

Caracterização fisiológica de bactérias endofíticas isoladas de cana-de-açúcar plantada no Nordeste



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Documentos 286

Caracterização fisiológica de bactérias endofíticas isoladas de cana-de-açúcar plantada no Nordeste

*Cecília de Souza Antônio
Veronica Massena Reis*

Embrapa Agrobiologia
Seropédica, RJ
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465, km 7, CEP 23.851-970, Seropédica, RJ

Caixa Postal 74505

Fone: (21) 3441-1500

Fax: (21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: Norma Gouvêa Rumjanek

Secretária-Executivo: Carmelita do Espírito Santo

Membros: Bruno José Alves, Ednaldo da Silva Araújo,

Guilherme Montandon Chaer, José Ivo Baldani,

Luis Henrique de Barros Soares

Supervisora editorial: Norma Gouvêa Rumjanek

Normalização bibliográfica: Carmelita do Espírito Santo

Tratamento de ilustrações: Maria Christine Saraiva Barbosa

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

Foto da capa: Veronica Massena Reis

1ª edição

1ª impressão (2011): 50 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Agrobiologia

A635c Antônio, Cecília de Souza.

Caracterização fisiológica de bactérias endofíticas isoladas de cana-de-açúcar plantada no Nordeste / Cecília de Souza Antônio, Verônica Massena Reis. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2011. 28 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 286).

ISSN: 1517-8498

1. Cana-de-açúcar. 2. Bactéria diazotrófica. Avaliação fenotípica. I. Reis, Verônica Massena. II. Título. III. Embrapa Agrobiologia. IV. Série.

633.61 CDD 23. Ed.

© Embrapa 2011

Autores

Cecília de Souza Antônio

DTI / Embrapa Agrobiologia, Engenheira

Agrônoma. E-mail: ceciliamat2004@yahoo.com.br

Veronica Massena Reis

Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia. BR 465,
km 7, Seropédica/RJ, CEP 23891-000. E-mail:

veronica.massena@embrapa.br

Apresentação

As atitudes de usar com responsabilidade os recursos naturais (solo, água, ar, flora, fauna, energia), de preservar e conservar a natureza são cada vez mais necessárias para a sociedade moderna acarretando em uma busca constante por sistemas de produção agropecuários apoiados em princípios ecológicos e naturais.

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia construiu o seu atual plano diretor de pesquisa, desenvolvimento e inovação com a seguinte missão “gerar conhecimentos e viabilizar tecnologias e inovação apoiados nos processos agrobiológicos, em benefício de uma agricultura sustentável para a sociedade brasileira”.

A série documentos se constitui em uma linha de publicações que visa disponibilizar informações relevantes das mais diversas etapas dos processos de pesquisa científica e tecnológica. Podem disponibilizar revisões de literatura sobre temas relevantes, relatórios técnicos, um determinado procedimento metodológico, levantamentos de campo, entre outros tipos de conteúdo.

A presente publicação intitulada “Caracterização Fisiológica de Bactérias Endofíticas Isoladas de Cana-de-açúcar plantada no Nordeste”

tem indicação para todos aqueles interessados em conhecer mais sobre o assunto, portanto, boa leitura.

Eduardo Francia Carneiro Campello
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

Sumário

Introdução	9
Obtenção dos Isolados	11
Caracterização morfológica e fisiológica	12
Coleção de bactérias diazotróficas de variedades de cana-de-açúcar	13
Agradecimentos	23
Referências Bibliográficas	24

Caracterização fisiológica de bactérias endofíticas isoladas de cana-de-açúcar plantada no Nordeste

Cecília de Souza Antônio
Veronica Massena Reis

Introdução

Na última década houve um aumento no número de publicações que descreve a ação de promoção de crescimento de bactérias em plantas como o arroz, trigo, sorgo, milho e cana-de-açúcar (BERG 2009). Em particular, várias publicações descrevem a associação de cana-de-açúcar com diferentes gêneros e espécies de bactérias diazotróficas tais como: *Gluconacetobacter diazotrophicus* spp., *Azospirillum* spp., *Pantoea* spp., *Burkholdeira* spp. *Herbaspirillum* spp. *Rhizobium etli* spp. e *Bradyrhizobium* spp. (JAMES; OLIVARES, 1998). Por vários anos os microrganismos foram descritos e identificados apenas por metodologias dependentes de cultivo (SCHLEIFER, 2004). Avaliações indicaram que mais de 99% dos microrganismos presentes em muitos ambientes naturais não são cultiváveis (LEVEAU, 2007). Mesmo assim, o volume de informações obtidas a partir deste 1% identificado permitiu avanços inestimáveis.

A maioria das descrições é baseada em características morfológicas, como forma e coloração das colônias, tamanho e motilidade celular, patogenicidade, assimilação de diferentes fontes de carbono, dentre outros, resultando na formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e muitas vezes errôneos (WOESE, 1987). Há algumas

décadas, avanços e inovações nas técnicas moleculares, baseadas em sequenciamento de DNA e análise de sequências dos genes ribossomais e outros genes de vários procariotos, têm gerado informações relevantes nas relações taxonômicas, ecológicas e evolucionárias das espécies de bactérias encontradas (FORNEY et al., 2004). A taxonomia polifásica criada por Colwell em 1970, refere-se à integração de informações genotípicas complementadas com informações fenotípicas e quimiotaxonômicas de um microrganismo a fim de executar um agrupamento do mesmo (PRAKASH et al., 2007) o que permite classificá-lo e geralmente identificá-lo (COENYE et al., 2005).

Outro fator de descrição de novas bactérias diazotróficas refere-se a capacidade destes organismos de ação na promoção de crescimento, pois em sua maioria produzem auxinas (ácido indol-acético principalmente) sideróforos e podem solubilizar fosfatos (SEVILHA et al., 2001; SHOKRI; EMTIAZI, 2010).

Bactérias endofíticas são microrganismos que habitam o interior de tecidos vivos de plantas durante alguma fase ou ao longo de todo seu ciclo de vida, sem com isso causar dano aparente ao hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis (PETRINI, 1991; AZEVEDO et al., 2000). As bactérias diazotróficas endofíticas podem promover o desenvolvimento das plantas por meio de produção de fitormônios como auxinas ou produzir substâncias que são capazes de promover a proteção da planta contra patógenos. Além disto, podem reduzir a aplicação de adubos nitrogenados quando atuam como fixadoras de nitrogênio, contribuindo para a conservação dos recursos ambientais.

O presente trabalho teve o objetivo de estudar as características fenotípicas dos isolados diazotróficos endofíticos, obtidos a partir de algumas variedades de cana-de-açúcar cultivadas em dois estados do Nordeste.

Obtenção dos isolados

Os isolados foram obtidos de amostras de colmos de 12 variedades de cana-de-açúcar sendo oito cultivadas no Estado de Alagoas (SP 81325, SP 813250, SP 791011, RB 92579, RB 931530, RB 867515, RB 72454, e VAT 90212), e nove cultivadas em Pernambuco (SP 813250, SP 832847, RB 92579, RB 867515, RB 72454, RB 863129, RB 931011, RB 869515 e VAT 90212).

Os colmos foram divididos em toletes contendo apenas uma única gema. Após tratamento térmico a 52°C por 30 minutos, os toletes foram mantidos a temperatura ambiente durante 24 horas. Os toletes foram então pré-germinados em casa de vegetação segundo Reis et al. (2010). Três semanas após o plantio, as plantas que germinaram foram submetidas ao processo de isolamento de amostras de raízes e da parte aérea recém-germinada. A contagem e o isolamento ocorreram conforme descrito por Döbereiner et al., (1995). Foram utilizados os meios de culturas semi-sólido JNFb, LGI (DÖBEREINER et al., 1995), LGI-P caldo (REIS et al., 1994) e JMV (BALDANI, 1996). A contagem foi realizada baseada na presença ou ausência da película formada no meio semi-sólido, para quantificar o Número Mais Provável de bactérias presentes através da Tabela de McCrady. Dos vidros com presença de película característica foram feitas repicagens para os mesmos meios na constituição sólida e as colônias após a confirmação do crescimento em semi-sólido foram riscadas em placas de Petri contendo meio de cultura DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1982) para purificação final. Quando purificados, os isolados foram estocados em glicerol 50% estéril (Glicerol diluído em água MilliQ) a -20°C.

Cinco estirpes pertencentes à coleção de cultura da Embrapa Agrobiologia foram utilizadas em todas as análises como padrões: *Burkholderia tropica* (PPe8 - RB 11366); *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL 5 - BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC 54 - BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (HCC 103 - BR 11504) e *Azospirillum amazonense* (CBAMC - BR 11145).

Caracterização morfológica e fisiológica

Todos os isolados foram submetidos à caracterização morfológica de colônias crescidas em placas contendo meio batata após 5 e 7 dias de incubação (DÖBEREINER et al., 1995) utilizando a matriz de caracterização de colônias descrita por Yano et al. (1993). As seguintes características morfológicas das colônias foram avaliadas: tamanho; características ópticas; cor; forma da colônia; tipo de elevação; tipo de borda; superfície e consistência.

Através da comparação de semelhanças entre os isolados, utilizando o coeficiente de SM (ROHLF, 1994), foi possível agrupá-los utilizando o método das distâncias médias UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*) (SNEATH; SOKAL, 1962). Os isolados foram representados graficamente utilizando um dendrograma construído pelo programa NTSYS (*Numerical Taxonomy System Using Multivariate Statistical Program*), versão 2.1 para análise polifásica.

Dos grupos formados anteriormente, foram selecionados aleatoriamente os representantes para as análises subseqüentes, totalizando 40 isolados. Avaliou-se o crescimento dos isolados em diferentes meios de cultivo semi-sólido. Foram usados os seguintes meios: JNFB com ácido málico (0,5%) como fonte de carbono (DÖBEREINER et al., 1995), LGI-P, com a fonte de carbono a sacarose a 10% (DÖBEREINER et al., 1995); JMV, usando manitol 0,5% com fonte de carbono (BALDANI et al., 2000) e LGI cuja fonte de carbono é a sacarose a 0,5% (MAGALHÃES et al., 1983), sendo utilizado três repetições para cada isolado. O inóculo foi obtido do cultivo das bactérias em meio líquido DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1982) a 30°C por 24 horas sob agitação de 150 rpm. Em seguida, 30 µl da suspensão bacteriana foram inoculadas em frascos contendo 5 ml de meio de cultivo e estes incubados a 30°C. As avaliações foram feitas no segundo, quarto e sétimo dia após a inoculação, sendo considerados como crescimento positivo, aqueles frascos onde houve formação de película

característica de diazotróficos. Os resultados foram representados através de um dendrograma construído como descrito acima.

A morfologia celular foi avaliada através de microscopia ótica de contraste de fase utilizando as objetivas de 40X e 100X, segundo Videira (2008). Para o teste de Gram foi utilizado o protocolo sugerido por YANO et al., (1993), sendo que as bactérias foram crescidas em meio sólido DYGS e submetidas a reação de Gram.

A produção de ácido indolacético (AIA) foi medida utilizando o método de Salkowsky, que é um método colorimétrico e engloba a análise de AIA e outros compostos indólicos (SARWAR; KREMER, 1995 - modificado por REIS JÚNIOR, 2002). Os isolados foram submetidos a uma pré-inoculação em meio líquido DYGS com alteração de 0,5g/l de KOH por 0,35g/l de NaOH. Após 30 min de reação em ausência de luz e sob temperatura ambiente observou-se a intensidade da coloração rósea. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus (Labsystem Oy, Helsinki, Finlândia) com filtro de interferência de 540 nm e os dados foram processados pelo programa Labsystem Transmit Multiskan Plus For Windows. Para a estimativa da produção de AIA foi determinada a curva padrão nas concentrações de: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 mg.mL⁻¹, utilizando uma solução padrão do produto comercial AIA (1,75 mg.mL⁻¹) de acordo com a equação $y = 0,0112x + 0,096$ (R² 0,99).

Coleção de bactérias diazotróficas de variedades de cana-de-açúcar

A contagem dos isolados variou de não detectado a $1,40 \times 10^7$ células por grama de massa fresca nas variedades testadas e foi maior nos meios de cultura JNFB e JMV, em todas as partes da planta. Foram obtidos 260 isolados e este número foi maior nas amostras de raiz 200 (77%) em relação à parte aérea - 60 (23%). Em outras pesquisas dados semelhantes foram obtidos por Perin (2003, 2007) e Reis Júnior e colaboradores (2000).

Devido à perda de viabilidade de algumas bactérias em estoque, apenas 201 puderam ser reativados do total de 260 isolados armazenados. O congelamento assim como o descongelamento pode provocar danos a células bacterianas gerando perda de viabilidade, contudo a estabilidade genética dos microrganismos é maior utilizando o congelamento com crioprotetores que a de outros métodos como a liofilização (ROJAS, 2007).

Dentre as caracterizações fenotípicas na observação da morfologia das colônias em meio Batata foi possível identificar a formação de sete grupos do total de 201 isolados avaliados. O agrupamento revelou que muitos isolados foram semelhantes entre si, formando sete grupos (Fig. 1), sendo o grupo 3, com 91 isolados, o maior, seguidos pelo grupo 4 com 82 isolados com diferentes dados ecológicos. Os isolados do grupo 3 apresentaram colônias circulares, pequenas e médias, lenticular, com borda inteira, superfície lisa e brilhante de coloração creme. Os isolados do grupo 4 diferiram dos isolados do grupo 3 apenas por apresentar superfície da colônia rugosa. Dos grupos formados, apenas o grupo 3 foi similar a estirpe padrão de espécie diazotrófica descrita como PAL5 (BR11281-*Gluconacetobacter diazotrophicus*). Também foram observados isolados que não se agruparam com outros isolados (grupo 2 ou isolado 5-III e grupo 6 ou isolado 171).

Segundo a análise de similaridade, as bactérias do grupo 3 provavelmente pertencem ao gênero *Gluconacetobacter*. Reis et al. (1999) observou que o isolamento deste gênero é favorecido quando se utiliza toletes pre-germinados. Estes dados são semelhantes aos de Barbosa et al. (2006) que obteve 51 isolados de *Gluconacetobacter* spp. utilizando a mesma metodologia de isolamento. Os grupos obtidos através da caracterização morfológica das colônias em meio Batata confirmam que o uso desta metodologia permite uma diferenciação entre os isolados (Fig. 1).

A partir do agrupamento foram selecionados aleatoriamente 40 isolados para as demais análises, contendo representantes de cada grupo (Fig. 2).

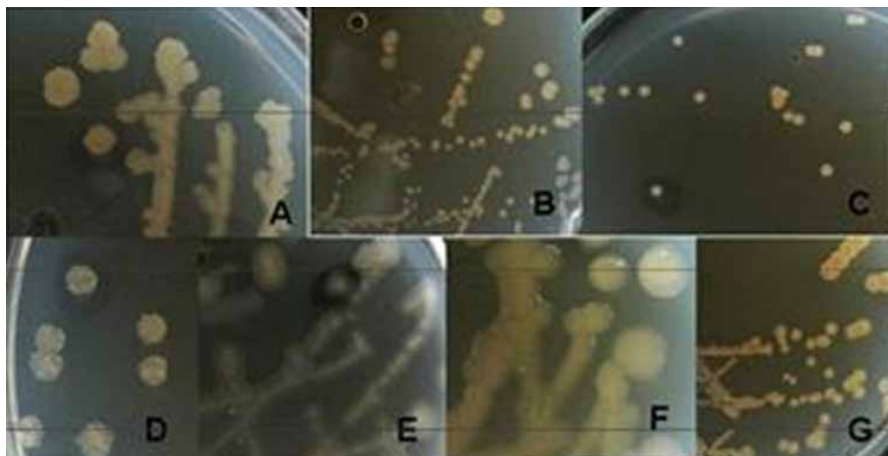


Fig. 1. Tipos de colônias observadas no meio Batata. Pertencentes a: **A:** grupo 1, **B:** grupo 2, **C:** grupo 3, **D:** grupo 4, **E:** grupo 5, **F:** grupo 6 e **G:** grupo 7.

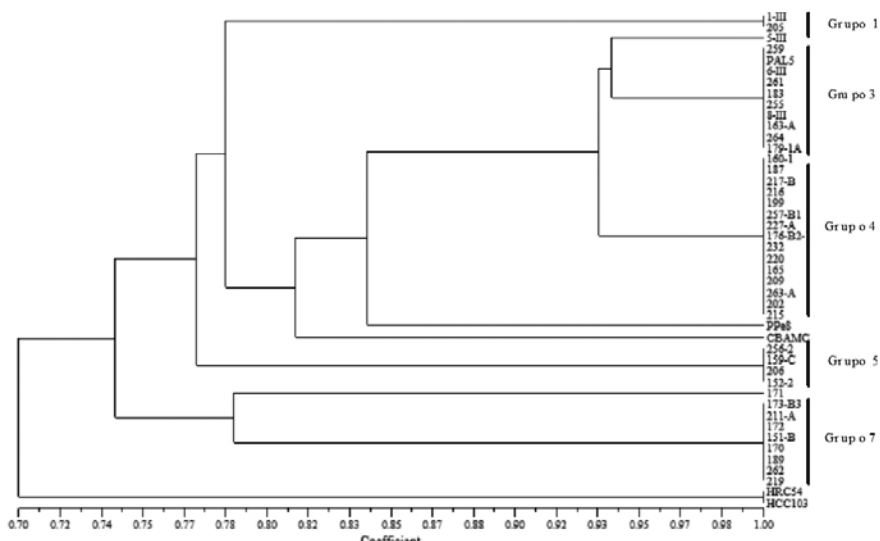


Fig. 2. Dendrograma de similaridade morfocultural meio sólido Batata de 40 isolados, provenientes de diferentes variedades de cana-de-açúcar e das estirpes padrões: PPe8 (RB 11366-*Burkholderia tropica*) grupo 2, PAL 5 (BR 11281-*Gluconacetobacter diazotrophicus*), HRC 54 (BR 11335-*Herbaspirillum seropedicae*), HCC 103 (BR 11504-*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) e CBAMC (BR 11145-*Azospirillum amazonense*). A classificação foi gerada no programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir da caracterização de colônias em meio Batata.

Segundo Döbereiner et al. (1995) o uso de meios de cultivo semi-sólido semi-seletivos favorece o isolamento e auxilia na identificação preliminar de algumas bactérias diazotróficas. Baseado na capacidade de formar películas em diferentes meios semi-sólidos com diferentes fontes de C, foi realizada uma análise dos 40 isolados selecionados anteriormente. Foi criado um dendrograma obtido pela construção de uma matriz binária onde os dados avaliados foram presença e ausência de película característica de bactéria diazotrófica assim como tipo de pH observado após o crescimento das bactérias em meio semi-sólido. No dendrograma (Fig. 3) observou-se a formação de um grande grupo de isolados e alguns grupos menores. Dos 40 isolados testados em diferentes meios semi-sólidos, apenas os isolados do grupo 8 apresentaram película na presença do meio contendo ácido málico (JNFB), o que indica que o meio JNFB pode ser utilizado como um meio específico para o isolamento destas bactérias. Todos os isolados do grupo 1 desenvolveram película nos meios testados assim como as estirpes padrões PPe8 (RB 11366) *Burkholderia tropica*, HRC 54 (BR 11335) *Herbaspirillum seropedicae* e HCC 103 (BR 11504) *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Isto indica a grande capacidade de adaptação a diferentes fontes de carbono e pH pôr parte destas bactérias.

Os quatro isolados pertencentes ao grupo 7 perderam a capacidade de formarem película nos meios testados e por isso não foram incluídos nas análises de caracterização (Fig. 3). O meio semi-sólido para ser considerado seletivo deve ter características que restrinjam o crescimento de diferentes tipos de bactérias. Este fator de restrição pode proporcionar um ambiente diferente ao encontrado no interior da planta de cana-de-açúcar, refletindo no crescimento da bactéria e gerar a perda da capacidade de formar película por algumas. Perin (2007) observou que alguns dos isolados apresentavam melhor crescimento e capacidade de formar película característica de diazotrófica quando era acrescido de 20 mg de extrato de levedura no meio JMV semi-sólido. Reis et al. (1994) observaram que a adição de caldo de cana ao meio de cultura LGI-P permitia um isolamento mais efetivo da espécie *G. diazotrophicus*.

Os isolados do grupo 2 formaram o maior grupo, totalizando 22 isolados (55% dos isolados testados) e estes não cresceram na presença de ácido málico como fonte de carbono, apresentando comportamento semelhante à estirpe tipo PAL 5 (BR 11281) de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Este resultado é semelhante ao relato de Santos (2008) que afirmou que a bactéria cresce bem em presença de sacarose, glicose, frutose, gluconato, manitol, sorbitol e glicerol, mas não utiliza alguns ácidos carboxílicos, como succinato, fumarato e malato. As fontes de carbono usadas pelos diferentes grupos formados no dendrograma apresentado na Fig. 3 estão listadas na Tab. 1.

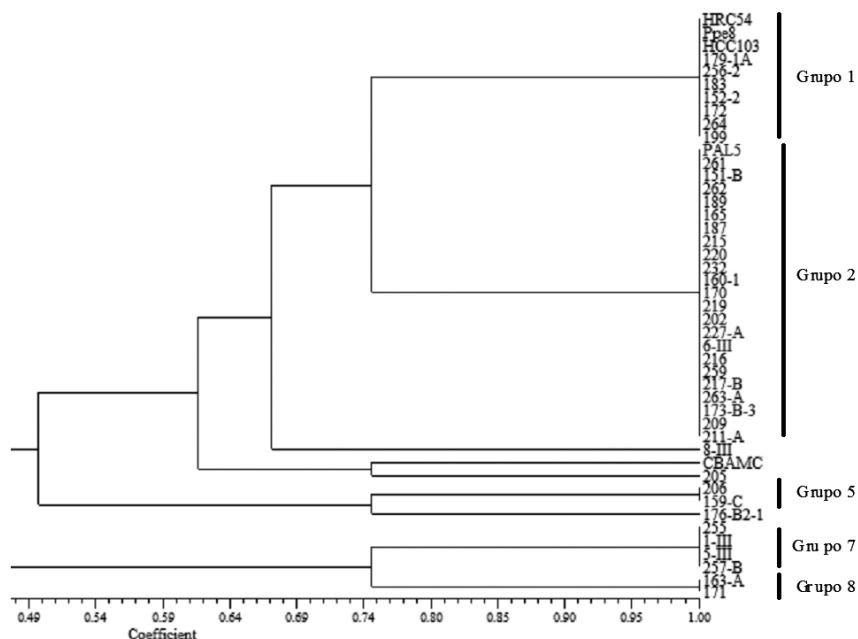


Fig. 3. Dendrograma de similaridade fisiológica em meios semi-sólidos (JMV, JNFB, LGI e LGI-P) de 40 isolados, provenientes de diferentes variedades de cana-de-açúcar e das estirpes padrões: PPe8 (RB 11366-*Burkholderia tropica*), PAL 5 (BR 11281-*Gluconacetobacter diazotrophicus*), HRC 54 (BR 11335-*Herbaspirillum seropedicae*), HCC 103 (BR 11504-*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) e CBAMC (BR 11145-*Azospirillum amazonense*). A classificação foi gerada no programa NTSYS, algoritmo UPGMA e índice SM a partir da presença ou ausência de película nos diferentes meios semi-sólidos.

Tabela 1. Fontes de carbono usadas pelos grupos formados de bactérias em dendrograma construído a partir de uma matriz binária e analisado pelo programa NTSYS, índice SM a partir da presença ou ausência de película nos diferentes meios semi-sólidos sem adição de nitrogênio.

Grupos	JMV Manitol 0,5%	LGI sacarose 0,5%	LGI-P sacarose 10%	JNFB Ácido málico 0,5%
1	+	+	+	+
2	+	+	+	-
3	+	-	+	-
4	-	+	+	-
5	+	-	+	+
6	-	-	+	+
7	-	-	-	-
8	-	-	-	+

Como o método colorimétrico mede vários tipos de compostos indólicos, podemos dizer que a análise esta se referindo aos vários tipos de auxinas produzidas. Os 36 isolados testados apresentaram resultados que variaram de não detectado a 49,19 µg/mL. Do total de bactérias avaliadas, cerca 69% produziram auxinas. Resultados semelhantes foram obtidos por Marchioro (2005) que avaliou a produção de AIA e derivados em isolados obtidos de gramíneas, abacaxi, banana e palmeira. A porcentagem de isolados produtores de auxinas foi maior nos isolados obtidos de raiz (64%) em relação à parte aérea. Esta relação não foi observada por Barbosa et al. (2009) quando avaliaram a produção de auxina de isolados de cana-de-açúcar. Dados da literatura descrevem que auxinas podem atuar como um hormônio capaz de facilitar a associação simbiótica (SILVEIRA et al., 2007).

Os isolados mais eficientes na síntese de auxina total foram o 171 e o 170. O isolado 171 apresentou a maior capacidade de produção de auxinas (49,19 µg/mL), 29 vezes superior ao padrão utilizado PAL 5 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*). O isolado 209 apresentou a menor capacidade de síntese de AIA (0,179 µg/mL). As bactérias que apresentaram produção positiva de compostos endólicos estão representadas na Fig. 4.

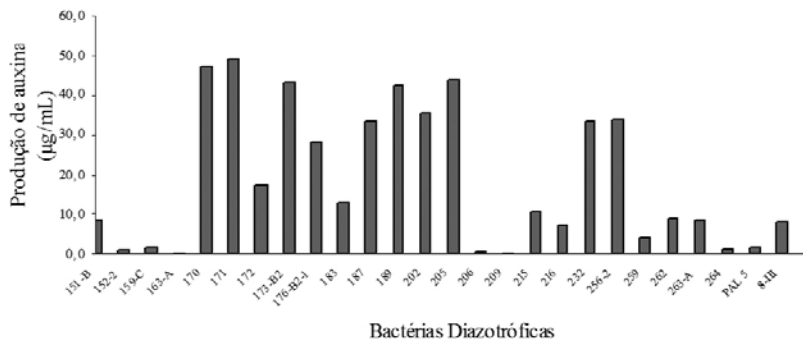


Fig. 4. Produção de hormônio auxina (compostos endólics) por isolados bacterianos diazotróficos associados à cana-de-açúcar.

A identificação do isolado, sua origem e a avaliação de morfologia celular está apresentada na Tab. 2. Houve diferenças tanto na forma quanto no grau de agregação das células. O local com maior número de isolados fora a coleta feita na Usina Coruripe, em Alagoas; seguido da Usina Triunfo. O meio de cultivo que permitiu o maior número de isolados foi o JNFb.

Dos 36 isolados avaliados, 27,5% foram semelhantes à estirpe tipo BR 11366 (*Burkholderia tropica*); 45% a BR 11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e 5% as demais estirpes padrões BR 11335 (*Herbaspirillum seropedicae*), BR 11504 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) e BR 11145 (*Azospirillum amazonense*) e 22,5% dos isolados avaliados não apresentaram semelhança com qualquer estirpe padrões testada.

A técnica de coloração revelou classificação Gram negativa em todos os isolados, assim como nos padrões de bactérias diazotróficas. Revelando a presença de uma parede celular externa lipídica que foi removida durante o processo de coloração. (Fig. 5).

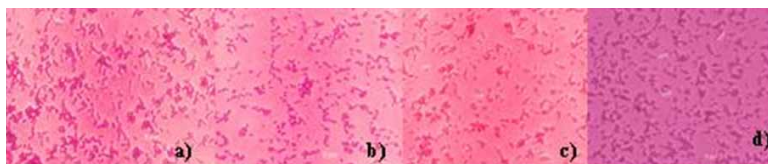


Fig. 5. Isolados bacterianos a) 220; b) 259; c) 219 d) estirpe padrão de espécie descrita como diazotrófica BR 11281 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) submetidos à coloração de Gram.

Tabela 2. Característica e dados ecológicos dos isolados diazotróficos obtidos de plantas de cana-de-açúcar.

Usina	Variedade	Amostra	Isolados	Meio	Grupo em meio em Batata	Grupo em semi-sólido	Produção de compostos endólicos (µg/mL)	Morfologia de células dos isolados
Triunfo/ AL	VAT 90212 14 meses	raiz	151-B	LGI-P	7	2	8,84	Bastonete C/A
	VAT 90212 14 meses	raiz	160-1	JNFb	4	2	ND ²	Bastonete curvo NC
	RB 92579 14 meses	raiz	165	JNFb	4	2	ND ²	Bastonete curvo NC
	VAT 90212 14 meses	raiz	172	JNFb	4	1	17,50	Bastonete C/A
	RB 92579 14 meses	raiz	173-B2	LGI	74	2	43,13	Bastonete C/A
	RB 92579 14 meses	raiz	202	JNFb	4	2	35,54	Bastonete curvo NC
	RB 92579 14 meses	raiz	217-B	LGI-P	4	2	ND ²	Bastonete curvo NC
	SP 813250 14 meses	raiz	220	JNFb	4	2	ND ²	Bastonete curvo NC
	SP 813250 14 meses	raiz	232	JNFb	4	2	33,57	Bastonete curvo NC
	SP 813250 14 meses	raiz	263-A	JNFb	4	2	8,39	Bastonete curvo NC
	RB 867515 soca 7 meses	raiz	259	LGI-P	3	2	4,02	Bastonete C/A
	RB 92579 14 meses	raiz	257-B	JNFb	4	7	ND ²	NA ³

AL: Alagoas; PE: Pernambuco. ¹NA, não foi possível agrupar pelo método utilizado. ²ND, não detectado pelo método. NA³, Não avaliado pelo método. Presença (C) e ausência (NC) de cadeias bacterianas. A: ocorreu formação de agregados.

Tabela 2. Característica e dados ecológicos dos isolados diazotróficos obtidos de plantas de cana-de-açúcar. (cont.)

Usina	Variedade	Amostra	Isolados	Meio	Grupo em meio Batata	Grupo em semi-sólido	Produção de compostos endólicos (µg/mL)	Morfologia de células dos isolados
Coruripe/ AL	RB 72454	P.A.	152-2	JNFb	5	1	0,71	Bastonete C/A
	RB 72454	raiz	159-C	JNFb	5	5	1,79	Bastonete C/A
	RB 72454	raiz	163-A	JNFb	3	8	0,36	Bastonete C/A
	RB 72454	raiz	170	LGI-P	7	2	47,23	Bastonete C/A
	RB 72454	P.A.	171	JNFb	6	8	49,19	Bastonete C/A
	RB 72454	P.A.	176-B2-1	JNFb	4	5	28,39	Bastonete curvo NC
	RB 867515 soca 7 meses	raiz	179-1A	JNFb	3	1	ND ²	Bastonete C/A
	RB 867515 soca 7 meses	raiz	183	JNFb	3	1	13,21	Bastonete curvo NC
	RB 72454	raiz	187	LGI-P	4	2	33,66	Bastonete curvo NC
	RB 72454	P.A.	189	LGI-P	7	2	42,23	Bastonete C/A
	RB 72454	P.A.	199	JNFb	4	1	ND ²	Bastonete curvo NC
	RB 867615 soca	P.A.	205	JNFb	1	4	44,30	Vibrião C/A
	RB 72454	raiz	206	JNFb	5	5	0,63	Bastonete C/A
	RB 72454	P.A.	209	JNFb	4	2	0,18	Bastonete curvo NC
	RB 72454	raiz	211-A	LGI	7	2	ND ²	Bastonete C/A
	RB 72454	P.A.	215	JNFb	4	2	10,63	Bastonete curvo NC
	RB 72454	P.A.	216-A	LGI-P	4	2	7,23	Bastonete curvo NC
	RB 72454	raiz	219	LGI-P	7	2	ND ²	Bastonete C/A

AL: Alagoas; PE: Pernambuco. ¹NA, não foi possível agrupar pelo método utilizado. ²ND, não detectado pelo método. NA³, Não avaliado pelo método. Presença (C) e ausência (NC) de cadeias bacterianas. A: ocorreu formação de agregados.

Tabela 2. Característica e dados ecológicos dos isolados diazotróficos obtidos de plantas de cana-de-açúcar. (cont.)

Usina	Variedade	Amostra	Isolados	Meio	Grupo em meio Batata	Grupo em semi-sólido	Produção de compostos endólicos (µg/mL)	Morfologia de células dos isolados
Coruripe/AL	RB 867515	raiz	255	JNFb	3	7	ND ²	Bastonete curvo NC
	soca 7 meses							
	RB 867515	raiz	261	LGI-P	3	2	ND ²	Bastonete C/A
	soca 7 meses							
	RB 72454	raiz	264	JNFb	3	1	1,43	Bastonete C/A
	RB 72454	P.A	227-A	LGI	4	2	ND ²	Bastonete curvo NC
Olho D'água/AL	RB 72454	P.A	256-2	JNFb	5	1	34,20	Bastonete C/A
	RB 72454	raiz	262	LGI-P	7	2	9,11	Bastonete C/A
	RB 931011	raiz	6III	JNFb	3	2	ND ²	Bastonete curvo C/A
	planta							
Cruangi-Eng. Aninga/PE	RB 863129	raiz	8-III	LGI	3	3	8,21	Bastonete curvo C/A
Cruangi-Eng. Aninga/PE	RB 863129	P.A	1-III	LGI	1	7	ND ²	NA ³
	lote 06							
Cruangi-Eng. Beleza/PE	SP 813250	P.A	5-III	JNFb	2	7	ND ²	NA ³
	lote 17							
	BR 11281				3	2	1,70	Bastonete NC
	BR11335				NA ¹	1	ND ²	Vibrião NC
	BR 11145				NA ¹	NA1	ND2	Vibrião C/A
	BR 11366				NA ¹	1	ND ²	Bastonete curvo C/A
	BR 11504				NA ¹	1	ND ²	Vibrião C/A

AL: Alagoas; PE: Pernambuco. ¹NA, não foi possível agrupar pelo método utilizado. ²ND, não detectado pelo método. ³NA, Não avaliado pelo método. Presença (C) e ausência (NC) de cadeias bacterianas. A: ocorreu formação de agregados.

Agradecimentos

À Embrapa Agrobiologia pela estrutura, apoio dos seus funcionários e aprendizados alcançados. Ao CAPES pelo apoio financeiro e material. À Faperj pela bolsa “Cientista do Nosso Estado” do segundo autor e ao CNPq pela bolsa de produtividade do mesmo. Projeto financiado EMBRAPA número 03.13.00.016.

Referências Bibliográficas

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JÚNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 40-65, 2000.

BALDANI, V. L. D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica**. 1996. 238 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 485-491, 2000.

BARBOSA, E. A.; PERIN, L.; REIS, V. M. Uso de fontes de carbono por *G. diazotrophicus* isolados de plantas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 827-833, 2006.

BARBOSA, M. V.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; SILVA, M. de O.; COSTA, D. P. da. Produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas associadas à cana-de-açúcar In: JORNADA DE ENSINO PESQUISA E EXTENSÃO UFRPE, 9., 2009, Recife, **Anais...** Recife: UFRPE, 2009.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 11-18, 2009.

COENYE, T.; GEVERS, D.; PEER, Y. V.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 147-167, 2005.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas em plantas não leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1995. 60 p.

FORNEY, L. J.; ZHOU, X.; BROWN C. J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. **Current Opinion Microbiology**, v. 7, p. 210-220, 2004.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic bacteria. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 17, p. 77-119, 1998.

LEVEAU, J. H. J. The magic and menace of metagenomics: prospects for the study of plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 279-300, 2007.

MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 55, p. 417-430, 1983.

MARCHIORO, L. E. T. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74f. Tese (Mestrado em Agrobiologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PERIN, L. **Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica.

PERIN, L.; ARAÚJO, J. L. S.; REIS, V. M. **Aspectos genéticos e moleculares na interação entre organismos patogênicos e diazotróficos em cana-de-açúcar**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 41 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 233).

PRAKASH, O.; VERMA, M.; SHARMA, P.; KUMAR, M.; KUMARI, K.; SINGH, A.; KUMARI, H.; JIT, S.; GUPTA, S. K.; KHANNA, M. Polyphasic approach of bacterial - An overview of recent advances. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 47, p. 98-108, 2007.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Ed). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991.p. 179-197.

REIS JUNIOR, F. B. **Ecologia e diversidade do gênero *Azospirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria* spp.** 2002. 98 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

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

REIS, V. M. **Estudo de infecção e métodos de detecção da bactéria endófita *Acetobacter diazotrophicus* em associação com a cana-de-açúcar**. 1994. 213f. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

REIS, V. M., OLIVARES, F. L., DÖBEREINER, J, Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 401-405, 1994

REIS, V. M.; PEREIRA, W.; HIPOLITO, G. S. **Como preparar mini-toletes de cana-de-açúcar para a seleção de estirpes de diazotróficos associativos em substrato estéril**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico 129).

REIS, V. M.; PERIN, L.; REIS JUNIOR, F. B. **Uma nova estratégia para isolar *Gluconacetobacter diazotrophicus* de plantas de cana-de-açúcar**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1999. 5 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 35).

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA, J. R. V. A.; VICTOT, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xantomonas campestris* pv. Citri Tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, p. 16, 1982.

ROHLF, F. J. **NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: State University of New York, 1994.

ROJAS, E. U. **Avaliação da viabilidade e da variabilidade da microbiota salivar armazenada em diferentes temperaturas**. 2007. 36 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia - Patologia Bucal) - Universidade Federal Do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SANTOS, M. F. dos. **Proteoma diferencial da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivada com plântulas de cana-de-açúcar**. 2008, 108 f. Tese. (Doutorado em química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determinação of bacterially derived auxins using a microplate method. **Latters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 282 - 285, 1995.

SCHLEIFER, K. H. Microbial diversity: facts, problems and prospects. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, p.3-9, 2004.

SEVILHA, M.; ROBERT, H. P. T.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and Nif- mutant strains. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 14, p. 358-366, 2001.

SHOKRI D.; EMTIAZI G. Indole-3-acetic acid (IAA) production in symbiotic and non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria and its optimization by Taguchi design. **Current Microbiology**, v. 61, p. 217-25, 2010.

SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. dos S. (Ed.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. 312 p.

SNEATH, P. H.; SOKAL, R. R. Numerical taxonomy. **Nature**, v. 193, p. 855-860, 1962.

VIDEIRA, S. S. **Taxonomia polifásica de bactérias diazotróficas do gênero *Sphingomonas* spp. e efeito da inoculação em plantas de arroz**. 2008. 126f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia. Seropédica.

YANO, D. M. Y.; FARRIS, M. G.; UMINO, C. Y.; COUTINHO, H. L. C.; CANHOS, V. P. **Técnicas para cultivo, identificação e preservação de bactérias**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello, 1993. 64p.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.



Agrobiologia

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

