Physiology*. 3ª Ed. Sunderland: Sinauer Associates, 690p, 2002.
- TARRANT, J.J.; KRIEG, N R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, p.967-980, 1978.
- TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 42, n. 2, p. 117-126, 2006.
- VESSEY, J. K., Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, **Plant and Soil**, 255, 2, 571–586, 2003.
- VIAN, C. E. F. Cana-de-açúcar: Alcoolquímica. **Agência de Informação Embrapa**. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canade-acucar/Abertura.html>>. Acesso em 20 de Janeiro de 2016.
- WAACK, R. S.; NEVES, M. F. Competitividade do agrobusiness brasileiro: sistema agroindustrial da cana-de-açúcar. PENZA/FIA/FEA/USP, São Paulo, v.5, 185p., 1998.
- ZAMIOUDIS, C.; MASTRANESTI, P.; DHONUKSHE, P.; BLILOU, I.; PIETERSE, C. M. J. Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. **Plant Physiology**, v. 162, n. 1, p. 304-318, 2013.



**Capítulo 1:** Inoculação de *Azospirillum brasilense* FP2 e *Herbaspirillum seropedicae* SMR1 no cultivar de cana-de-açúcar RB867515.

## RESUMO

O Brasil é líder mundial em produção de cana-de-açúcar, sendo que seus produtos e derivados são fatores importantes para a composição do produto interno bruto (PIB). Alternativas visando aumentar a sustentabilidade na cadeia produtiva da cultura tem sido buscada, ganhando destaque as rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, dentre elas bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Azospirillum*. O objetivo do trabalho foi monitorar a população bacteriana ao longo de 60 dias e a promoção de crescimento no cultivar micropropagada RB867515 inoculada com as bactérias promotoras de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* FP2 e *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. O experimento em casa de vegetação foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3x4x2, com três inoculantes (controle, *Azospirillum brasilense* FP2 e *Herbaspirillum seropedicae* SMR1), 4 avaliações temporais (15, 30, 45 e 60 DAI) e 2 doses de nitrogênio (0 e 30 kg.ha<sup>-1</sup>) com solo agrícola. A análise de variância (P>0.01) mostrou que a inoculação com a bactéria *H. seropedicae* SMR1 promoveu maior ganho de massa de matéria seca da parte aérea quando comparado ao tratamento controle e *A. brasilense* FP2. O desdobramento da interação entre os fatores e a variável tempo apresentou o maior efeito (P>0,01), seguido da interação inoculante vs tempo e inoculante vs adubo (P>0,05). Houve efeito da interação tripla (inoculante vs tempo vs adubo) sendo significativa a 5%. A bactéria *H. seropedicae* SMR1 foi a que apresentou melhores resultados em ganho de massa seca, podendo ser uma alternativa para utilização em campo em interação com o cultivar de cana-de-açúcar RB867515.

**Palavras-chave:** interação planta-bactéria. Nitrogênio. promoção de crescimento.

## ABSTRACT

Brazil is the world leader in the production of sugarcane, and their products and derivatives are principal factors for the composition of gross domestic product (GDP). Alternatives to obtain greater sustainability in the productive chain of the culture has been sought, highlighted winning the plant growth promoting rhizobacteria, among them bacteria of the genus *Herbaspirillum* and *Azospirillum*. The aim of this study was to monitor the bacterial population over 60 days and the growth promotion in micropropagated sugarcane RB867515 inoculated with bacteria that promote plant growth with *Azospirillum brasilense* FP2 and *Herbaspirillum seropedicae* SMR1 inoculants. An experiment was conducted in a greenhouse, with completely randomized design in a factorial 3 x 4 x 2 with three inoculants (control (with sterile medium culture), *A. brasilense* FP2 and *H. seropedicae* SMR1), 4 time ratings (15, 30, 45 and 60 DAI) and 2 doses nitrogen (0 and 30 kg ha<sup>-1</sup>) with native soil. The analysis of variance ( $P > 0.01$ ) showed that inoculation with bacteria *H. seropedicae* SMR1 promoted greater weight gain of dry matter of the shoot when compared to the control and *A. brasilense* FP2 respectively. Through the unfolding of the interaction between the factors evaluated in work the variable with the greatest effect was the time ( $P > 0.01$ ), followed by interaction between inoculating vs time and inoculant vs fertilizer and the triple interaction inoculant vs time vs fertilizer, both with a significance level of 5% ( $P > 0.05$ ). The *H. seropedicae* SMR1 bacterium presented the best results on dry matter gain and could be an alternative for field use in interaction with sugarcane cultivar RB867515.

**Key-words:** plant-bacteria interaction. Sustainability. plant growth promotion.

### 3 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma das culturas mais plantadas no Brasil, o maior produtor mundial. O balanço de safra feito pela Conab (2015) para a safra 2015/2016 relata uma diminuição da área plantada em 0,6% comparado ao balanço de safra 2014/2015. O estado de São Paulo possui a maior área e o Paraná ocupa a quinta colocação com 6,8% da área total. As cultivares mais plantadas nos estados de São Paulo e Paraná pertencem a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético brasileiro (RIDESA).

A adubação nitrogenada é um importante fator para obtenção de altos níveis de produtividades. No Brasil, para a cana-planta, são aplicados 60 kg N ha<sup>-1</sup> e para cana-soca são aplicados 80 kg N ha<sup>-1</sup> (NUNES et al., 2005 *apud* PEDULA et al., 2016). A aplicação de adubação nitrogenada em cana-de-açúcar no Brasil apresenta quantidades ligeiramente inferiores as praticadas na Austrália, onde aplica-se entre 120 a 160 kg N ha<sup>-1</sup> N por hectare da cultura (SCHROEDER et al., 2005).

O uso pouco eficiente do nitrogênio evoca questões ambientais, sérios problemas têm sido relatados sobre o excesso de nitrogênio, tanto para o meio ambiente quanto para a saúde humana (IFA, 2000; LUTZENBERGER, 2001; GALLOWAY et al., 2007; FOSTER e CLARK, 2009; SUTTON, et al., 2011). No processo produtivo dos adubos nitrogenados são utilizadas grandes quantidades de combustíveis fósseis para a redução do N atmosférico em amônio. O processo é caro e produtor de gases relacionados ao efeito estufa. Uma alternativa a diminuição da aplicação de fertilizantes nitrogenados são as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), que além de fixarem nitrogênio atmosférico produzem uma série de fatores e reguladores de crescimento que auxiliam no desenvolvimento das plantas. Sendo que a interação planta bactéria é favorecida por baixas doses de nitrogênio (URQUIAGA et al., 2010).

Na cana-de-açúcar não há consenso sobre os métodos de inoculação e o tipo de inoculante utilizado, sendo que já foi proposto uma mistura de bactérias, porém sem resultados satisfatórios, principalmente no campo (OLIVEIRA et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2006). Um dos fatores que influenciam a colonização bacteriana nas plantas é a presença de grandes quantidades de adubos minerais, principalmente a base de nitrogênio (OLIVEIRA et al. 2002; OLIVEIRA et al. 2006). No entanto a inoculação bacteriana em condições de baixas doses de nitrogênio favorece a interação (OLIVEIRA et al. 2006), ou promovem competição (SPOLAOR et al. 2016).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a promoção de crescimento vegetal pela inoculação das bactérias *H. seropedicae* SMR1 e *A. brasilense* FP2 em baixa dose de nitrogênio no cultivar micropropagado RB867515.

### 3.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1.1 Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3x2x4, sendo 3 tratamentos (T1: Controle, T2: *A. brasilense* FP2 e T3: *H. seropedicae* SMR1), 2 doses de nitrogênio (0 e 30kg.ha<sup>-1</sup>), 4 avaliações temporais (15, 30, 45 e 60 DAI) e 6 repetições.

#### 3.1.2 Material vegetal

O material vegetal utilizado no experimento foi obtido via cultura de tecidos, por meio da técnica de cultura de meristemas. O método consiste na germinação de mini-toletes de cana-de-açúcar, germinados em bandejas por 48 horas a temperatura de 38°C com elevada umidade para acelerar a brotação. Após esse período o material é retirado e então exposto as condições da casa de vegetação, sendo regado quando necessário até atingir tamanho adequado para retirada do meristema. Ao atingir uma altura de 10 a 15 centímetros inicia-se o processo de obtenção dos meristemas, que consiste no corte da brotação rente ao mini-tolete, sendo este levado ao laboratório, no qual foi feito a assepsia e iniciou-se o processo de extração do meristema em cabine de fluxo laminar.

O processo foi dividido em etapas, sendo elas: 1ª corte para diminuir o tamanho inicial do explante, no qual foi utilizado somente a base da brotação, descartando as folhas; 2ª assepsia com álcool 70% por 1 minuto; 3ª assepsia com hipoclorito 2,5%, adicionando-se duas gotas de tween 20, por 2 minutos; 4ª lavagem em água deionizada estéril de 3 a 5 vezes; 5ª retirada do meristema, no qual o mesmo foi banhado em placa de petri por uma solução de cisteína 50 mg.mL<sup>-1</sup> para diminuir a oxidação do material vegetal (ALCANTARA et al., 2014).

Após a retirada do meristema e colocação em frasco com meio de cultura, o mesmo foi levado a sala de crescimento climatizada e mantido no escuro por uma semana evitando a fotodegradação. Após esse período os frascos foram retirados e

mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo e temperatura controlados, onde, em algumas semanas foi possível prosseguir com as etapas de multiplicação do material vegetal. A partir dos explantes regenerados foi feita a multiplicação dos mesmos em meio de cultivo composto de meio MS adicionado de 0,2 mg. L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg. L<sup>-1</sup> KIN (SILVA *et al.*, 2009) para obtenção de número desejado de material vegetal para uso nos experimentos.

Diferentes anti-oxidantes foram testados para verificar a eficiência no controle da oxidação da cultura de meristema do cultivar RB867515, sendo a cisteína que apresentou melhor resultado durante a excisão do meristema (dados não apresentados).

### 3.1.3 Preparo do inoculante e inoculação

No experimento foram utilizadas as bactérias promotoras de crescimento *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SMR1, ambas cedidas pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR - Curitiba. O inoculante de *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SMR1 foram preparados separadamente a partir de uma solução pura com concentração de 1x10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

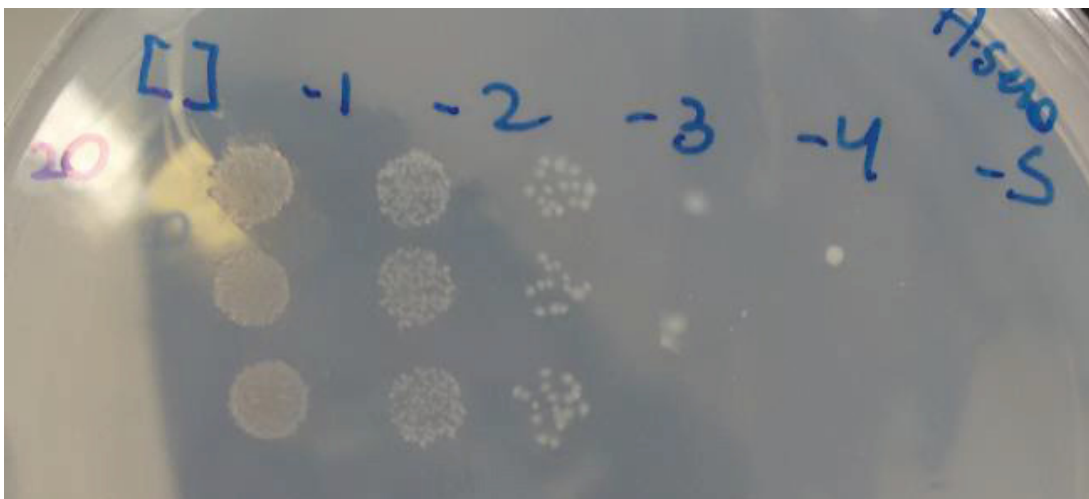
O inoculante composto de *A. brasilense* foi cultivado em meio líquido NFbHPN (DOBEREINER, 1980), respeitando a relação de 1:5, volume de meio de cultura: volume do frasco, em meio contendo lactato de sódio como fonte de carbono com concentração final de 5 mg.L<sup>-1</sup>, mantendo a temperatura ótima de crescimento da cultura em 30°C até atingir uma densidade óptica entre 1,5 e 1,8 (DO<sub>600</sub>), que ocorre por volta de 48 horas de crescimento, correspondendo a aproximadamente 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> do inoculante. A preparação do inoculante de *H. seropedicae* SMR1 utiliza o mesmo meio de cultivo do *A. brasilense* FP2 descrito acima, porém, como fonte de carbono é utilizado o ácido málico, 5 mg. L<sup>-1</sup>, mantendo as condições de crescimento e agitação orbital com 120 rpm a 30°C. O processo de contagem bacteriana é o mesmo para ambas as bactérias, respeitando a diferença entre os meios de cultivo.

Antes da inoculação as plântulas de cana-de-açúcar por foram mantidas uma semana para aclimatização. Adotou-se esse tempo para verificar a taxa de sobrevivência das mudas no solo, visto que é comum a morte das plantas frente a mudança de ambiente *in vitro* para *in vivo*. Após esse tempo foi inoculado 1mL de cada inoculante na concentração de 10<sup>7</sup> células por mililitro no respectivo tratamento, sendo que o tratamento controle recebeu o meio de cultivo estéril sem a bactéria.

Também foi ministrado a adubação nitrogenada de acordo com cada tratamento. Após esse período, contou-se quinze dias para a primeira avaliação, no qual foi feita a massa de matéria seca da parte aérea e raiz, bem como o número mais provável (NMP) de bactéria nas raízes das plantas (ROMEIRO, 2012). A análise estatística foi realizada pelo software estatístico R.

#### 3.1.4 Monitoramento bacteriano

As metodologias utilizadas para o monitoramento populacional bacteriano foram o método da microgota (ROMEIRO, 2012). O método da microgota consiste no plaqueamento de diferentes diluições com 5 uL da amostra em duplicata, sendo que após a gota secar, a placa é levada para estufa com temperatura de 28°C para crescimento das colônias. Posteriormente, em torno de 2 dias após o plaqueamento, é realizada a contagem de colônias em cada microgota e então estimado o número de bactérias de acordo com a diluição (Figura 4).



**FIGURA 4:** Diluições seriadas para contagem no número de unidades formadoras de colônias de *H. seropedicae* SMR1 pelo método da microgota.

Nas avaliações nas quais foram utilizadas a PCR e a PCR quantitativa, foram feitas análises somente para a bactéria *A. brasilense* FP2. A avaliação referente a bactéria *H. seropedicae* necessita de condições específicas de reação, que ainda não foram testadas e estabelecidas, em virtude de não haver iniciadores específicos para a espécie. Neste ponto, foram avaliados os tratamentos controle (T10) e inoculado com *A. brasilense* FP2 (T11).

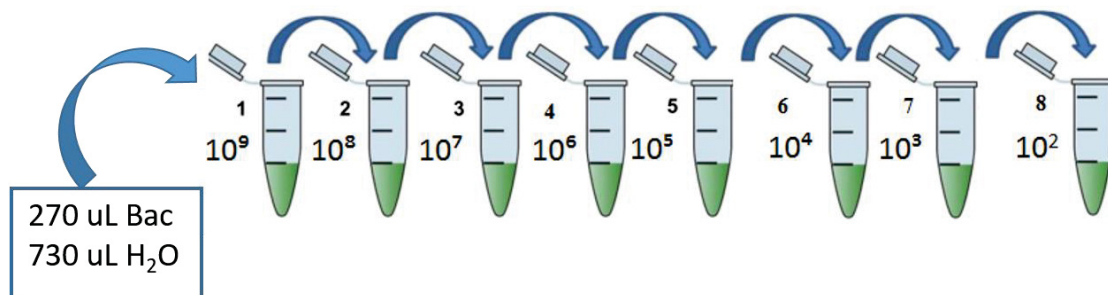
A PCR convencional foi utilizada para detecção de presença ou ausência da bactéria nos tratamentos. O volume foi preparado para 20uL por amostra, de acordo com os seguintes componentes da reação: tampão (10 X) 2,0 uL, dNTPs (10 Mmol)

0,8 uL, Primer F e R (10 pMol) 0,5 uL, Cloreto de Magnésio (25 Mmol) 1,6 uL, DNA polimerase 0,2 uL e água para completar 20 uL de reação.

### 3.1.5 PCR quantitativa (qPCR)

A PCR quantitativa foi feita com uma diluição seriada de concentração bacteriana na presença de raiz estéril do cultivar RB867515, e então foi extraído o DNA total dessa combinação para calcular a curva padrão de detecção utilizada para quantificar as amostras do experimento. Para isso, foi feita a contagem de células em citômetro de fluxo BD Accuri™ C5, no qual foi feita uma diluição seriada de cultura pura para detecção do número de células em cada diluição. A partir dos eventos (número de células em cada diluição) foi ajustado a concentração ideal de bactérias para  $10^9$  e realizada a diluição seriada.

Para obter a concentração de  $10^9$  células da cultura bacteriana foi pipetado 270 uL da diluição bacteriana oriunda de cultura pura e adicionada a 730 uL de água estéril. Após obter a concentração de  $10^9$  células por mL foi feita a diluição seriada, partindo desta amostra, até a concentração  $10^2$ , para então pipetar a quantidade ideal para cada amostra, respeitando a relação 1:1 (peso raiz e volume pipetado do inoculante) e extrair o DNA total das amostras para obter a curva padrão da PCR quantitativa (figura 5).



**FIGURA 5:** Diluição seriada para obtenção da curva padrão de raízes estéreis do cultivar RB867515 de cana-de-açúcar para quantificação em PCR tempo real.

A determinação da curva padrão foram utilizadas as diluições de  $10^9$ ,  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$  e  $10^2$ . Para verificar a curva padrão e o coeficiente de confiabilidade ver resultados. A leitura da concentração de DNA nas amostras foi realizada em NanoDrop (Thermo Scientific) sendo determinado a concentração ( $\mu\text{g. uL}^{-1}$ ) e relação de pureza (260/280 e 260/230) das amostras (Tabela 1).

TABELA 1: Concentração de DNA das amostras utilizadas na PCR quantitativa.

Amostras	ug/ul	260/280	260/230
Controle	7,5	0,3	2,2
Controle	11,0	1,8	0,7
Controle	9,9	1,9	1,0
Controle + N	10,9	2,0	0,6
Controle + N	4,0	2,1	0,2
Controle + N	15,7	1,8	1,0
<i>Azospirillum</i>	7,1	1,7	1,2
<i>Azospirillum</i>	8,6	1,8	0,9
<i>Azospirillum</i>	10,2	1,7	0,9
<i>Azospirillum</i> + N	9,5	2,2	0,6
<i>Azospirillum</i> + N	8,3	2,	0,4
<i>Azospirillum</i> + N	33,6	1,9	0,3

O método de qPCR foi realizado em equipamento Step One Plus Real-time PCR (Applied Biosystemns). A reação foi realizada nas seguintes condições: 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de duas temperaturas: 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, seguido de uma curva de desnaturação. Para a reação de PCR em tempo real foram utilizados Sybr green (7,5 uL), primers Azo 2.1 (2 uL), água (4,5 uL) e amostra (1 uL) com volume final de reação de 15 uL.

Os métodos de detecção pela contagem em placas e PCR quantitativa foram comparadas com a matéria seca da parte aérea (figura 4 e 5), que foi obtida mantendo o material vegetal em estufa com circulação forçada de ar com temperatura de 65°C por 48 horas, até obter massa constante.

### 3.1.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software R (Core Team R, 2016). Que tipo de análise da variância? Foi realizado teste de comparação de média?



### 3.2. RESULTADOS

Os tratamentos apresentaram diferenças significativas de acordo com o teste F da análise de variância (ANOVA) ao nível de 1% de probabilidade avaliando a massa de matéria seca da parte aérea (Tabela 2).

TABELA 2: Tabela da análise de variância (ANOVA).

Fonte	GL	SQ	QM	F
Modelo	23	18,97	0,82	5,84***
Erro	120	16,94	0,14	
Total Corrigido	143	35,91		

Nível de significância 1%\*\*\*.

A dose de nitrogênio de 30 kg. ha<sup>-1</sup> apresentou diferença significativa, ao nível de 5% de probabilidade, na obtenção da massa de matéria seca da parte aérea quando comparado ao tratamento controle sem adição de nitrogênio (Tabela 3).

TABELA 3: Efeito da dose de nitrogênio na obtenção da massa de matéria seca da parte aérea avaliado pelo teste F da análise de variância a 5% de probabilidade.

Adubo	GL	SQ	QM	F
Com Nitrogênio	2	1,654	0,827	5,86**
Sem nitrogênio	2	0,024	0,012	0,09 <sup>NS</sup>

\*\* nível de significância a 5% de probabilidade.

Avaliando o acúmulo de matéria seca parte aérea houve a interação dos tratamentos tempo e nitrogênio (Tabela 4). Os resultados indicam que houve interação na última avaliação temporal (60 dias), em presença de adubação nitrogenada.

TABELA 4: Teste F da análise de variância para a interação do tratamento tempo com a dose de nitrogênio.

Tempo	Nitrogênio	GL	SQ	QM	F
15	CN	2	0,083	0,041	0,30 <sup>NS</sup>
	SN	2	0,029	0,014	0,10 <sup>NS</sup>
30	CN	2	0,029	0,011	0,08 <sup>NS</sup>
	SN	2	0,087	0,043	0,31 <sup>NS</sup>
45	CN	2	0,066	0,033	0,24 <sup>NS</sup>
	SN	2	0,050	0,025	0,18 <sup>NS</sup>
60	CN	2	4,202	2,101	14,88**
	SN	2	0,573	0,286	2,03 <sup>NS</sup>

\*\* significativo a 1% de probabilidade, NS não significativo, pelo teste F da análise de variância (ANOVA).

Observou-se que o tratamento inoculante apresentou evidências de diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F da análise de variância (Tabela 5). Quando verificada a interação com os tratamentos, o inoculante em interação com

o adubo (presença de nitrogênio) apresentou significância estatística (5%). O fator tempo também apresentou significância estatística devido aos estádios fenológicos de crescimento da cana-de-açúcar apresentar altas taxas de crescimento e multiplicação próximo aos 60 dias.

TABELA 5: Desdobramento da interação entre os fatores avaliados pelo teste F da análise de variância a 5% de probabilidade.

FV	GL	SQ	QM	F
Inoculante	2	1,18	0,59	4,21*
Tempo	3	13,13	4,37	31,01**
Adubo	1	0,16	0,16	1,16 <sup>NS</sup>
Inoculante*Tempo	6	1,93	0,32	2,28*
Inoculante*Adubo	2	1,03	0,51	3,66*
Tempo*Adubo	3	0,33	0,11	0,78 <sup>NS</sup>
Inoculante*Tempo*Adubo	6	2,17	0,36	2,56*

\*\*Significativo a 1%, \* significativo a 5% e NS não significativo pelo teste F da análise de variância (ANOVA).

O tempo em conjunto com a dose de nitrogênio e o inoculante são fatores importantes quando se busca obter maiores índices de massa de matéria seca da parte aérea no cultivar de cana-de-açúcar RB867515 micropropagado (Figura 6). Observa-se que houve uma evolução no crescimento da planta ao decorrer do tempo, fator esperado devido ao estabelecimento da cultura.

Nas primeiras avaliações as plantas apresentaram desenvolvimento lento, sendo que, entre a terceira (45 dias) e quarta (60 dias) avaliação houve aumento no ganho de massa de matéria seca da parte aérea. Verificando esta característica, observou-se que houve maiores taxas de ganhos em massa de matéria seca da parte aérea no tratamento com nitrogênio em associação com a bactéria *H. seropedicae* SMR1. Nesse mesmo aspecto, o tratamento que continha a bactéria *H. seropedicae* SMR1 sem adição de nitrogênio e o tratamento com a bactéria *A. brasilense* FP2 em presença do adubo nitrogenado apresentaram ganhos similares, porém com índices menores.

Houve amplitude da resposta do cultivar micropropagado RB867515 em relação a presença de adubo nitrogenado e a variável massa seca da parte aérea (Figura 6). Observa-se distinção da obtenção de massa seca da parte aérea para o tratamento dose de nitrogênio e inoculante bacteriano. A interação de *A. brasilense* FP2 com a dose de nitrogênio apresentou resultados superiores quando comparados com o tratamento sem adição de nitrogênio, apresentando pouca variação no desvio padrão. Quando avaliamos o inoculante *H. seropedicae* SMR1, observamos uma associação dos tratamentos inoculante e adubo, assim como para o inoculante de *A. brasilense* FP2, onde houve maior ganho de massa de matéria seca da parte aérea. No tratamento controle, foi observado o oposto, a presença da adubação nitrogenada ocasionou menor desenvolvimento das plantas.

A dose de nitrogênio influenciou a interação do inoculante com o cultivar RB867515 (Figura 7). Observou-se a estreita relação entre genótipo, bactéria e dose de nitrogênio para plantas oriundas da cultura de tecidos via cultura de meristemas. Em cana-de-açúcar observa-se um grau de especificidade em relação ao genótipo quando avaliados famílias de cana-de-açúcar e inoculantes biológicos (Lopes et al., 2012). Apesar do cultivar RB867515 ser considerado responsivo a inoculação

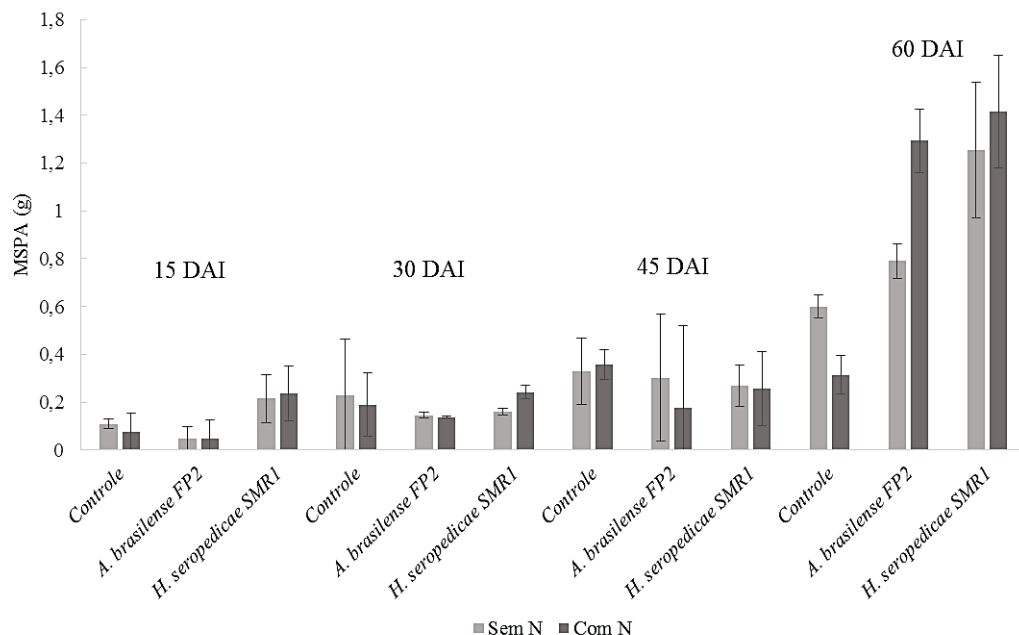
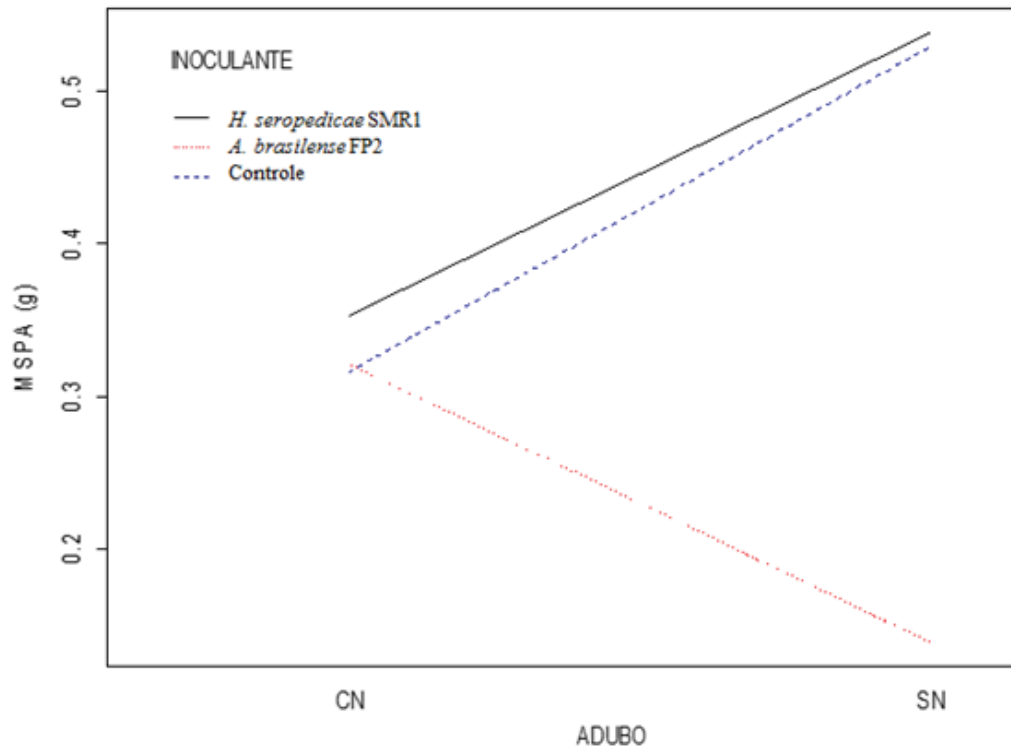


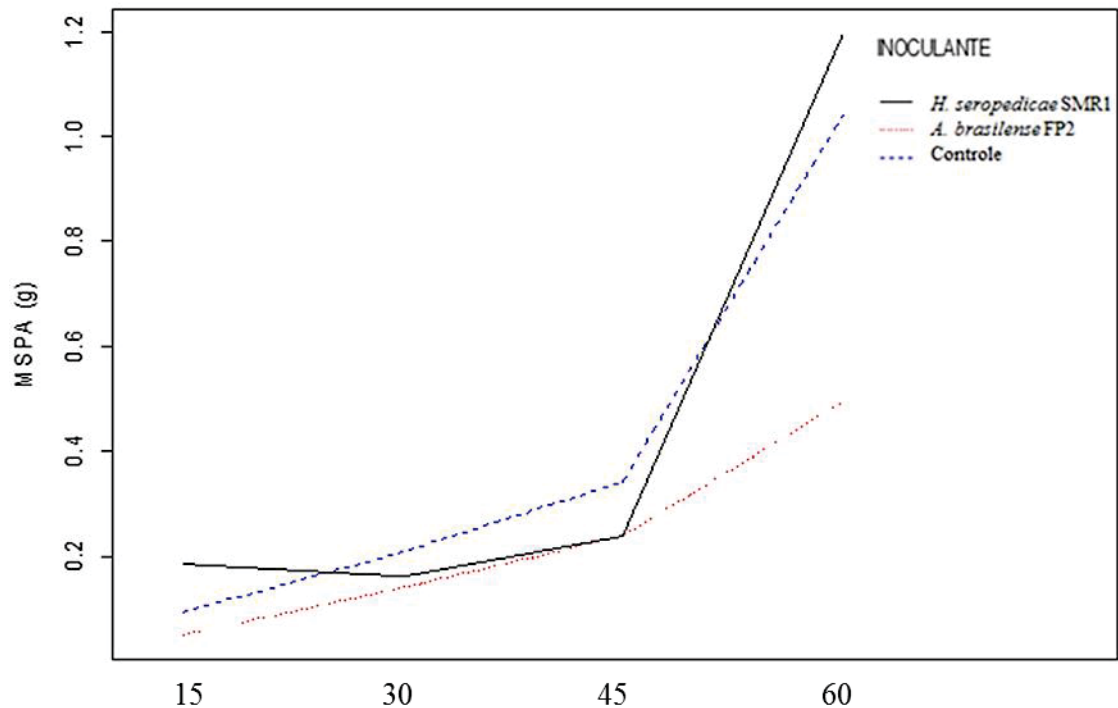
FIGURA 6: Massa seca da parte aérea ao longo de 60 dias para o cultivar RB867515 em relação aos inoculantes *A. brasilense* FP2, *H. seropedicae* SMR1, controle e presença de adubação nitrogenada. DAI: dias após a inoculação, MSPA: matéria seca da parte aérea.

bacteriana, observou-se neste trabalho que fatores como dose de nitrogênio e, possivelmente, o método utilizado para obtenção das plântulas podem afetar a interação.



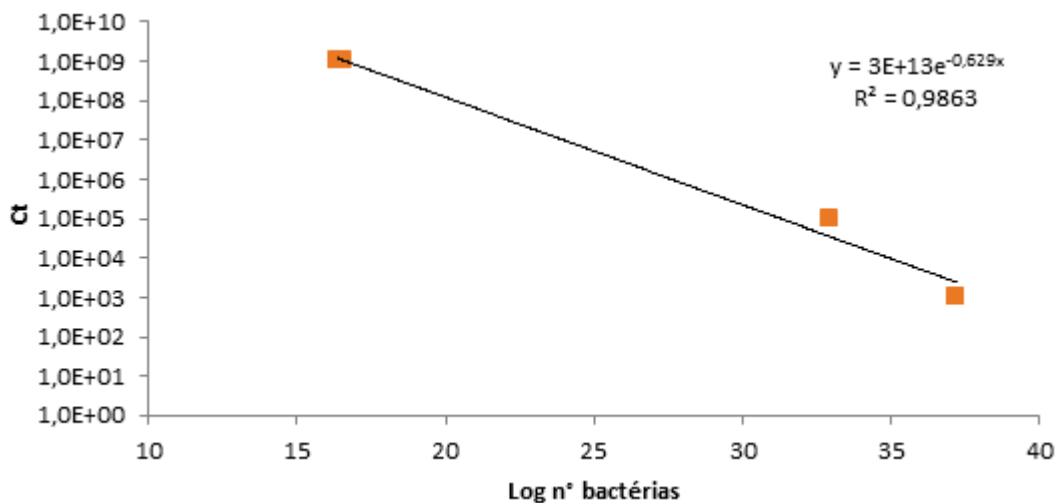
**FIGURA 7:** Produção de matéria seca sob efeito da adição de nitrogênio mineral (CN e SN) em interação com bactérias promotoras de crescimento vegetal (*A. brasilense* FP2, *H. seropedicae* SMR1 e controle) e o cultivar RB867515 oriundo de cultura de tecidos via cultura de meristemas aos 60 dias. CN: plantas adubadas com nitrogênio; SN: plantas sem fonte de nitrogênio; MSPA: matéria seca da parte aérea.

O monitoramento do ganho de massa de matéria seca da parte aérea em relação as avaliações temporais apresentaram resultados semelhantes (Figura 8), no qual os tratamentos com a bactéria *H. seropedicae* SMR1 e o controle apresentaram valores superiores ao tratamento com *A. brasilense* FP2. Entre a 3ª e a 4ª avaliação, 45 e 60 dias respectivamente, foi o período no qual houve maior ganho de massa de matéria seca da parte aérea (Figura 6). O tratamento que apresentou melhores resultados foi o com a bactéria *H. seropedicae* SMR1, seguido do controle e o tratamento com *A. brasilense* FP2.



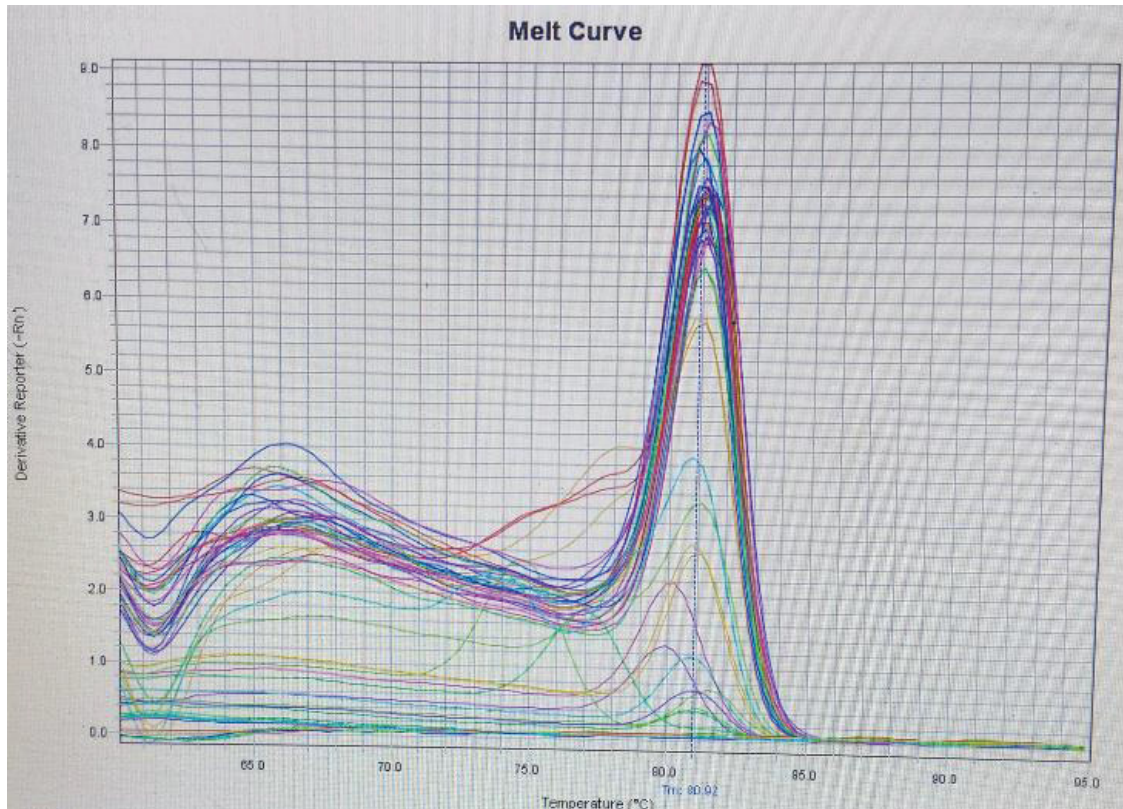
**FIGURA 8:** Monitoramento da produção de matéria seca da parte aérea ao longo de 60 dias em interação com os inoculantes bacterianos *H.seropedicae* SMR1, *A. brasilense* FP2 e controle. MSPA matéria seca da parte aérea.

A curva padrão para quantificação de DNA bacteriano por meio da PCR em tempo real foi feita utilizando raízes estéreis de plântulas micropropagadas do cultivar RB867515 em combinação com a bactéria *A. brasilense* FP2 (Figura 9). A equação da reta obtida no gráfico foi utilizada para calcular o logaritmo do número de bactérias presente nas amostras, baseado na equação da reta e usando os valores de Ct obtidos pela PCR em tempo real.



**FIGURA 9:** Curva padrão de diluição para quantificação de DNA bacteriano pela PCR quantitativa.

O iniciador utilizado na reação (primer AzoR2.1) apresentou amplificação inespecífica para algumas amostras utilizadas no experimento (Figura 10). Isto pode ser devido à falta de especificidade do mesmo, ou pela formação de dímeros do iniciador. A partir destes dados preliminares poderá ser feita nova análise em PCR tempo real com 3 etapas para verificar se ocorre a diminuição dessa amplificação inespecífica, bem como a verificação da identidade deste com a cana-de-açúcar, como ocorrido com COTTA et al., (2015) em experimento utilizando milho.

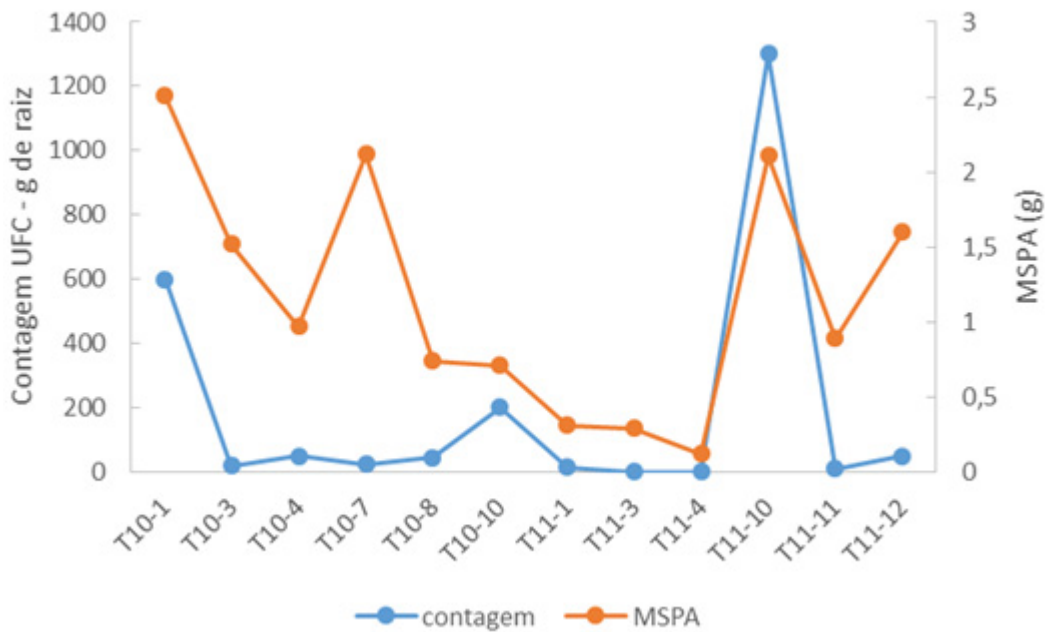


**FIGURA 10:** Gráfico da curva de melting para determinação da funcionalidade e especificidade do primer AzoR2.1 utilizado na PCR em tempo real.

As amostras C são as amostras controle e as repetições (1, 3 e 4) são os tratamentos nos quais não foi adicionado nitrogênio, já as repetições (7, 8 e 10) foi adicionado nitrogênio ( $30\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) (Figura 11). As amostras com inoculação da bactéria *A. brasilense* FP2 são as T11 (1, 3 e 4 sem adição de nitrogênio) e T11 (10, 11 e 12, com adição de nitrogênio).



**FIGURA 11:** Relação da matéria seca da parte aérea e a quantificação de DNA de *A. brasilense* FP2 por PCR quantitativa aos 60 DAI em cana-de-açúcar.



**FIGURA 12:** Relação da massa de matéria seca da parte aérea e a contagem de *A. brasilense* FP2 pelo método da microgota aos 60 DAI em cana-de-açúcar.

### 3.3 DISCUSSÃO

O nitrogênio é um fator determinante para o crescimento das plantas (TAIZ e ZEIGER, 2006), porém na interação planta-bactéria altas doses podem prejudicar a interação (OLIVEIRA et al., 2006). A aplicação de doses baixas de nitrogênio favorece a interação e mantém condições nutricionais para o desenvolvimento das plantas. Este pode ser esse um fator importante para a interação planta-bactéria, visto que a liberação de exsudatos pelas raízes para a atração de bactérias é dependente da nutrição do solo (VASSEY, 2003). Nesse sentido, condições baixas de nutrição, mas não limitantes, podem ser um importante aspecto na colonização bacteriana. A cultivar SP70-1143 em condições de solo com baixa nutrição quando inoculado com as bactérias promotoras de crescimento vegetal *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* apresentou maiores rendimentos de colmos, com resultados similares aqueles obtidos com a aplicação de adubação nitrogenada (OLIVEIRA et al. 2006).

Diversos trabalhos mostram que a variedade RB867515 é responsiva a inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal (OLIVEIRA et al., 2006; LOPES et al., 2012; GÍRIO et al., 2015). Avaliando a velocidade de formação de mudas, utilizando mudas pré-brotadas como fonte de material vegetal, observou que os tratamentos no qual foram inoculados uma mistura com cinco espécies de bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Burkholderia tropica*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*) houve um índice de velocidade de germinação superior ao tratamento controle, evidenciando o efeito positivo das bactérias sobre a brotação do cultivar RB867515 (GÍRIO et al., 2015).

A inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* sem adição de nitrogênio e com a dose de 140 Kg. ha<sup>-1</sup> deste nutriente propiciou o aumento da biomassa na cultivar micropropagada Co 86032 (MUTHUKUMARASAMY et al., 2006). A presença da bactéria *H. seropedicae* na cultivar SP70-1143 durante o período de aclimatação (45 dias) teve relação direta com a sobrevivência das plantas, sendo esta prejudicial (OLIVEIRA et al., 2002). No entanto, aos 200 DAI, houve aumento significativo de matéria seca na inoculação combinada entre *G. diazotrophicus* e *H. seropedicae*.

A inoculação de uma mistura com cinco estirpes de bactérias diazotróficas promoveu crescimento na cultivar RB867515 quando em presença da adubação



nitrogenada, já a cultivar RB72454, apresentou características não responsivas a inoculação da mistura e a adubação (SCHULTZ et al. 2012). Em ensaios em condições mais controladas com RB867515, casa de vegetação, observou-se incrementos de produtividade quando inoculada com a bactéria *A. brasilense* FP2 (LAMMEL et al. 2015). A baixa fertilidade é um fator importante para a promoção de crescimento vegetal, principalmente devido a fixação biológica de nitrogênio e pode ser de até 70%. (OLIVEIRA et al. 2003). A inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal em associação com dose de nitrogênio favorece o ganho de massa seca e o índice de área foliar para o cultivar RB92579, bem como melhora a absorção de nitrogênio, fósforo e potássio (PEDULA et al., 2016). A interação bacteriana é influenciada pelo genótipo em questão (MONTEIRO et al., 2012; LOPES et al., 2012).

A utilização do primer AzoR2.1 apresentou especificidade com a bactéria *A. brasilense* FP2 quando inoculada em ambiente competitivo (solo comum), sem esterilização, com ou sem adição de baixas doses de nitrogênio (figura 7). Foi possível detectar a presença da bactéria *A. brasilense* FP2 em ambiente controlado e competitivo, após 13 dias da inoculação (STETS et al. 2015). No entanto, o ambiente competitivo utilizado pela referida autora não apresentava a complexidade encontrada em solos onde, geralmente encontram-se as culturas. Já Cotta (2015), utilizando o mesmo primer para detecção de *A. brasilense* FP2 em milho a campo encontrou valores bacterianos próximos a  $10^4$  UFC/g raiz, ressaltando a dificuldade encontrada em monitorar por meio da PCR em tempo real as bactérias a campo, tendo em vista que diversas características presentes no solo inibem a PCR.

### 3.4 CONCLUSÃO

O inoculante bacteriano em interação com baixas doses de nitrogênio pode fornecer condições favoráveis ao crescimento das plantas. A interação genótipo vegetal e bactéria é um fator importante quando se busca otimizar a interação, visto que respostas com maior expressividade foram verificadas neste trabalho no tratamento com a bactéria *H. seropedicae* SMR1 do que quando no tratamento com *A. brasilense* FP2 para a cultivar RB867515. A aplicação de inoculantes bacterianos ainda é discutível para algumas culturas, no entanto, a inoculação de estirpes em separado pode ser uma alternativa na elucidação da interação genótipo vs bactéria.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, G. B., MACHADO, M. P., RIBEIRO, D. S., WIPPEL, H. H., BESPALHOK, J. C., OLIVEIRA, R. A., DAROS, E., Multiplicação, alongamento e enraizamento de brotações in vitro de clones de cana-de-açúcar submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido giberélico. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 5, n. 1, 2014.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, “Acompanhamento de Safra Brasileira de Cana-de-açúcar” Segundo Levantamento, agosto, 2015.
- COTTA, M. S. Monitoramento de estirpes de *Azospirillum brasilense* inoculado em culturas de milho. Dissertação (Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná), 2015.
- DOBEREINER, J., Forage grasses and grain crops. In: BERGENSEN, F. J. (Ed.). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. New York: John Wiley e Sons, p. 535-555, 1980.
- FOSTER, J. B.; CLARK, B. Ecological imperialism: The curse of capitalism. **Socialist register**, v. 40, n. 40, 2009.
- GALLOWAY, J. N., TOWNSEND, A. R., ERISMAN, J. W., BEKUNDA, M., CAI, Z., FRENEY, J. R., MARTINELLI, L. A., SEITZINGER, S. P., SUTTON, M. A., Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science**, v. 320, n. 5878, p. 889-892, 2008.
- GÍRIO, L. A. S., DIAS, F. L. F., REIS, V. M., URQUIAGA, S., SCHULTZ, N., BOLONHEZI, D., MUTTON, M. A., Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 1, p. 33-43, 2015.
- HUNGRIA, M., CAMPO, R. J., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.
- IFA, International Fertilizer Industry Association, “O Uso de Fertilizantes Minerais e o Meio Ambiente” Revised Edition, Paris, February, 2000. Disponível em: [http://www.anda.org.br/multimidia/fertilizantes\\_meio\\_ambiente.pdf](http://www.anda.org.br/multimidia/fertilizantes_meio_ambiente.pdf). Acesso em: 10 de Novembro de 2015.
- LAMMEL D. R.; BERTHOLO, H. C.; ROMANO, T. BESPALHOK J. C.; SOUZA E. M.; PEDROSA F. O. “Promoção de crescimento vegetal em cana-de-açúcar inoculada com a bactéria *Azospirillum brasilense*”. XXIX Congresso Brasileiro de Agronomia, Foz do Iguaçu-PR, 2015.
- LOPES V. R.; BESPALHOK-FILHO, J. C.; ARAUJO, L. M.; RODRIGUES, F. V.; DAROS, E.; OLIVEIRA, R.A. The Selection of Sugarcane Families That Display Better Associations with Plant Growth Promoting Rhizobacteria. **Journal of Agronomy**, v. 11 No. 2, p. 43-52, 2012.
- LUTZENBERGER, José A. O absurdo da agricultura. **Estudos avançados**, v. 15, n. 43, p. 61-74, 2001.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M.; REVATHI, G.; “N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and

Herbaspirillum sp. in micropropagated sugarcane plants”. **Microbiological Research**, v. 161, n. 3, p. 238-245, 2006.

NUNES, J. R. D., PINTO, R. S. A, TRENTO, F. E., ELIAS, A. I. Indicadores agrícolas do setor canavieiro, safra 2003/2004. Ribeirão Preto: Idea, 2005.

OLIVEIRA, A. L. M., URQUIAGA, S., DOBEREINER, J., BALDANI, J. I., The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, No. 2, p. 205-215, 2002.

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

PEDULA, R. O.; SCHULTZ, N.; MONTEIRO, R. C.; PEREIRA, W.; ARAÚJO, A. P.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Growth analysis of sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization. **African Journal of Agricultural Research**, Vol. 11, No.30, p. 2786-2795, 2016.

ROMEIRO, R.S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em suspensão. Laboratório de bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV, 2013.

SCHROEDER, B., WOOD, A., MOODY, P.W., BELL, M.J., GARSIDE, A.L., Nitrogen fertiliser guidelines in perspective. **Proc. Aust. Sugar Cane Technol.** Vol. 27, No. 291–304, 2005.

SILVA, C. M., VIEIRA, R. A., SOUTO, E. R., HATA, F. T., MACHADO, M. F. P. S., MARCUZ, F. S., Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e cinetina na micropropagação in vitro das variedades rb867515 e rb855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital**, v. 4, n. 1, 2009.

SPOLAOR, L. T, GONÇALVES, L. S. A., SANTOS, O. J. A. P. dos, OLIVEIRA, A. L. M. de SCAPIM, C. A., BERTAGNA, F. A. B., & KUKI, M. C. Bactérias promotoras de crescimento associadas a adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônômico de milho pipoca “<https://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.330>” **Bragantia**, 75(1), 33-40. Epub January 08, 2016.

STETS, M. I., ALQUERES, S. M. C., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., SCHMID, M., HARTMANN, A., CRUZ, L. M. “Quantification of Azospirillum brasilense FP2 Bacteria in Wheat Roots by Strain-Specific Quantitative PCR.” **Applied and Environmental Microbiology**, October 2015 v. 81 n°. 19, 2015

SUTTON, M. A., OENEMA, O., ERISMAN, J. W., LEIP, A., GRINSVEN, H. V., WINIWARTER, W., (2011) Too much of a good thing. **Nature**, v. 472, n. 7342, p. 159-161, 2011.

VESSEY, J. Kevin. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

**Capítulo 2:** Promoção de crescimento em cultivares micropropagadas de cana-de-açúcar frente a inoculação com *Azospirillum brasilense* FP2 e *Herbaspirillum seropedicae* SMR1.

## RESUMO

O elevado uso de fertilizantes nitrogenados associado a baixa absorção pelas plantas causa sérios danos ao meio ambiente. Alternativas sustentáveis ao uso de fertilizantes tem sido buscada, com grande foco nas bactérias promotoras de crescimento vegetal. Nesse sentido o objetivo deste trabalho foi avaliar a promoção de crescimento das cultivares micropropagadas RB867515 RB855156 e RB966928 de cana-de-açúcar, inoculadas com as bactérias *Azospirillum brasilense* FP2 e *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. Foi conduzido um experimento em casa de vegetação com delineamento inteiramente casualizado com três tratamentos (plantas controle, plantas inoculadas com *A. brasilense* FP2 e plantas inoculadas com *H. seropedicae* SMR1). Após 60 dias foi avaliado a massa seca de raízes e da parte aérea. Foi verificado promoção de crescimento nas cultivares RB867515 e RB855156 tanto para massa seca da parte aérea, quanto para a massa seca de raiz. O cultivar RB966928 apresentou baixas respostas as condições experimentais. A massa seca total para a cultivar RB867515 apresentou ganhos de 31,7% quando inoculada com *H. seropedicae* SMR1 e 28,7% quando inoculada com *A. brasilense* FP2 comparada ao tratamento controle. Já a cultivar RB855156 apresentou maior massa seca de raiz quando inoculada com *A. brasilense* FP2 (14,1%). Conclui-se que a interação genótipo-bactéria pode ser influenciada pelo genótipo vegetal, e, melhores ganhos foram observados no cultivar RB867515 quando inoculada com *H. seropedicae* SMR1. A cultivar RB966928 deverá ser foco de novos estudos visto a baixa responsividade as condições testadas no experimento.

**Palavras-chave:** interação planta-bactéria. promoção de crescimento. Genótipos de cana-de-açúcar.

**Chapter 2:** Promotion of growth in micropropagated cultivars of sugar cane front of inoculation with diazotrophic bacteria.

### **ABSTRACT**

The high use of nitrogen fertilizers associated with low absorption by plants cause serious environmental damages. Sustainable alternatives to the use of fertilizers has been pursued with great focus in the bacteria that promote plant growth. In this sense, the objective of this study was to evaluate the growth promotion of micropropagated cultivars RB867515, RB855156 and RB966928 of sugarcane inoculated with bacteria *Azospirillum brasilense* FP2 and *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. An experiment was conducted in a greenhouse with a completely randomized design in a factorial 3x3 with three treatments (control plants, plants inoculated with *A. brasilense* FP2 and plants inoculated with *H. seropedicae* SMR1). After 60 days was evaluated the dry weight of roots and shoots. Growth promotion was observed in cultivars RB867515 and RB855156 for both shoot dry mass and root dry mass. The cultivar RB966928 showed low responses to the experimental conditions. The total dry mass for cultivar RB867515 showed gains of 31.7% when inoculated with *H. seropedicae* SMR1 and 28.7% when inoculated with *A. brasilense* FP2 compared to the control treatment. The cultivar RB855156 showed a higher dry root mass when inoculated with *A. brasilense* FP2 (14.1%). It is concluded that the genotype-bacterial interaction can be influenced by the plant genotype, and better results were observed in cultivar RB867515 when inoculated with *H. seropedicae* SMR1. The cultivar RB966928 should be focus of novel studies since the low responsiveness of the conditions tested in the experiments.

**Key-words:** Plant-bacteria interaction. plant growth promotion. sugar cane genotype.

## 4 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma das melhores opções dentre as fontes de energias renováveis, produção de açúcar e biomassa, sendo o Brasil o maior produtor mundial (MAULE et al., 2001). De acordo com o *United States Department of Agriculture* (USDA) o país é o maior produtor e exportador de açúcar e o segundo maior produtor de etanol do mundo. Em 2012 o setor sucroalcooleiro foi responsável por aproximadamente 2% PIB nacional e 31% do PIB relacionado a agricultura no Brasil (Procana), empregando 4,5 milhões de pessoas (BIOSEV, 2013).

A importância que a cultura assume no cenário nacional e internacional favorece a busca por novas técnicas de cultivo com o objetivo de atender as demandas de questões sobre sustentabilidade e competitividade bem como viabilidade econômica. No entanto, é necessário o cumprimento e ou adequação a três questões chaves da cadeia produtiva, como, o aumento de produtividade, redução de custos e minimizar os impactos sócio-ambientais causados pela cultura atualmente.

O uso de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal corrobora com essas características, auxiliando o desenvolvimento da cultura pela fixação de nitrogênio, diminuindo a necessidade de fornecimento deste elemento via fertilizantes; produção de fitohormônios, responsáveis pelo incremento na produção de raízes e maior tolerância a variações ambientais e a aspectos como a indução de resistência sistêmica nas plantas. As rizobactérias *H. seropedicae* e *A. brasilense* são de rizobactérias promotoras e são frequentemente utilizadas em plantas da família Poacea, com destaque para o trigo e o milho (HUNGRIA et al., 2010; MONTEIRO et al., 2012; LOPES et al., 2013; STETS et al., 2015), apresentando potencial para aplicação em cana-de-açúcar.

A interação entre as bactérias *A. brasilense* e *H. seropedicae* com os cultivares de cana-de-açúcar é altamente dependente do genótipo (LOPES et al., 2012; MONTEIRO et al., 2012), e pouco se sabe sobre os efeitos dessas bactérias nos cultivares pertencentes ao grupo RIDESA mais plantadas no Brasil. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a interação de três cultivares de cana-de-açúcar, RB855156, RB867515 e RB966928, com a inoculação das bactérias promotoras de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* FP2 e *Herbaspirillum seropedicae* SMR1.

## 4.1 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1.1 Material vegetal

Com o objetivo de eliminar fontes endofíticas de microrganismos prosseguiu-se com a cultura de meristemas, visto que a mesma, por retirar assepticamente pequenos fragmentos de tecidos vegetais, é conhecida por fornecer material vegetal de alta qualidade e asséptico. O método consiste na germinação de mini-toletes de cana-de-açúcar que são colocadas em bandejas e armazenadas por 48 horas a temperatura de 38°C com elevada umidade para ocorrer o intumescimento das gemas e auxiliar a brotação. Após esse período na estufa o material é retirado e então exposto as condições ambientais da casa de vegetação, sendo regado quando necessário. Ao atingir uma altura de 10 a 15 centímetros inicia-se o processo de obtenção dos meristemas, que consiste no corte da brotação rente ao mini-tolete, sendo este levado ao laboratório, onde é inicialmente feita assepsia e, em seguida o processo de extração de meristema em cabine de fluxo laminar.

O processo foi dividido em etapas, sendo elas: 1ª corte para diminuir o tamanho inicial, no qual foi utilizado somente a base da brotação; 2ª assepsia com álcool 70% por 1 minuto; 3ª assepsia com hipoclorito 2,5%, adicionando-se duas gotas de tween 20 por 2 minutos; 4ª lavagem em água deionizada estéril de 3 a 5 vezes; 5ª para a retirada do meristema, o mesmo é banhado na placa de petri por uma solução de cisteína com concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup> para evitar oxidação do material vegetal (ALCANTARA et al., 2014).

Após a retirada do meristema e colocação em frasco com meio de cultura, o mesmo é levado a sala de crescimento climatizada e mantido no escuro por uma semana para evitar fotodegradação. Após esse período é retirado e mantido em luminosidade com fotoperíodo e temperatura controlados, que dentro de algumas semanas estará pronto para prosseguir com as etapas de multiplicação.

A partir dos explantes regenerados foi feita a multiplicação dos mesmos em meio de cultivo composto de meio MS adicionado de 0,2 mg. L<sup>-1</sup> de BAP e 0,1 mg. L<sup>-1</sup> KIN (SILVA et al., 2009) para obtenção de número desejado de material vegetal para uso nos experimentos. Diferentes anti-oxidantes foram testados para verificar a eficiência no controle da oxidação da cultura de meristema, principalmente na cultivar RB867515, sendo o que apresentou melhor resultado foi a adição de cisteína durante



a excisão do meristema (dados não apresentados). As cultivares micropropagadas utilizadas foram RB855156, RB867515 e RB966928.

#### 4.1.2 Preparo do inoculante e inoculação

No experimento foram utilizadas as bactérias promotoras de crescimento vegetal *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SMR1, ambas cedidas pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR – Curitiba. O inoculante de *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SMR1 foram preparados separadamente a partir de uma solução com concentração de  $1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>. O inoculante composto de *A. brasilense* foi cultivado em meio líquido NFbHPN (DOBEREINER, 1980), respeitando a relação de 1:5, volume de meio de cultura: volume do frasco, em meio de cultura contendo lactato de sódio como fonte de carbono com concentração final de 5 mg.L<sup>-1</sup>, mantendo a temperatura ótima de crescimento da cultura em 30°C até atingir densidade óptica entre 1,5 e 1,8 (DO<sub>600</sub>), que ocorre por volta de 48 horas de crescimento, correspondendo a aproximadamente  $10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>. A preparação do inoculante de *H. seropedicae* SMR1 utiliza o mesmo meio de cultivo do *A. brasilense* FP2 descrito acima, porém, como fonte de carbono é utilizado o ácido málico, 5 mg.L<sup>-1</sup>, mantendo as mesmas condições de crescimento e agitação orbital com 120 rpm a 30°C. O processo de contagem bacteriana é o mesmo para ambas as bactérias. A inoculação foi feita pipetando 1 mL do inoculante bacteriano com concentração de  $10^9$  células por mililitro no respectivo tratamento, sendo que o controle recebeu meio de cultivo estéril. A inoculação foi feita utilizando-se de pipetador automático, 30 minutos antes do transplante das plântulas para os vasos contendo vermiculita.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação onde foram avaliados o acúmulo de massa seca da parte aérea e das raízes em interação com o genótipo vegetal, bem como avaliado o desdobramento desta interação. No experimento foram utilizadas três variedades micropropagadas de cana-de-açúcar, RB855156, RB867515 e RB966928, com três tratamentos, sendo o T1 o controle, com adição de meio de cultivo estéril; o T2 com adição de *Azospirillum brasilense* FP2 e o T3 com adição de *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. A inoculação dos três tratamentos foi feito nos tubos de ensaio, onde as plântulas estavam armazenadas e após 30 minutos foi realizado o transplante para vasos com capacidade de 2 litros com vermiculita autoclavada. Para fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento das

plântulas foi adicionado semanalmente solução de Sarruge (1975), sem adição de nitrogênio e a cada 15 dias era adicionado a mesma solução, porém, com nitrogênio. A coleta do experimento foi realizada 60 dias após a inoculação (DAI), onde foi feita a matéria seca da parte aérea e raiz e a matéria seca total. A determinação da matéria seca foi feita mantendo as plantas em estufa com circulação de ar forçado a 65°C até obterem peso constante.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 3, onde foram avaliados três cultivares de cana-de-açúcar micropropagadas, RB855156, RB867515 e RB966928 com três inoculantes, *A. brasilense* FP2, *H. seropedicae* SMR1 e controle (adição de meio de cultivo bacteriano estéril).

## 4.2 RESULTADOS

### 4.2.1 Massa seca da parte aérea

A inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal apresentou efeito nos tratamentos. Foram encontradas diferenças estatísticas, a 1% de probabilidade, entre os cultivares para obtenção da massa de matéria seca da parte aérea (Tabela 1).

TABELA 6: Análise de variância da massa de matéria seca da parte aérea para os cultivares RB867515, RB855156 e RB966928.

Fonte	GL	SQ	QM	F
Cultivar	2	1164	582	86.87 **
Inoculante	2	55	27	4.10 *
Cultivar*Inoculante	4	130	32	4.84 **

\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, \* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F da análise de variância.

Houve efeito significativo para o fator cultivar, para o fator inoculante e a interação entre estes (Tabela 2). O desdobramento do fator inoculante aborda o efeito dos inoculantes na obtenção da massa de matéria seca da parte aérea nos cultivares micropropagados de cana-de-açúcar RB855156, RB867515 e RB966928 (Tabela 3).

TABELA 7: Análise de variância da massa seca da parte aérea para os fatores cultivar, inoculante e sua interação.

Fonte	GL	SQ	QM	F
Cultivar	2	1164,28	582,14	86,87***
Inoculante	2	54,96	27,48	4,10**
Cultivar*Inoculante	4	129,86	32,46	4,84**

\*\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F, \*\* significativo a 5% de probabilidade pelo teste F da análise de variância.

O desdobramento do fator inoculante aborda o efeito que cada inoculante provoca na obtenção da massa de matéria seca da parte aérea nos cultivares micropropagados de cana-de-açúcar RB855156, RB867515 e RB966928 (Tabela 3).

TABELA 8: Efeito da interação do inoculante para obtenção da massa de matéria seca da parte aérea obtidos pelo teste F da análise de variância.

Fonte	GL	SQ	QM	F
<i>A. brasilense</i> FP 2	2	507,27	253,63	37,85***
<i>H. seropedicae</i>	2	277,28	138,64	29,83***
SMR1				
Controle	2	533,83	266,91	20,69***

\*\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F da análise de variância (ANOVA).

Comparando as médias das variáveis da massa seca da parte aérea (MSPA), de raiz (MSR) e total (MST) verificamos que houve variação na resposta dos cultivares em relação a massa de matéria seca para as variáveis analisadas (Tabela 4). O cultivar RB867515, que apresentou médias superiores para as variáveis MSR e MST. A MSPA, também apresentou valores de médias superiores aos dois outros cultivares, porém, sem diferença estatística para o cultivar RB855156.

TABELA 9: Comparação de médias para a variável massa de matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz e matéria seca total em relação ao fator cultivar.

Cultivar	Média MSPA	Média MSR	Média MST
RB867515	8,60 <sup>A</sup>	18,75 <sup>A</sup>	27,35 <sup>A</sup>
RB855156	7,73 <sup>A</sup>	8,52 <sup>B</sup>	16,26 <sup>B</sup>
RB966928	0,57 <sup>B</sup>	1,97 <sup>C</sup>	2,54 <sup>C</sup>

Médias com a mesma letra não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise comparativa considerando a porcentagem de massa de matéria seca do cultivar RB867515 em relação ao RB855156, o cultivar RB867515 apresentou 11,25% a mais de MSPA, 120,07% para MSR e 68,20% para MST quando comparado com o cultivar RB855156.

#### 4.2.2 Massa seca de raiz

O fator inoculante e a interação cultivar e inoculante não apresentaram valores significativos com 1% de significância. (Tabela 5).

TABELA 10: Avaliação dos fatores inoculante e cultivar e a interação para obtenção da massa seca de raiz.

Fonte	GL	SQ	QM	F
Cultivar	2	4201	2100,5	93,78***
Inoculante	2	7,01	3,5	0,16 <sup>NS</sup>
Cultivar*Inoculante	4	183,77	45,94	2,05 <sup>NS</sup>

\*\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F da análise de variância.

O fator cultivar e a interação com o inoculante apresentaram significância estatística a 1% e a 5%, respectivamente (tabela 6). Ao verificar a influência dos inoculantes nos cultivares de cana-de-açúcar, nota-se que não há diferença estatística entre estes tratamentos (tabela 7). No entanto, quando é verificado o contrário, ou seja, o efeito que a variedade apresenta frente ao inoculante (tabela 8), houve variação na resposta do cultivar.

TABELA 11: Análise de variância em fatorial dos fatores inoculante e cultivar e sua interação para massa seca total.

Fonte	DF	SQ	QM	F
Cultivar	2	9231,49	4615,74	109,22 ***
Inoculante	2	94,769	47,384	1,12 <sup>NS</sup>
Cultivar*Inoculante	4	582,135	145,533	3,44 **

\*\*\* Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F da análise de variância, \*\* significativo a 5% pelo teste F.

Quando avaliado o fator inoculante composto com os tratamentos inoculados com *A. brasilense* FP2, *H. seropedicae* SMR1 e controle, estes diferiram entre si, mas não apresentaram diferença estatística significativa para a massa seca total. (Tabela 8).

TABELA 12: Efeito do inoculante nos cultivares para obtenção da matéria seca total.

Inoculante	DF	SQ	QM	F
<i>H. seropedicae</i> SMR 1	2	3477,04	1738,52	41,14 <sup>NS</sup>
<i>A. brasilense</i> FP2	2	1695,67	847,83	20,06 <sup>NS</sup>
Controle	2	4672,98	2336,99	53,30 <sup>NS</sup>

NS não significativo pelo teste F da análise de variância.

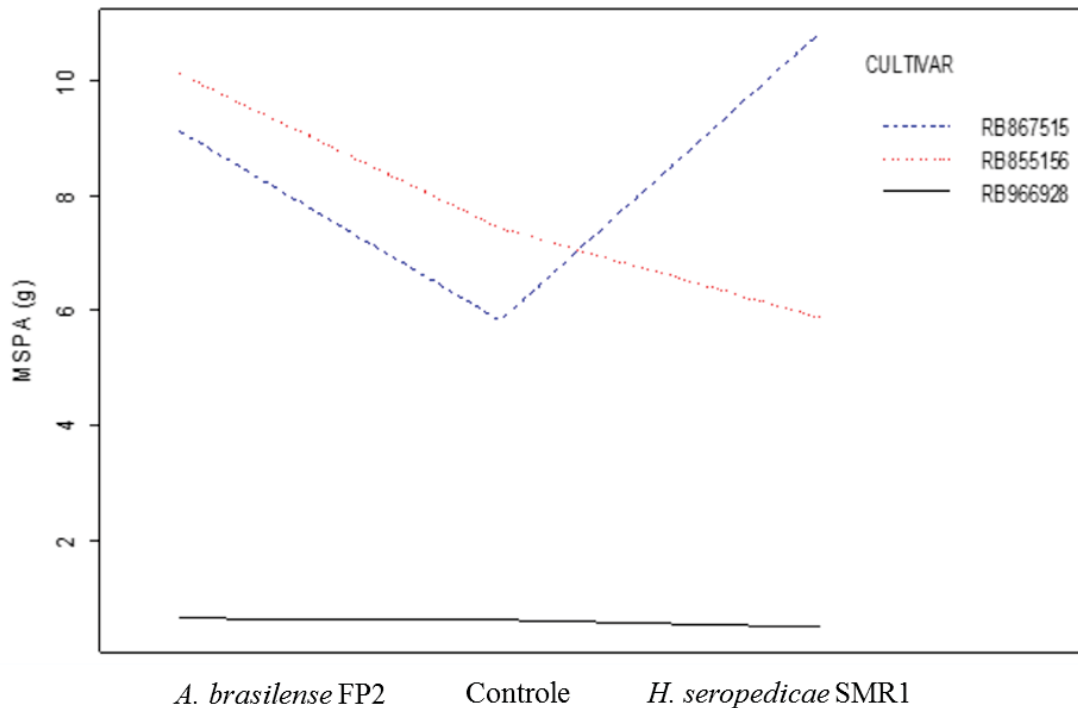
Os inoculantes bacterianos não apresentaram diferença estatística significativa pelo teste F da análise de variância (Tabela 7), no entanto, há evidências de diferença estatística entre os cultivares para a massa de matéria seca total (Tabela 8).

TABELA 13: Análise de variância em fatorial dos cultivares em relação aos inoculantes.

Cultivar	GL	SQ	QM	F
RB867515	2	479,22	239,61	5,67***
RB855156	2	117,26	58,69	1,39 <sup>NS</sup>
RB966928	2	48,58	24,29	0,57 <sup>NS</sup>

\*\*\* Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, da análise de variância.

Os cultivares apresentaram diferentes respostas em relação aos inoculantes bacterianos utilizados no experimento (Figura 1). O cultivar que obteve maiores valores de massa seca da parte aérea foi o RB867515 quando em interação com a bactéria *H. seropedicae* SMR1. Este também apresentou interação com a bactéria *A. brasilense* FP2, no entanto obteve valores médios inferiores ao primeiro. Em relação ao cultivar RB855156 a melhor resposta para a interação foi com a bactéria *A. brasilense* FP2, seguido pelo tratamento controle (meio de cultura bacteriano estéril).

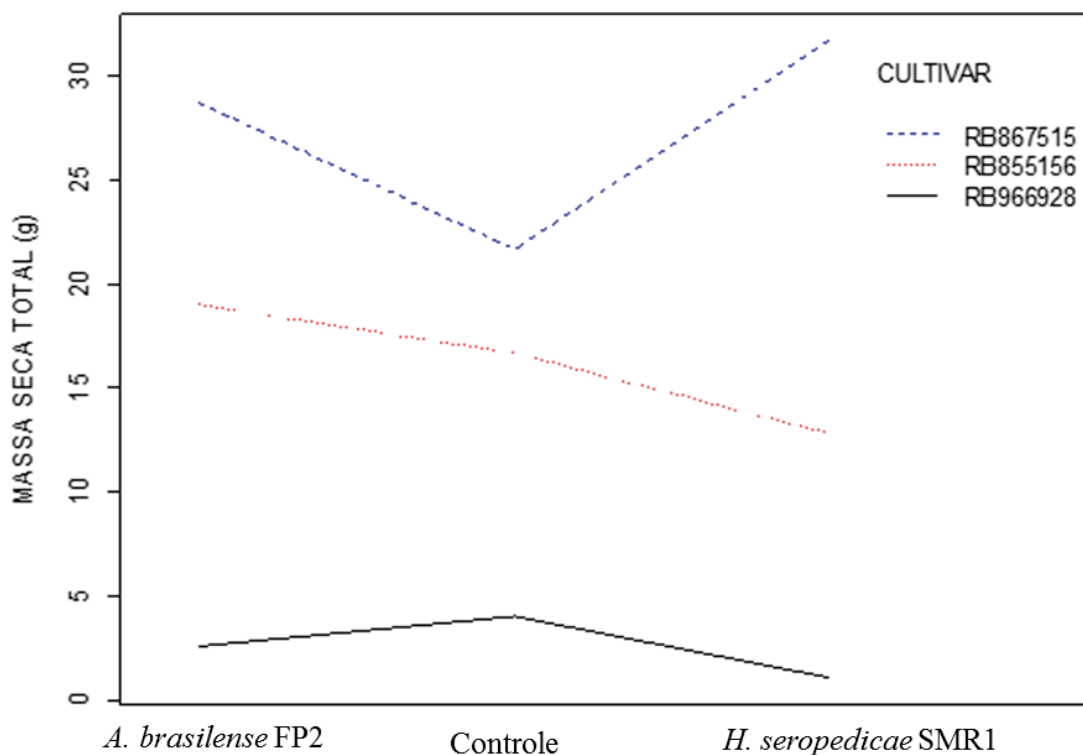


**FIGURA 13:** Produção de matéria seca parte aérea indica comportamento dos cultivares de cana-de-açúcar RB867515, RB855156 e RB966928 em relação aos inoculantes bacterianos (*A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SMR1 e controle). MSPA: massa seca da parte aérea aos 60.

O cultivar RB966928 apresentou baixa produção de matéria seca durante os experimentos de inoculação bacteriana. Houve variação de massa de matéria seca

em relação aos inoculantes, mas nos tratamentos utilizados (*A. brasilense* FP2, *H. seropedicae* SMR1 e controle) apresentou dados não responsivos e com baixo acúmulo de massa de matéria seca quando comparado aos outros cultivares.

Na interação genótipo bactéria, utilizando os dados de MSPA (Figura 1) podemos classificar a interação em positiva, no qual a presença do inoculante influencia o ganho de massa seca; neutra, onde este não afeta o ganho de MSPA e deletéria ou prejudicial, prejudicando o ganho de MSPA dos cultivares. Sendo assim, o inoculante bacteriano composto de *H. seropedicae* SMR1 foi positivo para o cultivar RB867515, o com *A. brasilense* FP2 foi positivo para o cultivar RB855156 e RB966928. De forma neutra, observamos o inoculante *H. seropedicae* SMR1 e o genótipo RB966928 e negativa com *H. seropedicae* SMR1 e o cultivar RB855156.



**FIGURA 14:** Produção de matéria seca parte aérea indica comportamento dos cultivares de cana-de-açúcar RB867515, RB855156 e RB966928 em relação aos inoculantes bacterianos (*A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SMR1). MST: massa seca total aos 60 dias.

O cultivar RB867515 em interação com a bactéria *H. seropedicae* SMR1 apresentou valores de médias maiores de massa seca total (MST) em relação aos demais tratamentos (Figura 2). O cultivar RB867515 apresentou valores de médias para os inoculantes superiores ao tratamento controle, sendo destaque a interação com a bactéria *H. seropedicae* SMR1. O cultivar RB855156 apresentou maiores valores de MST quando em interação com a bactéria *A. brasilense* FP2, sendo que o

comportamento foi prejudicial quando inoculada com *H. seropedicae* SMR1. O cultivar RB966928 apresentou valores ligeiramente maiores para o tratamento controle, seguido para o com a bactéria *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SMR1. A interação deste cultivar com a bactéria *H. seropedicae* SMR1 apresentou valores abaixo do obtido para os outros cultivares utilizados neste experimento.

### 4.3 DISCUSSÃO

O genótipo vegetal é um importante fator quando se busca excelência em resultados de inoculação bacteriana, haja visto a grande diversidade de resposta frente a estes inoculantes. A interação genótipo e bactérias promotoras de crescimento é um importante fator quando se busca a melhor performance dos inoculantes a campo, haja vista a variação encontrada nos trabalhos com inoculação bacteriana (URQUIAGA et al 1992), seja por meio de inoculação única (presença de uma única bactéria) ou inoculação em conjunto (presença de 2 ou mais bactérias) (MOUTIA et al. 2010; LOPES et al. 2012; SCHULTZ et al. 2012).

Nas inoculações isoladas das bactérias *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SMR1 com as três cultivares (RB867515, RB855156, RB966928) foi possível observar a resposta diferencial na interação entre genótipos com bactérias promotoras de crescimento vegetal em cana-de-açúcar. O cultivar RB867515 apresentou responsividade para as características matéria seca da parte aérea e matéria seca total no tratamento com a bactéria *H. seropedicae* SMR1 e a bactéria *A. brasilense* FP2.

O cultivar RB867515 é um genótipo responsivo a interação com bactérias promotoras de crescimento. No experimento de campo, apresentou responsividade ao inoculante bacteriano (mistura com 5 bactérias – *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*) e a dose de nitrogênio de 120 kg ha<sup>-1</sup> na segunda soqueira para a produtividade de colmos (SCHULTZ et al., 2012). Em contrapartida o progenitor materno, o cultivar RB72454, não responde com aumento da produtividade de colmos nos tratamentos inoculante e dose de nitrogênio, que de acordo com os autores isso pode ser devido à baixa exigência do cultivar aos ambientes de produção. A resposta diferencial dos cultivares as bactérias promotoras de crescimento pode estar ligada a características genótípicas (BODDEY et al., 2001; LOPES et al., 2012 e MONTEIRO et al., 2012). A inoculação bacteriana promove o aumento do acúmulo de biomassa, porém valores diferentes foram observados entre diferentes cultivares utilizadas no experimento (PEREIRA et al. 2013).

O tipo de bactéria e a complexidade na qual é feita a inoculação também reflete na resposta interação. A resposta da inoculação de duas misturas bacterianas em cultivares micropropagadas de cana-de-açúcar verificou que o mistura com 5 bactérias apresentou melhores resultados quando comparado com o composto por 3 bactérias, sendo elas *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *Gluconacetobacter*



*diazotrophicus* (OLIVEIRA et al., 2003). A complexidade das inoculações múltiplas parece ser influenciada mesmo quando considerado estirpes de uma mesma espécie. A inoculação com a bactéria *A. brasilense* (nomeada de IC26) apresentou valores menores de características relacionadas à produtividade quando comparado ao tratamento com 3 estirpes de *A. brasilense* - Triazo® (bv5, bv6 e bv7), indicando que a (LOPES et al. 2012).

A adubação também pode ter efeitos na interação. A adição de isolados bacterianos frente a adubação nitrogenada resultou em incrementos de produtividade da cultura (SALA et al., 2007). A condição sem adubação nitrogenada e inoculado superou em quase 50% o tratamento controle, culminando em ganhos para o produtor e a consequente redução do uso de adubos nitrogenados nos ambientes de produção.

A inoculação bacteriana promove o aumento do acúmulo de biomassa, porém valores diferentes foram observados entre diferentes cultivares utilizadas no experimento (PEREIRA et al. 2013). No entanto, uma dificuldade observada em relação ao material vegetal foi a utilização de plântulas oriundas da cultura de tecidos, que devido a mudança de ambiente *in vitro* para *in vivo* mesmo em condições controladas (vermiculita e adição de solução nutritiva) requer maior período de aclimatização.

As características genóticas são importantes fatores que devem ser levados em consideração na escolha de inoculantes biológicos para as culturas em geral, bem como para a cultura da cana-de-açúcar, visto a estreita relação entre o genótipo e bactéria (MUNOZ-ROJAS e CABALLERO-MELLADO, 2003; OLIVEIRA et al., 2006; LOPES et al., 2012 e MONTEIRO et al., 2012).

#### 4.4 CONCLUSÃO

A inoculação de *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SMR1 promoveu incrementos de massa seca da parte aérea e de raiz, principalmente no cultivar RB867515. Os resultados obtidos por este trabalho evidenciam a estreita relação entre genótipo vegetal e bactérias promotoras de crescimento vegetal, visto as diferenças na obtenção de matéria seca observadas entre os cultivares RB867515, RB966928 e RB855156.

O cultivar RB966928 apresentou resultados inferiores aqueles obtidos com os outros dois genótipos, devendo ser alvo de futuros ensaios, visto que é um cultivar recém lançado e ainda carece de estudos quanto ao uso de inoculantes bacterianos.

#### **4.5 CONCLUSÕES GERAIS**

A presença do nitrogênio afeta a interação planta-bactéria e fatores relacionados ao genótipo são mais relevantes na interação. Os programas de melhoramento genético apresentam papel fundamental na prospecção de materiais genéticos que apresentem maior responsividade aos inoculantes, frente a diversidade genética que possuem nos campos de seleção.

Ainda faltam evidências que comprovem os efeitos da aplicação de inoculantes no campo para a cultura da cana-de-açúcar, dada a tamanha diversidade nos ambientes de produção e também aos genótipos. Porém, resultados animadores mostram o potencial que estas bactérias possuem, até mesmo quando avaliadas a campo, em ambiente competitivo. No entanto, as vantagens relacionadas a promoção de crescimento se deparam em mudanças na estruturação de plantio e adubação e também na adoção de novas tecnologias, podendo impactar, em um primeiro momento, no aumento de custos, que pode ser decisivo na implantação e adoção da tecnologia para a cultura da cana-de-açúcar.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

BASHAN, Y; DE-BASHAN, Luz E. Chapter two-how the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. **Advances in agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.

BIOSEV, A Louis Dreyfus Commodities Company. Disponível em: [http://ri.biosev.com/biosev/web/conteúdo\\_pt.asp?idioma=0&conta=28&tipo=30884](http://ri.biosev.com/biosev/web/conteúdo_pt.asp?idioma=0&conta=28&tipo=30884).

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique for the quantification of the contribution of  $\text{N}_2$  fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.889-895, 2001.

HUNGRIA, M; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil (Print)**, v. 331, p. 413-425, 2010.

LOPES, V. R., BESPALHOK, J. C., ARAUJO, L. M., RODRIGUES, F. V., DAROS, E., OLIVEIRA, R. A. The selection of sugarcane families that display better associations with Plant Growth Promoting Rhizobacteria. **Journal of Agronomy**, v. 11, n. 2, p. 43, 2012.

MAULE, R. F., MAZZA, J. A., MARTHA JÚNIOR, G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 2, p. 295-301, 2001.

MONTEIRO, R. A. BALSANELLI, E. WASSEN, R. MARIN, A. M. BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C. SCHMIDT, M. A. TADRA-SFEIR, M. PANKIEVICZ, V. C. S. CRUZ, L. M., CHUBATSU, L. S. PEDROSA, F. O. SOUSA, E. M. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, 2012.

MOUTIA, J.F.Y.; SAUMTALLY S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and soil**, v. 337, n. 1-2, p. 233-242, 2010.

MUNOS-ROJAS, J. and CABALLERO-MELLADO, J. "Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and effect on plant grow". **Microbial. Ecol.**, 45: 454-464, 2003.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, I. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil** (2006) 284:23–32, DOI 10.1007/s11104-006-0025-0, 2006.

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

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; and BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 1, p. 105-114, 1992.

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

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

STETS, M. I.; ALQUERES, S. M.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; SCHMID, M.; CRUZ, L. M.; Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 Bacteria in Wheat Roots by Strain-Specific Quantitative PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6700-6709, 2015.

## REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, G. B., MACHADO, M. P., RIBEIRO, D. S., WIPPEL, H. H., BESPALHOK, J. C., OLIVEIRA, R. A., DAROS, E., Multiplicação, alongamento e enraizamento de brotações in vitro de clones de cana-de-açúcar submetidos a diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e ácido giberélico. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 5, n. 1, 2014.
- ARYA, M.; SHERGILL, I. S.; WILLIAMSON, M.; GOMERSALL, L.; ARYA, N.; PATEL, H. R. H. "Basic principles of real-time quantitative PCR". **Expert review of molecular diagnostics**, v. 5, n. 2, p. 209-219, 2005.
- BABALOLA, O. O.; "Beneficial bacteria of agricultural importance". **Biotechnology Letters**, 2010 Nov. 32 (11):1559-70. doi: 10.1007/s10529-010-0347-0. 2010.
- BALDANI, J. I., BALDANI, V., SELDIN, L., & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 36(1), p.86-93. 1986.
- BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and Burkholderia spp.. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, v.485–491, 2000.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **An Acad Bras Cienc**, v. 77, n. 3, p. 549-79, 2005.
- BASHAN, Y; DE-BASHAN, Luz E. Chapter two-how the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. **Advances in agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.
- BIOSEV, A Louis Dreyfus Commodities Company. Disponível em: [http://ri.biosev.com/biosev/web/conteúdo\\_pt.asp?idioma=0&conta=28&tipo=30884](http://ri.biosev.com/biosev/web/conteúdo_pt.asp?idioma=0&conta=28&tipo=30884).
- BLACKBURN, F. Sugar-cane. **Tropical Agriculture Series** 1º Edição, Longman, London and New York, 414 p. 1984.
- BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique for the quantification of the contribution of  $\text{N}_2$  fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.889-895, 2001.
- BRAGATO, I. R., ALVES CORRÊA, D., dos SANTOS, M. R. & OSWALDO, C. Y., Responsabilidade Social Corporativa No Setor Sucroalcooleiro: Um Estudo Sobre Percepções Das Externalidades Junto Ao Público Externo. DOI: 10.15600/1679-5350/rau. v10n3p162-182. **Revista de Administração da Unimep-Unimep Business Journal-B2**, v. 10, n. 3, p. 162-182, 2012.
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M.; Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria – RS, v.30, n.2, p. 365-372, 2000.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C. Nitrogênio e enxofre na cultura da cana-de-açúcar. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S.; VITTI, G. C. (Eds.). Nitrogênio e Enxofre na Agricultura Brasileira. Piracicaba: **International Plant Nutrition Institute**, p. 349–412, 2007.

CHUBATSU, L. S.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; OLIVEIRA, M. A. S.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; BONATTO, A. C.; HUERGO, L. F.; STEFFENS, M. B. R.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, 2012.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento, “Acompanhamento de Safra Brasileira de Cana-de-açúcar” Segundo Levantamento, Agosto, 2015.

COTTA, M. S. Monitoramento de estirpes de *Azospirillum brasilense* inoculado em culturas de milho. Dissertação (Mestrado em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná), 2015.

COUILLEROT, O., BOUFFAUD, M.L., BAUDOIN, E., MULLER, D., CABALLERO-MELLADO, J. AND MOENNE-LOCCOZ, Y. Development of a Real-time PCR Method to Quantify the PGPR Strain *Azospirillum Lipoferum* CRT1 on Maize Seedlings. **Soil Biology & Biochemistry** v. 42, p. 2298-2305, 2010.

DALLA SANTA, O.R., HERNANDEZ, R.F., ALVAREZ, G.L.M., RONZELLI, P., SOCCOL, C.R. Azospirillum sp inoculation in wheat, barley and oats seeds greenhouse experiments. **Braz Arch Biol Technol.** 2004; 47:843–850. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132004000600002>.

DE SOUZA, R. SCHOENFELD, R. PASSAGLIA, L. M. P. Bacterial inoculants for rice: effects on nutrient uptake and growth promotion. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 62, n. 4, p. 561-569, 2016.

DE VRIEZE, J.. The littlest farmhands. **Science**, v. 349, n. 6249, p. 680-683, 2015.

DÖBEREINER, J. E RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de Beijerinckia. **Rev Biol** 1: 261-272, 1958.

DOBEREINER, J., Forage grasses and grain crops. In: BERGENSEN, F. J. (Ed.). Methods for evaluating biological nitrogen fixation. New York: John Wiley e Sons, p. 535-555, 1980.

DÖBEREINER, J.. *Azotobacter paspali* sp. nov., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de Paspalum. **Pesq Agropec Bras** 1: 357-365, 1966.

Ehrlich HL Geomicrobiology, 2nd ed. Dekker, New York, p 646, 1990.

EHRlich, P. R.; EHRlich, A. H. The population explosion. **New York: Simon and Schuster**, 1990.

EHTESHAMUL-HAQUE, S., GHAFAR, A. Use of rhizobia in the control of root rot diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean. **Journal of phytopathology**, v. 138, n. 2, p. 157-163, 1993.

ERISMAN, J W. From Field to Table: A Systems Approach to Increase N Efficiency and Limit N Losses. In: **2016 AAAS Annual Meeting** AAAS, 2016.

ERISMAN, J. W.; SUTTON, M. A.; GALLOWAY, J.; KLIMONT, Z.; WINIWARTER, W. "How a century of ammonia synthesis changed the world". **Nature Geoscience** 1, 636 - 639. doi: 10.1038/ngeo325, 2008.

FELICI, C.; VETTORI, L.; GIRALDI, E.; FORINO, L. M. C.; TOFFANIN, A.; TAGLIASACCHI, A. M.; NUTI, M. Single and co-inoculation of *Bacillus subtilis* and *Azospirillum brasilense* on *Lycopersicon esculentum*: Effects on plant growth and rhizosphere microbial community. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 2, p. 260-270, 2008.

FOSTER, J. B.; CLARK, B. Ecological imperialism: The curse of capitalism. **Socialist register**, v. 40, n. 40, 2009.

GALLOWAY, J. N., TOWNSEND, A. R., ERISMAN, J. W., BEKUNDA, M., CAI, Z., FRENEY, J. R., MARTINELLI, L. A., SEITZINGER, S. P., SUTTON, M. A., Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science**, v. 320, n. 5878, p. 889-892, 2008.

GAMALERO E., GLICK B.R., Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria, in Bacteria in Agrobiolgy: **Plant Nutrient Management** (D. K. Maheshwari, eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, 2011.

GÍRIO, L. A. S., DIAS, F. L. F., REIS, V. M., URQUIAGA, S., SCHULTZ, N., BOLONHEZI, D., MUTTON, M. A., Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 1, p. 33-43, 2015.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological research**, v. 163, n. 2, p. 234-242, 2008.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HOFFMANN, R. 2006 Segurança alimentar e produção de etanol no Brasil. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.13, p.01-05.

HOLGUIN, G.; PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. **Biology and fertility of soils**, v. 29, n. 1, p. 10-23, 1999.

HUNGRIA, M., CAMPO, R. J., SOUZA, E. M., PEDROSA, F. O., Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil (Print)**, v. 331, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja**, 2011.



IFA, International Fertilizer Industry Association, "O Uso de Fertilizantes Minerais e o Meio Ambiente" Revised Edition, Paris, February, 2000. Disponível em: [http://www.anda.org.br/multimidia/fertilizantes\\_meio\\_ambiente.pdf](http://www.anda.org.br/multimidia/fertilizantes_meio_ambiente.pdf). Acesso em: 10 de Novembro de 2015.

JANNOO, N, GRIVET, L., DOOKUN, A. D'HONT, A., GLASZMANN, J. C. Evaluation of the genetic base of sugarcane cultivars and structuration of the diversity at the chromosome level using molecular markers. **Food and Agricultural Research Council**, Réduit, Mauritius, p.123-135, 1999. Disponível em <http://encountermauritius.gov.mu/portal/sites/ncb/moa/farc/amas99/s41.pdf> Acesso em Dezembro de 2015.

KUHAD R., KOTHAMASI D., TRIPATHI K.K., SINGH A., Diversity and Functions of Soil Microflora in Development of Plants, in Plant Surface Microbiology (A. Varma et al., eds.), **Springer**, Berlin, Heidelberg, 2004.

LAMMEL D. R.; BERTHOLO, H. C.; ROMANO, T. BESPALHOK J. C.; SOUZA E. M.; PEDROSA F. O. "Promoção de crescimento vegetal em cana-de-açúcar inoculada com a bactéria *Azospirillum brasilense*". XXIX Congresso Brasileiro de Agronomia, Foz do Iguaçu-PR, 2015.

LOPES, V. R., BESPALHOK, J. C., ARAUJO, L. M., RODRIGUES, F. V., DAROS, E., OLIVEIRA, R. A. The selection of sugarcane families that display better associations with Plant Growth Promoting Rhizobacteria. **Journal of Agronomy**, v. 11, n. 2, p. 43, 2012.

LOPES, V. R.; "Melhoramento genético de cana-de-açúcar em associação com bactérias promotoras de crescimento vegetal". Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) Universidade Federal do Paraná, PR, p.25-26, 2013.

LUTZENBERGER, José A. O absurdo da agricultura. **Estudos avançados**, v. 15, n. 43, p. 61-74, 2001.

MALAVOLTA, E. Manual de química agrícola: adubos e adubação. 3º Ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 596p, 1981.

MAULE, R. F., MAZZA, J. A., MARTHA JÚNIOR, G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 2, p. 295-301, 2001.

MICHIELS, K.; CROES, C. L.; VANDERLEYDEN, J. "Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* sp7 to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 137, p. 2241-2246, 1991.

MIHALACHE, G.; ZAMFIRACHE, M-M.; STEFAN, M. "Root associated bacteria – friends or enemies? A review". **Memoirs of the Scientific Sections of the Romanian Academy Tome V. 38**, 2015.

MIRANDA, L. L. D.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. Cana-de-açúcar, **Instituto Agronômico de Campinas**, Campinas, 882p, 2008.

MONTEIRO, R. A. BALSANELLI, E. WASSEN, R. MARIN, A. M. BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C. SCHMIDT, M. A. TADRA-SFEIR, M. PANKIEVICZ, V. C. S. CRUZ, L. M., CHUBATSU, L. S. PEDROSA, F. O. SOUSA, E. M. *Herbaspirillum*-plant

- interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 175-196, 2012.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2ª ed., Editora UFLA. 729p, 2006.
- MOUTIA, J.F.Y.; SAUMTALLY S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and soil**, v. 337, n. 1-2, p. 233-242, 2010.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of dna *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain-reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.
- MUNOS-ROJAS, J. and CABALLERO-MELLADO, J. "Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and effect on plant grow". **Microbial. Ecol.**, 45: 454-464, 2003.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; GOVINDARAJAN, M.; VADIVELU, M.; REVATHI, G.; "N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants". **Microbiological Research**, v. 161, n. 3, p. 238-245, 2006.
- NESTER, E. W., GORDON, M. P., AMASINO, R. M., YANOFSKY, M. F. Crown gall: a molecular and physiological analysis. **Annu Rev Plant Physiol** 35:387-413, 1984.
- NEVES, M. F.; CONEJERO, M. A.; "Estratégias para a cana no Brasil: um negócio classe mundial". São Paulo, Atlas, p.288, 2010.
- NUNES, J. R. D., PINTO, R. S. A, TRENTO, F. E., ELIAS, A. I. Indicadores agrícolas do setor canavieiro, safra 2003/2004. Ribeirão Preto: Idea, 2005.
- OLIVEIRA, A. L. M., CANUTO, E. L., URQUIAGA, S., REIS, V. M., BALDANI, J. I., Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1-2, p. 23-32, 2006.
- OLIVEIRA, A. L. M., URQUIAGA, S., DOBEREINER, J., BALDANI, J. I., The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, No. 2, p. 205-215, 2002.
- OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1-2, p. 23-32, 2006.
- PAPAVIZAS, G.C.; DAVEY, C.B. Saprophytic behavior of *Rhizoctonia* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v.51, p.693-699, 1961.
- PEDROZO, C. Â.; BARBOSA, M. H. P.; RESNDEE, M. D. V.; PETERNELLI, L. A.; COSTA, P. M. A.; SILVA, F. L. "Eficiência da seleção em fases iniciais no melhoramento da cana-de-açúcar". **Revista Ceres**, 55: 1-8, 2008.
- PEDULA, R. O.; SCHULTZ, N.; MONTEIRO, R. C.; PEREIRA, W.; ARAÚJO, A. P.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Growth analysis of sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization. **African Journal of Agricultural Research**, Vol. 11, No.30, p. 2786-2795, 2016.
- PEREIRA T. P., AMARAL F.P., DALL'ASTA P., BROD F. C. A., A. A. C. M. Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae*

strain SmR1 in maize roots. **Mol Biotechnol**, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-014-9742-4>.

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

PIERIK, R., THOLEND, D., POORTER, H., VISSER, E. J. W., VOESENEK, L.A. C. J., The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. **Trends in plant science**, v. 11, n. 4, p. 176-183, 2006.

PIETERSE, C. M. J., LEON, R. A., VAN DER ENT, S., VAN WEES, S. C. M. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nat. Chem. Biol.** 5, 308–316, 2009.

RAYMOND, J., SIEFERT, J. L., STAPLES, C. R. & BLANKENSHIP, R. E., The natural history of nitrogen fixation. **Molecular biology and evolution**, v. 21, n. 3, p. 541-554, 2004.

RICHARDSON, A. E., BAREA, J. M., MCNEILL, A. M., PRIGENT-COMBARET, C., Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and soil**, v. 321, n. 1-2, p. 305-339, 2009.

ROMEIRO, R.S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em suspensão. Laboratório de bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV, 2013.

RYALS, J., UKNES, S., WARD, E., Systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, v. 104, n. 4, p. 1109, 1994.

SAHARAN, B. S., NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 21, n. 1, p. 30, 2011.

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

SCHMIDT, M. A., SOUZA, E. M., BAURA, V. A., WASSEM, R., YATES, M. G., PEDROSA, F. O., MONTEIRO, R. A. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 3, p. 182-185, 2011.

SCHROEDER, B., WOOD, A., MOODY, P.W., BELL, M.J., GARSIDE, A.L., Nitrogen fertiliser guidelines in perspective. **Proc. Aust. Sugar Cane Technol.** Vol. 27, No. 291–304, 2005.

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

SHARMA A, JOHRIA B. N., SHARMA A. K., GLICK B. R. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP 3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 7, p. 887-894, 2003.

SILVA, C. M., VIEIRA, R. A., SOUTO, E. R., HATA, F. T., MACHADO, M. F. P. S., MARCUZ, F. S., Diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina e cinetina na micropropagação in vitro das variedades rb867515 e rb855156 de cana-de-açúcar. **Campo Digital**, v. 4, n. 1, 2009.

SILVA, L. G.; MIGUENS, F. C.; OLIVARES, F. L.; *Herbaspirillum seropedicae* and sugarcane endophytic interaction investigated by using high pressure freezing electron microscopy. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 69-71, 2003.

SILVEIRA, A. B. Isolamento e caracterização de linhagens de Bacillus e Paenibacillus promotores de crescimento vegetal em lavouras de arroz e trigo do Rio Grande do Sul. Tese de doutorado em genética e biologia molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

SIVASAKTHIVELAN, P.; SARANRAJ, P. Azospirillum and its formulations: A Review. **International Journal of Microbiological Research**, v. 4, n. 3, p. 275-287, 2013.

SØRENSEN, J., NICOLAISEN, M. H., RON, E., SIMONET, P. Molecular tools in rhizosphere microbiology-from single-cell to whole-community analysis. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1-2, p. 483-512, 2009.

SPOLAOR, L. T, GONÇALVES, L. S. A., SANTOS, O. J. A. P. dos, OLIVEIRA, A. L. M. de SCAPIM, C. A., BERTAGNA, F. A. B., & KUKI, M. C. Bactérias promotoras de crescimento associadas a adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônomo de milho pipoca "<https://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.330>" **Bragantia**, 75(1), 33-40. Epub January 08, 2016.

STETS, M. I.; ALQUERES, S. M.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O.; SCHMID, M.; CRUZ, L. M.; Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 Bacteria in Wheat Roots by Strain-Specific Quantitative PCR. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6700-6709, 2015.

SUTTON, M. A., OENEMA, O., ERISMAN, J. W., LEIP, A., GRINSVEN, H. V., WINIWARTER, W., (2011) Too much of a good thing. **Nature**, v. 472, n. 7342, p. 159-161, 2011.

TAILOR A.J., JOSHI B.H., Characterization and optimization of siderophore production from *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from sugarcane rhizosphere. **Journal of Environmental Research and Development**, v.6, n. 3A, 2012.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. 3ª Ed. Sunderland: Sinauer Associates, 690p, 2002.

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

TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied biochemistry and microbiology**, v. 42, n. 2, p. 117-126, 2006.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; and BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 1, p. 105-114, 1992.

VESSEY, J. K., Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, **Plant and Soil**, 255, 2, 571–586, 2003.

VESSEY, J. Kevin. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VIAN, C. E. F. Cana-de-açúcar: Alcoolquímica. **Agência de Informação Embrapa**. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canade-acucar/Abertura.html>>. Acesso em 20 de Janeiro de 2016.

WAACK, R. S.; NEVES, M. F. Competitividade do agrobusiness brasileiro: sistema agroindustrial da cana-de-açúcar. PENSEA/FIA/FEA/USP, São Paulo, v.5, 185p., 1998.

ZAMIOUDIS, C.; MASTRANESTI, P.; DHONUKSHE, P.; BLILOU, I.; PIETERSE, C. M. J. Unraveling Root Developmental Programs Initiated by Beneficial *Pseudomonas* spp. Bacteria. **Plant Physiology**, v. 162, n. 1, p. 304-318, 2013.