



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



**INOCULAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM A BACTÉRIA
ENDOFÍTICA *Gluconacetobacter diazotrophicus* VISANDO O USO
EFICIENTE DO NITROGÊNIO**

CAMILA BRUM PEREIRA OLIVEIRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
POLO UNIVERSITÁRIO DE CAMPO GRANDE – RIO DE JANEIRO

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



**INOCULAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR COM A BACTÉRIA
ENDOFÍTICA *Gluconacetobacter diazotrophicus* VISANDO O USO
EFICIENTE DO NITROGÊNIO**

CAMILA BRUM PEREIRA OLIVEIRA

Monografia apresentada como atividade obrigatória
à integralização de créditos para conclusão do
Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas –
Modalidade EaD.

Orientadora: ADRIANA SILVA HEMERLY

Coorientador: PABLO RODRIGO HARDOIM

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ADRIANA SILVA HEMERLY

COORIENTADOR: DR. PABLO RODRIGO HARDOIM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
POLO UNIVERSITÁRIO DE CAMPO GRANDE – RIO DE JANEIRO

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Camila Brum Pereira

Inoculação de cana-de-açúcar com a bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* visando o uso eficiente do nitrogênio.

Polo de Campo Grande – Rio de Janeiro, 2016. 53 f. il: 31 cm

Orientadora: Adriana Silva Hemerly

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciada no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EaD. 2016.

Referências bibliográficas: f. 49-51.

1. Bactéria diazotrófica, cana-de-açúcar, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, fixação biológica de nitrogênio, nitrogênio.

I. HEMERLY, Adriana Silva

II. HARDOIM, Pablo Rodrigo

III. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EaD.

IV. Inoculação de cana-de-açúcar com a bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* visando o uso eficiente do nitrogênio.

Dedico este trabalho a Deus,
por todo amor, cuidado, encorajamento e proteção.

E por ter me mostrado que tudo posso

Naquele que me fortalece.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, por ter me capacitado e me sustentado até aqui. Por seu amor incondicional e por sua forte presença em minha vida, mostrando-me que eu não estou e nem nunca estive sozinha, dando-me força para lutar e vencer qualquer obstáculo que por ventura viesse a aparecer em meu caminho ao longo dessa jornada.

À minha família, em especial à “minha rainha” e à minha “anja da guarda”, respectivamente, minha mãe e avó. E ao meu avô (*in memoriam*), pois tenho certeza que de onde ele estiver, está muito feliz com essa minha conquista. Tudo que fiz foi por vocês também. Obrigada, minha vozinha, por muitas vezes deixar de ver televisão porque eu precisava estudar, fazer tudo por mim porque eu não tinha tempo e mesmo que indiretamente, me entender e apoiar. Às minhas irmãs, Bianca e Pâmela, pela compreensão quando meus sobrinhos não podiam vir até a casa da avó, pois eu precisava de silêncio para estudar. À minha irmã Bianca, pelos conselhos e força por talvez eu estar realizando um sonho que era seu (e ainda tem tempo para realizar). Não é fácil ser a primeira pessoa a se formar na família, mas me orgulho disso.

Agradeço à minha querida e eterna professora de ciências “dona Carla”, por ter plantando a sementinha do bem lá na antiga 6ª série do Ensino Fundamental II e ter feito com que eu me apaixonasse pela biologia. E agradeço pela segunda vez, no fim da faculdade ter tido a oportunidade de estagiar com você na mesma escola que estudei, e por todo carinho e ensinamento transmitido durante aqueles meses, fazendo-me com que eu me encantasse pela educação. Agradeço a todos os meus professores, sejam eles de biologia ou demais disciplinas, que me inspiraram durante toda a caminhada da minha vida.

Aos meus queridos tutores do CEDERJ, em especial Bianca Manhães, Luiz Alfredo e Rita de Cássia, pelo profissionalismo e por serem verdadeiros educadores, mesmo quando a obrigação era ser apenas um tutor. Vocês foram muito mais que isso.

A todos os meus amigos, do CEDERJ ou da vida, não quero citar nomes para não me esquecer de ninguém, mas qualquer palavra de força, coragem e incentivo de vocês fez e faz toda a diferença na minha vida. Lembro-me com carinho e guardarei cada um comigo pra sempre.

À minha orientadora, professora Adriana, não só por ter me aceitado em seu laboratório, mas também por ter acreditado e confiado em mim, e assim ter me incluído em seu grupo.

Ao meu coorientador, Pablo, que foi muito mais que um simples coorientador. Agradeço por toda sua ajuda, dedicação, atenção e paciência para comigo, estando sempre apto e disposto a me ensinar e explicar qualquer dúvida que eu tivesse. Tive muita sorte de ter um “orientador” como você nesse momento que julgo ser o mais difícil da minha caminhada acadêmica, o término da graduação. Muito obrigada.

Um agradecimento à agência de fomento FAPERJ, que cedeu uma bolsa de iniciação científica e financiou o projeto.

Agradeço à Dra. Thais Louise Gurjão pela revisão final da monografia e pelos ensinamentos durante meu estágio no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP). Agradeço também à Dra. Flávia Thiebaut e à Prof^a Dra. Clícia Grativol pela disponibilidade e por terem aceitado o convite para participar da banca examinadora.

A todos do laboratório, a família LBMP. Sejam eles estagiários, mestres ou doutorandos/doutorados. Todos sempre muito solícitos para comigo, dispostos a me ajudar e a me ensinar em tudo que precisei. Aprendi muito nesses seis meses de estágio. Vou embora triste, queria ficar. Mas com o sentimento de dever cumprido.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. CULTURA DA BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA <i>G. diazotrophicus</i>	21
3.2. CULTURA <i>IN VITRO</i> DE CANA-DE-AÇÚCAR	22
3.3. CULTIVO HIDROPÔNICO	23
3.4. TRATAMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO	25
3.5. CONTAGEM DO NÚMERO DE BACTÉRIAS <i>G. diazotrophicus</i>	26
3.6. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1. OBTENÇÃO DE CULTURA DE TECIDO <i>IN VITRO</i> DE CANA-DE-AÇÚCAR CV. SP70-1143	29
4.2. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DA BACTÉRIA ENDIFÍTICA <i>G. diazotrophicus</i> ESTIRPE PAL5 (BR11281) MARCADAS COM RFP EM PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR CV. SP70-1143	31
4.3. CULTIVO DE PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM SISTEMA DE HIDROPONIA COM QUATRO CONDIÇÕES DISTINTAS DE FERTILIZANTES QUÍMICOS NITROGENADOS COM AS CONCENTRAÇÕES: ALTO (5 mM) E BAIXO (0,5 mM) DOS COMPOSTOS: NITRATO (NO ₃ ⁻) E UREIA (CH ₄ N ₂ O), INOCULADAS OU NÃO COM A BACTÉRIA ENDOFÍTICA <i>G. diazotrophicus</i> ESTIRPE PAL5 (BR11281)	32
4.4. AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DA BACTÉRIA ENDOFÍTICA <i>G.</i> <i>diazotrophicus</i> PARA O DESENVOLVIMENTO VEGETAL ATRAVÉS DAS ANÁLISES FENOTÍPICAS	35
4.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO FERTILIZANTE	

QUÍMICO NITROGENADO NA TAXA DE COLONIZAÇÃO INTERNA DA BACTÉRIA ENDOFÍTICA	43
5. CONCLUSÕES	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
7. APÊNDICES	52
8. ANEXOS	53

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Plântulas de cana-de-açúcar mantidas em condições controladas com ciclo diário de luz de 12 h e temperatura de 28 °C 23
- Figura 2 - Esquema representativo das diluições seriadas realizadas para contabilizar o número aproximado de células bacterianas inoculadas no sistema hidropônico 24
- Figura 3 - Desenho experimental do sistema de hidropônico. As plântulas controle (sem inoculação de bactéria) e as plântulas inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo em baixa e alta concentração de diferentes fertilizantes nitrogenados 25
- Figura 4 - Esquema do processo de todo o experimento desde a cultura de tecido *in vitro* até a coleta do experimento, demonstrando o tempo de cada tratamento e as datas ao lado simbolizam o dia que foi realizado cada etapa 26
- Figura 5 - Representação dos frascos contendo meio LGI-P semissólido 27
- Figura 6 - Plântula de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* em meio MSM 30
- Figura 7 - Plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* em meio MSE 31
- Figura 8 - Bactéria *G. diazotrophicus* inoculada em cana-de-açúcar, visualizada por microscopia. As imagens foram feitas um dia após a inoculação, por microscopia de fluorescência de campo escuro (A e C) e de campo claro (B e D). A e B mostram imagens das bactérias crescidas em meio líquido usadas para a inoculação; e C e D mostram imagens das bactérias colonizando uma raiz de cana-de-açúcar 32
- Figura 9 - Representação das plântulas com a proteção de plástico para diminuir a taxa de evapotranspiração 33
- Figura 10 - Plântulas controle no sistema hidropônico (sem inoculação de bactéria) crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de NO₃ 34

Figura 11 - Plântulas controle no sistema hidropônico (sem inoculação de bactéria) crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de NO_4	34
Figura 12 - Plântulas no sistema hidropônico inoculadas com a bactéria <i>G. diazotrophicus</i> crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de NO_3	34
Figura 13 - Plântulas no sistema hidropônico inoculadas com a bactéria de <i>G. diazotrophicus</i> crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de NH_4	35
Figura 14 - Demonstração de como foi feita a análise fenotípica do comprimento da parte aérea e das raízes das plântulas retiradas do sistema hidropônico	36
Figura 15 - Características fenotípicas pelas plântulas controle (sem inoculação de bactéria) crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de NO_3 e NH_4 . Após 12 dias da inoculação de diferentes fertilizantes nitrogenados	36
Figura 16 - Características fenotípicas apresentadas pelas plântulas inoculadas com a bactéria <i>G. diazotrophicus</i> crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de NO_3 e NH_4 , respectivamente, após 14 e 16 dias da inoculação com diferentes fertilizantes nitrogenados	37
Figura 17 - Análise do comprimento da parte aérea das plantas inoculadas com <i>G. diazotrophicus</i> , crescendo em diferentes concentrações de fertilizantes químico nitrogenado. O gráfico apresenta os dados dos comprimentos das raízes de cada três plantas testadas e inoculadas com a bactéria <i>G. diazotrophicus</i> crescendo de 14 a 16 dias em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. No total os dados de 12 indivíduos foram analisados	38
Figura 18 - Os valores representam a média em três indivíduos analisados por condição de tratamento e a barra indica o desvio padrão do comprimento da parte aérea	38
Figura 19 - Análise do comprimento das raízes das plantas inoculadas com <i>G. diazotrophicus</i> , crescendo em diferentes concentrações de fertilizantes químico nitrogenado. O gráfico apresenta os dados dos comprimentos das raízes de cada três	

plantas testadas e inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo de 14 a 16 dias em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. No total os dados de 12 indivíduos foram analisados 39

Figura 20 - Os valores representam a média em três indivíduos analisados por condição de tratamento e a barra indica o desvio padrão do comprimento das raízes 39

Figura 21 - Análise do peso fresco da parte aérea das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*, crescendo em diferentes concentrações de fertilizantes químico nitrogenado. O gráfico apresenta os dados dos comprimentos das raízes de cada três plantas testadas e inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo de 14 a 16 dias em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. No total os dados de 12 indivíduos foram analisados 40

Figura 22 - Os valores representam a média em três indivíduos analisados por condição de tratamento e a barra indica o desvio padrão do peso fresco da parte aérea 40

Figura 23 - Análise do peso fresco da parte aérea das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*, crescendo em diferentes concentrações de fertilizantes químico nitrogenado. O gráfico apresenta os dados dos comprimentos das raízes de cada três plantas testadas e inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo de 14 a 16 dias em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. No total os dados de 12 indivíduos foram analisados 41

Figura 24 - Os valores representam a média em três indivíduos analisados por condição de tratamento e a barra indica o desvio padrão do peso fresco das raízes 41

Figura 25 - Análise do peso seco da parte aérea das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*, crescendo em diferentes concentrações de fertilizantes químico nitrogenado. O gráfico apresenta os dados dos comprimentos das raízes de cada três plantas testadas e inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo de 14 a 16 dias em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. No total os dados de 12 indivíduos foram analisados 42

Figura 26 - Os valores representam a média em três indivíduos analisados por condição de tratamento e a barra indica o desvio padrão do peso seco da parte aérea 42

Figura 27 - Demonstração da colonização de *G. diazotrophicus* no meio semissólido LGI-P, formação de uma película (halo) característica do crescimento da bactéria microaerófila e fixação de N₂, juntamente com a mudança de cor do meio devido a acidificação do meio, sendo que o meio abaixo da película fica incolor devido à assimilação do azul de bromotimol pelas bactérias 44

Figura 28 - Demonstração dos frascos de plantas controle contaminados, crescimento de bactérias algumas com caráter de bactéria fixadora de N₂ pela formação do halo (película) característica 44

Figura 29 - Visualização por microscopia de fluorescência de campo claro, de uma alíquota dos frascos contendo as diluições das plântulas controle contaminadas. É possível observar as hifas de fungos, protozoários (paramécios) e muitas bactérias. A imagem foi feita 14 dias após iniciado o tratamento com diferentes concentrações e fontes de nitrogênio 45

Figura 30 - Análise do efeito do nitrogênio na colonização de *G. diazotrophicus*, crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de diferentes fertilizantes nitrogenados (NO₃ e NH₄). A colonização pelas bactérias foi quantificado pelo método do NMP. O gráfico apresenta os valores plotados numa escala de log₂, em plantas a 14 e 16 dias após a inoculação e crescendo a 33 e 35 dias respectivamente, em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. Os dados de dez indivíduos foram analisados 46

Figura 31 - Os valores representam a média em três indivíduos analisados por condição de tratamento e a barra indica o desvio padrão da análise do efeito do nitrogênio na colonização de *G. diazotrophicus* 47

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

cv - Cultivar

DO - Densidade 3ptica

FBN - Fixação biol3gica de nitrog4nio

Gd - *Gluconacetobacter diazotrophicus*

GFP - *Green fluorescent protein*

IBA - 3cido indol-3-but3rico

LBMP - Laborat3rio de Biologia Molecular de Plantas

MS - Meio para micropropagação das plântulas

MSE - Meio para enraizamento das plântulas

MSM - Meio para multiplicação das plântulas

N - Nitrog4nio

NMP - N3mero Mais Provável

RFP - *Red fluorescent protein*

RN - Redutase do nitrato

RNi - Redutase do nitrito

RPM - Rotação por minuto

6-BA - 6-benzilaminopurina

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma gramínea de grande relevância para a economia brasileira. O dinitrogênio (N_2) apesar de ser um gás abundante na atmosfera terrestre, em sua forma molecular esse gás se encontra indisponível para plantas e animais. O uso de fertilizantes nitrogenados é uma opção para enriquecimento de solos pobres em nitrogênio. Outra maneira do N_2 ser ofertado às plantas é através da associação com bactérias fixadoras de nitrogênio, a qual são denominadas bactérias diazotróficas. Sendo assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a interação entre plantas de cana-de-açúcar e a bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença de diferentes fontes e concentrações de fertilizante nitrogenado, visando uma maior eficiência do uso do nitrogênio. O projeto foi realizado em cinco etapas como cultura da bactéria diazotrófica *G. diazotrophicus*, cultivo *in vitro* de cana-de-açúcar, cultivo hidropônico de cana-de-açúcar, tratamento com diferentes fontes de N (NO_3 e NH_4) e concentrações: baixo N (0,5 mM) e alto N (5mM), e contagem do número de bactérias *G. diazotrophicus* pelo método do Número Mais Provável através da tabela de MCCrandy. Ao longo do trabalho, o processo de obtenção da cultura de tecido *in vitro* de cana-de-açúcar cv. SP70-1143 foi realizado com êxito, como também a inoculação de plântulas de cana-de-açúcar com a bactéria endofítica *G. diazotrophicus* cultivadas em quatro condições distintas de fertilizantes químicos nitrogenados. Os resultados em relação à avaliação da contribuição da bactéria endofítica *G. diazotrophicus* para o desenvolvimento vegetal e a avaliação do efeito da concentração do fertilizante químico nitrogenado na taxa de colonização interna desta mesma bactéria não foram satisfatórios.

Palavras-chave: Bactéria diazotrófica, cana-de-açúcar, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, fixação biológica de nitrogênio, nitrogênio.

ABSTRACT

Sugarcane is a graminaceous plant of great economical importance to Brazil. Although dinitrogen (N_2) is an abundant gas in the earth atmosphere, its molecular form is not ready available to plants and animals. The use of nitrogen fertilizers is an alternative to enrich N poor soils. Another alternative to deliver N_2 to plants is via association with nitrogen fixing bacteria known as diazotrophics. Here the objective is to evaluate the interaction between sugarcane plants and the diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* in the presence of different sources and concentrations of nitrogen fertilizers to improve the nitrogen use efficiency. The project was conducted in 5 phases with culture of diazotrophic bacterium *G. diazotrophicus*, in vitro growth of sugarcane plants, hydroponic growth, treatments with different source of N (NO_3 and NH_4) and concentrations low N (0,5 mM) and high N (5 mM), and counting of *G. diazotrophicus* cells by the most probable number approach using the MCCrandy's table. Sugarcane plantlets from cv. SP70-1143 were successfully obtained from in vitro tissue culture and were inoculated with the endophytic bacterium *G. diazotrophicus*. Unfortunately the results related to the contribution of endophytic bacterium *G. diazotrophicus* towards plant growth and development measured by the phenotypic analysis were not satisfactory. As well as the evaluation of the effect of concentration from nitrogen chemical fertilizers in the internal colonization ratio of endophytic bacterium.

Keywords: Diazotrophic bacterium, sugarcane, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, biological nitrogen fixation, nitrogen.

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma gramínea de grande relevância para a economia brasileira desde o início do século XVI. Em 2011, o Brasil foi considerado o maior produtor e exportador de cana do mundo, com aproximadamente 7,5 milhões de hectares cultivados (CHEAVEGATTI-GIANOTTO *et al.*, 2011). A cana-de-açúcar é uma planta classificada como monocotilêdonea pertencente à família Poaceae e gênero *Saccharum*, foi introduzida na América, a princípio, como planta ornamental. No Brasil, inicialmente foi utilizada para fazer garapa (caldo de cana) e, posteriormente, açúcar e aguardente (TAVARES *et al.*, 2010). Após a primeira grande crise mundial do petróleo em 1973, a busca por fontes de energia renováveis foi acelerada dando início ao aumento dos investimentos nesse cultivar, ressaltando o interesse em compreender melhor a biologia da cana-de-açúcar (MAPA, 2013).

O dinitrogênio (N_2) apesar de ser um gás abundante ocupando aproximadamente 78% da atmosfera terrestre, em sua forma molecular esse gás se encontra indisponível para plantas e animais. Sendo um fator limitante para o desenvolvimento vegetal (WITSCHI, 2000). Porém, este elemento é essencial para as plantas visto que é constituinte obrigatório de aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos, podendo ser encontrado também no solo nas formas iônicas nítrica (NO_3^-) e amoniacal (NH_4^+) (HENRIQUES *et al.*, 2011). Os íons nitrato e amônio são prontamente absorvidos pela planta, e a assimilação desses compostos compreende os processos de redução do nitrato a amônio (BREDEMEIER & MUNDSTOCK, 2000), através da enzima redutase do nitrato (RN) localizada no citoplasma que reduz o nitrato a nitrito (NO_2^-), em seguida este é convertido a amônio por intermédio da enzima redutase do nitrito (RNi) localizada no cloroplasto ou plastídio, logo após ocorre incorporação do amônio em aminoácidos (CRAWFORD, 1995).

A utilização de fertilizantes nitrogenados é uma opção para enriquecimento de solos pobres em N. Estes podem ser obtidos pelo método Haber-Bosch através da indústria química, cujo processo de obtenção de sulfato de amônia ocorre através da fixação N_2 (WITSCHI, 2000). Entretanto, os fertilizantes representam um grande problema ambiental, pois uma vez aplicados no solo, tornam-se um contaminante potencial de reservatórios de água como rios e lençóis freáticos, causando até eutrofização (TAVARES *et al.*, 2010). Deste modo, será um grande desafio para

sustentar a produtividade e manter a proteção ambiental do ecossistema conseguir suprir a demanda do nitrogênio pela planta sem promover desperdícios ou criar déficit de produção.

Outra maneira de tornar disponível o N_2 presente na atmosfera para os vegetais é através de descargas elétricas ou raios que fixam o N_2 em forma de nitrito, ou ainda o N_2 pode ser ofertado às plantas através da associação com bactérias fixadoras de nitrogênio (LEIGH *et al.*, 2002). Estas bactérias são denominadas bactérias diazotróficas e caracterizam-se por possuir um complexo enzimático chamado nitrogenase capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia (NH_3), transformando assim o N_2 em formas assimilares para as plantas (SANTI *et al.*, 2013). Dessa forma, plantas de cana-de-açúcar podem ser colonizadas por bactérias diazotróficas, dentre elas a bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Estas bactérias são capazes de suprir a planta de cana-de-açúcar com até mais que a metade da demanda deste elemento químico (BODDEY *et al.*, 1995). Os benefícios gerados pela associação da planta de cana-de-açúcar com a bactéria endofítica *G. Diazotrophicus* vão muito além do fornecimento de N proveniente da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). As bactérias diazotróficas são capazes de promover o crescimento da planta pela produção e modulação de fitormônios, ativação do sistema imune para uma resposta rápida a invasão por patógeno e aumento da tolerância ao estresse hídrico (HARDOIM *et al.*, 2015). Portanto, a FBN pode ser uma solução para a redução da aplicação de fertilizantes nitrogenados aumentando assim a eficiência do uso do nitrogênio pela planta.

Existem custos e benefícios para que as plantas hospedeiras associem-se aos micro-organismos. As plantas hospedeiras são capazes de discriminar os simbiosites com maior eficiência e recompensá-los com mais fotoassimilados estimulando assim a cooperação (KIERS *et al.*, 2003; KIERS *et al.*, 2011). Igualmente, os micro-organismos simbiosites também reforçam a cooperação fornecendo mais nutrientes, tais como nitrogênio e fósforo, somente às raízes que aprovisionam mais carboidratos para fortalecer a simbiose (KIERS *et al.*, 2003; KIERS *et al.*, 2011). Esta associação mutualística necessita que ambos parceiros contribuam para o benefício mútuo, evitando a formação de associações com oportunistas.

Desta forma, o presente trabalho visa avaliar a interação entre plantas de cana-de-açúcar e a bactéria diazotrófica endofítica *G. diazotrophicus* na presença de diferentes fontes e concentrações de fertilizantes nitrogenados, com o objetivo de

melhorar a eficiência do uso do nitrogênio. Espera-se que a bactéria diazotrófica apresente maior colonização endofítica nas condições limitantes de nitrogênio. No entanto a disponibilidade abundante de nitrogênio químico inibirá a associação benéfica, diminuindo assim a taxa de colonização das bactérias diazotróficas.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho consiste em avaliar a interação entre plantas de cana-de-açúcar e a bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* na presença de diferentes fontes e concentrações de fertilizante nitrogenado, visando uma maior eficiência do uso do nitrogênio.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter cultura de tecido *in vitro* de cana-de-açúcar cv. SP70-1143;
- Avaliar a capacidade de colonização da bactéria endofítica *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 (BR11281) marcadas com RFP em plântulas de cana-de-açúcar cv. SP70-1143;
- Cultivar plântulas de cana-de-açúcar em sistema de hidroponia com quatro condições distintas de fertilizantes químicos nitrogenados com as concentrações: alto (5 mM) e baixo (0,5 mM) dos compostos: nitrato (NO_3^-) e ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), inoculadas ou não com a bactéria endofítica *G. diazotrophicus* estirpe PAL5 (BR11281);
- Avaliar a contribuição da bactéria endofítica *G. diazotrophicus* para o desenvolvimento vegetal através das análises fenotípicas;
- Avaliar o efeito da concentração dos fertilizantes químicos nitrogenados na taxa de colonização interna do cultivar pela bactéria endofítica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no período de janeiro a junho de 2016, no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (LBMP) do Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo De Meis da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.1. CULTURA DA BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA *G. diazotrophicus*

A bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5 (BR11281, Km^f, RFP) foi fornecida gentilmente pelo Dr. Ivo Baldani (EMBRAPA Agrobiologia, Seropédica, RJ). Para obtenção de colônias puras, a bactéria endofítica foi estriada em placa de petri contendo meio LGI-P sólido como descrito inicialmente por Baldani (1984). O meio LGI-P é um meio semisseletivo e indicativo que altera de cor quando a bactéria cresce e acidifica o meio. Na preparação do meio foram utilizados 100 g sacarose, 0,2 g K₂HPO₄, 0,6 g KH₂PO₄, 0,2 g MgSO₄ . 2 H₂O, 0,02 g CaCl₂ . 2 H₂O, 0,002 g Na₂MoO₄ . 2 H₂O, 5 ml azul de bromotimol (solução 0,5 % em 0,2N KOH), 0,01g FeCl₃ . 6 H₂O, 17 g ágar para cada litro de água destilada. Ácido acético foi usada para ajustar o pH final da solução em 5,5.

Após o crescimento em meio de cultura sólido foi feito um pré-inoculo em meio líquido para crescimento da bactéria, em um erlenmeyer adicionou-se algumas células provenientes de uma colônia pura da bactéria *G. diazotrophicus* em 20 ml de meio DYGS líquido o qual é composto de 2 g/L glicose, 1,5 g/L peptona bacteriológica, 2 g/L extrato de levedura, 0,5 g/L K₂HPO₄, 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O, 1,5 g/L ácido glutâmico, e o pH final da solução foi ajustado para 6,0. O meio foi autoclavado com vapor sob pressão de 1,06 kg cm⁻² à 121 °C por 15 min. Após aferrecido foi adicionado ao meio 0,3 g/L do antibiótico kanamicina (Kanaycin Monosulfate, St. Louis, USA). O antibiótico foi solubilizado em água destilada e esterilizado fisicamente por filtração com uma membrana de celulose com porosidade de 0,22 µm. O antibiótico kanamicina é utilizado para que cresça somente bactérias resistentes e não cresça colônias de outro tipo de bactérias, o gene *nptII* da bactéria endofítica *G. diazotrophicus* foi alterado para que o antibiótico não a elimine. (XIANG *et al.*, 1999).

Para o preparo do inoculante, o meio DYGS líquido foi usado por proporcionar melhores condições de crescimento da bactéria. O meio DYGS é um meio semisseletivo e é composto de 2 g/L glicose, 1,5 g/L peptona bacteriológica, 2 g/L extrato de levedura, 0,5 g/L K_2HPO_4 , 0,5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g/L ácido glutâmico. O meio foi preparado em água destilada e uma base (KOH) foi usada para ajustar o pH final da solução em 6,0. O meio foi esterilizado em autoclave com calor úmido sob pressão de $1,06 \text{ kg cm}^{-2}$ à 121°C por 15 min. O inóculo foi obtido ao adicionar 1 ml do pré-inóculo homogeneizado com densidade óptica em 660nm ($DO_{660\text{nm}}$) de 0,8 em 100mL de meio DYGS e incubado à temperatura de 30°C sob agitação constante (150 RPM) até atingir $DO_{660\text{nm}}$ igual a 1,0.

Análise espectrofotométrica da DO serve para medir a turbidez de uma cultura microbiana estimando, mesmo que de maneira indireta, a concentração das células. A DO corresponde ao grau de absorbância da cultura, onde a intensidade da luz incidente é a intensidade da luz transmitida através da suspensão de células. Descrita pela expressão $DO = \log(I_0/I)$, sendo I_0 constitui a intensidade da luz incidente e I a intensidade da luz transmitida. (ALBIERO, 2013).

3.2. CULTURA *IN VITRO* DE CANA-DE-AÇÚCAR

No período de janeiro a abril foi realizada a cultura *in vitro* de plantas de cana-de-açúcar, gênero *Saccharum sp.* genótipo cv. SP70-1143. Para micropropagação, as plântulas foram cultivadas em meio composto de 4,33 g/L mistura salina basal (Sigma-Sldrich, St. Loius, USA) e 20 g/L sacarose (Murashigue e Skoof, 1962) (MS). O meio foi preparado em água destilada, e ajustado para o pH final da solução em 5,7 com KOH. O meio foi finalmente autoclavado com vapor sob pressão de $1,06 \text{ kg cm}^{-2}$ à 121°C por 15 min.

Para estimular multiplicação das plântulas de cana-de-açúcar foram adicionados ao meio MS arrefecido 150 mg/L ácido cítrico como composto anti-oxidante e os fitohormônios cinetina (0,1 mg/L) e 6-BA (6-benzilaminopurina; 0,2 mg/L).

Uma vez multiplicado um número mínimo de plântulas clones de cana-de-açúcar, estas foram cultivadas em meio que favorece o desenvolvimento das raízes.

Foram adicionados ao meio MS arrefecido 150 mg/L ácido cítrico; 0,1 mg/L cinetina e 0,2 mg/L ácido indol-3-butírico (IBA).

Durante o crescimento *in vitro*, as plântulas de cana-de-açúcar foram mantidas em condições controladas com ciclo diário de luz de 12 h e temperatura de 28°C, como demonstrado na Fig. 1.



Figura 1 - Plântulas de cana-de-açúcar mantidas em condições controladas com ciclo diário de luz de 12 h e temperatura de 28 °C

3.3. CULTIVO HIDROPÔNICO

Após um mês sendo cultivadas *in vitro* em meio MSE, as plântulas enraizadas de cana-de-açúcar foram transferidas para cultivo hidropônico. Nesse sistema as plantas cresceram por sete dias sem adição de hormônios em solução modificada de 0,5x Hoagland: 1 ml KH_2PO_4 1 M, 5 ml KNO_3 1M; 5 ml $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ (ureia) 1M, 5 ml CaSO_4 1 M, 5 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 M, 1 ml de solução de FeEDTA 1,64% (ou 1,21 g $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}/100$ ml e adicionar $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), 1 ml de solução de micronutrientes (2,86g de H_3BO_3 , 1,81 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 0,22 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,08 de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,02g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, em 1 litro de solução), a qual foi descrita inicialmente por Hoagland & Arnon (1950). O solução de Hoagland foi preparada com água destilada, e uma base (KOH) foi usada para ajustar o pH final da solução em 5,7.

Após adaptação a solução hidropônica, a solução inicial de Hoagland foi trocada por uma segunda solução modificada de Hoagland 0,5x: 5 ml K_2SO_4 0,5M, 2 ml MgSO_4

. 7 H₂O 1 M, 10 ml Ca(H₂PO₄)₂ 0,05M, 200 ml CaSO₄ 0,01 M, 1 ml de solução de FeEDTA 1,64% (ou 1,21 g Na₂H₂EDTA/100 ml e adicionar FeCl₃ . 6 H₂O), 1 ml de solução de micronutrientes (2,86 g de H₃BO₃, 1,81 g de MnCl₂ . 4 H₂O, 0,22 g de ZNSO₄ . 7 H₂O, 0,08 de CuSO₄ . 5 H₂O, 0,02 g de Na₂MoO₄ . 2 H₂O, em 1 litro de solução). Essa solução foi preparada com água destilada sem adição de nitrogênio, e uma base (KOH) foi usada para ajustar o pH final da solução em 5,7.

Nesta solução, as plântulas permaneceram por quatro dias, onde verificou-se que as raízes ainda estavam muito pequenas, sendo então necessário trocar uma segunda vez pela mesma solução e permanecer por mais 6 dias para desenvolvimento das raízes.

Em seguida, foi feita a inoculação com *G. diazotrophicus*, na fase log de crescimento. Uma alíquota de 40 ml da bactéria crescendo em meio DYGS foi centrifugada por 10 minutos a 3000 g. O sobrenadante foi descartado e 10 ml de solução modificada de Hoagland sem nitrogênio foi usado para homogeneizar o pellet formado. Finalmente o homogenato de bactéria foi aplicado nas plantas da cana-de-açúcar SP70-1143. Para contabilizar o número aproximado de células bacterianas inoculadas, uma alíquota de 10 µl do homogenato final foi utilizada em diluições seriadas em solução salina a 0,9% previamente autoclavada. Esse procedimento pode ser melhor compreendido na Fig. 2. Alíquota de 100 µl de cada diluição foi usada na semeadura em placas de Petri contendo meio DYGS sólido. O desenho experimental do sistema hidropônico demonstrando os tipos de tratamentos utilizados se apresenta na Fig. 3.

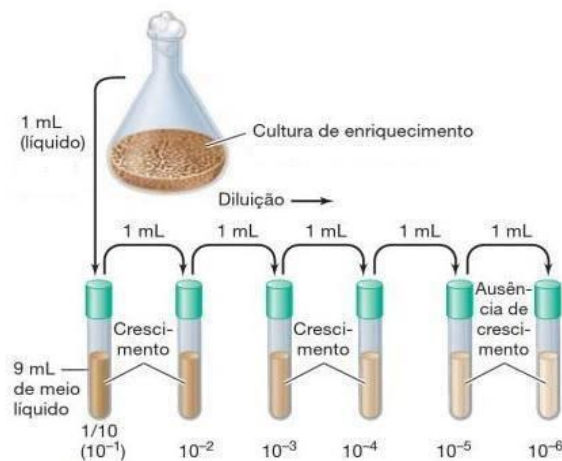


Figura 2 - Esquema representativo das diluições seriadas realizadas para contabilizar o número aproximado de células bacterianas inoculadas no sistema hidropônico
Fonte: MADIGAN, MARTIKO, BENDER, BUCKLEY & STAHL (2016)

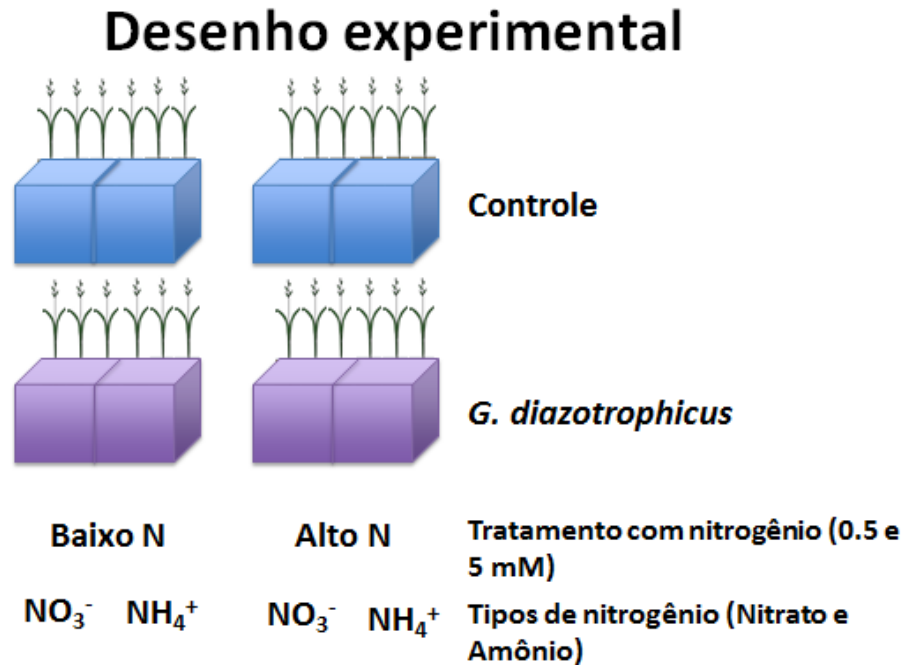


Figura 3 - Desenho experimental do sistema de hidropônico. As plântulas controle (sem inoculação de bactéria) e as plântulas inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo em baixa e alta concentração de diferentes fertilizantes nitrogenados

3.4. TRATAMENTO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO

Após dois dias da inoculação com *G. diazotrophicus* iniciou-se o tratamento com diferentes fontes de N (NO_3^- e NH_4^+) e concentrações: baixo N (0,5 mM) e alto N (5mM). A segunda solução de Hoagland foi removida completamente, e uma nova solução preparada de Hoagland foi reposta. Para o início dos tratamentos com nitrogênio, um tubo falcon foi preparado para cada condição. Em 50 ml de água destilada foram adicionados:

- 1,06 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ para o tratamento de baixo N 0,5 mM de NO_3^-
- 0,270 g $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ para o tratamento de baixo N 0,5 mM de NH_4^+
- 10,626 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ para o tratamento de alto N 5 mM de NO_3^-
- 2,703 g $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ para o tratamento de alto N 5 mM de NH_4^+

Os tubos falcons foram bem agitados e colocados cada um em seu respectivo sistema hidropônico. As plantas tratadas com diferentes fontes e concentrações de nitrogênio foram mantidos no sistema hidropônico por 14 ou 16 dias até a coleta. O esquema de todo o experimento está melhor representado na Fig. 4.

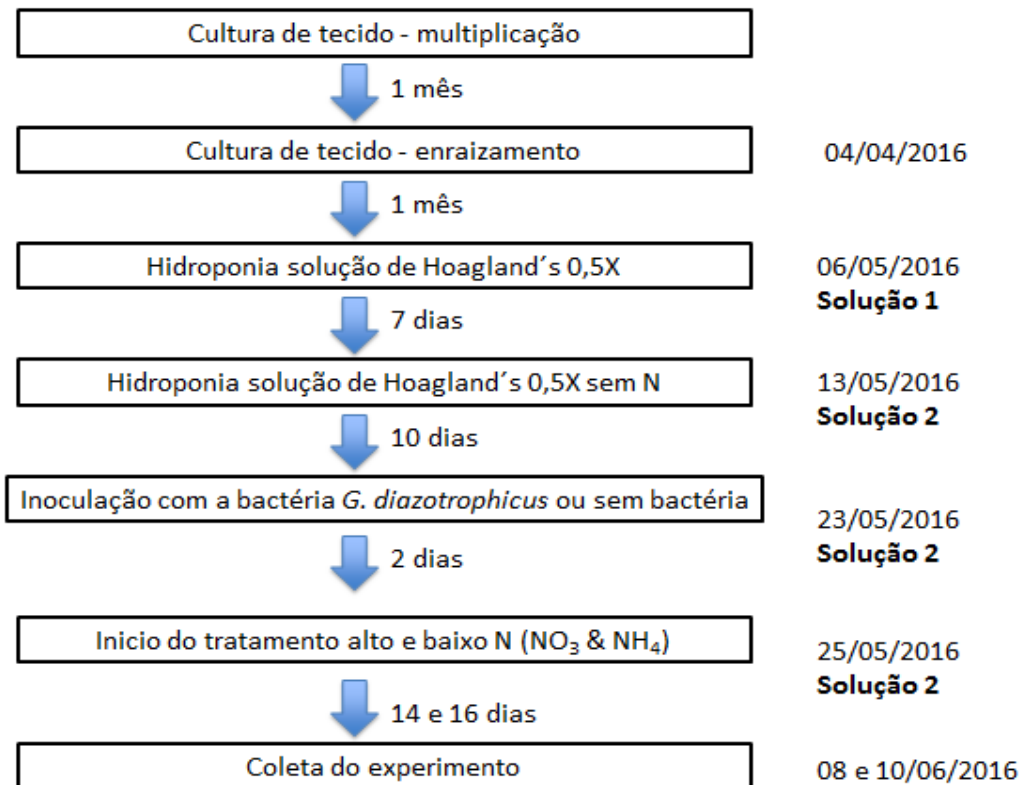


Figura 4 - Esquema do processo de todo o experimento desde a cultura de tecido *in vitro* até a coleta do experimento, demonstrando o tempo de cada tratamento e as datas ao lado simbolizam o dia que foi realizado cada etapa

3.5. CONTAGEM DO NÚMERO DE BACTÉRIAS *G. diazotrophicus*

Para contagem de bactérias *G. diazotrophicus* foi adotado o método de número mais provável (NMP) descrito anteriormente por Döbereiner *et al.* (1995). O cultivo de *G. diazotrophicus* foi realizado em meio semissólido LGI-P, usando 1,8 g de ágar para deixar o meio semissólido. Essa condição cria um gradiente de concentração de oxigênio no meio o que permite que células bacterianas diazotróficas migrem para região mais favorável à fixação do nitrogênio atmosférico. A formação de um halo de crescimento bacteriano na sub-superfície do meio indica que as células estão fixando nitrogênio. O meio foi preparado com água destilada, e ácido acético foi usado para ajustar o pH final da solução em 5,5. Em seguida, foram distribuídos 4 ml de meio LGI-P semissólido em frascos de vidro com capacidade de 15 ml. Ao todo foram preenchidos 216 frascos como demonstrado na Fig. 5.

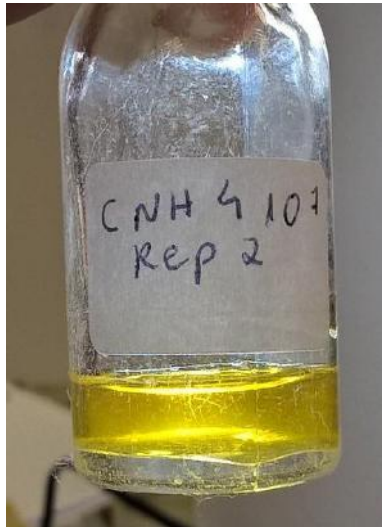


Figura 5 - Representação dos frascos contendo meio LGI-P semissólido

As coletas do experimento foram realizadas nos dias 14 e 16 após a inoculação com a bactéria diazotrófica. As plantas foram retiradas do sistema de hidroponia e os tecidos das raízes e da parte aérea foram separados com uso de um bisturi. As raízes foram submetidas ao processo de esterilização superficial que consiste na imersão das raízes em solução cloramina-T à 1% (0,5 g cloramina-T adicionado em 50 ml de água destilada) por 1 minuto. Para remover o composto cloramina-T as raízes foram lavadas três vezes em solução salina com 0,9% NaCl por 1 minuto cada vez. Logo depois, as raízes foram colocadas em eppendorf sendo acrescentado o volume proporcional de 9 ml de solução salina por cada 1 g de raiz. As raízes foram maceradas com o auxílio de bolinhas metálicas de 3 mm de diâmetro em um homogeneizador (Retsch, Haan Alemanha). Os tecidos das raízes foram rompidos usando uma frequência de 20 pulsos por 1 segundo, sendo esse processo repetido três vezes, no total de 3 minutos. Em seguida, as amostras descansaram por 1 hora sobre a mesa do laboratório a fim de decantar o tecido lisado. Posteriormente, foram feitas diluições seriadas em eppendorf contendo 900 μ l de solução salina (0,9% NaCl), adicionando 100 μ l da amostra com tecido lisado. Foram feitas diluições de 10^1 a 10^6 , sendo que cada diluição realizada no eppendorf foi transferido 100 μ l para frascos devidamente identificados com o meio LGI-P semissólido e estes foram incubados a 30 °C por sete dias.

Após os sete dias foram observados cada frasco para identificar quais formaram halo, película característica do crescimento e fixação de N_2 por bactéria diazotrófica juntamente com a mudança de cor do meio de amarelo para alaranjado devido a acidificação do pH pela bactéria. Através da observação e identificação dos frascos que

continham a película foi realizada a contagem do número de bactérias pelo método do Número Mais Provável (NMP) através da tabela de MCCrandy (em anexo).

3.6. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS

Para análises fenotípicas foram coletadas as medidas do comprimento das raízes e parte aérea, pesadas peso fresco da parte aérea e raízes. E após a secagem na estufa a 60 °C por sete dias foi pesado também o peso seco da parte área.

Utilizando a ferramenta Excel da Microsoft Office foram feitas as análises da média e desvio padrão dos três indivíduos analisados por cada condição de tratamento. Desta forma, foi analisado o comprimento da parte aérea e das raízes, peso fresco da parte aérea e das raízes, peso seco da parte aérea das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*, crescendo em diferentes concentrações de fertilizantes químicos nitrogenados (0,5 mM NO₃, 5 mM NO₃, 0,5 mM NH₄ e 5 mM NH₄). Os dados de 12 indivíduos foram analisados.

Utilizando a mesma ferramenta foi realizada a análise do efeito do nitrogênio na colonização de *G. diazotrophicus*, crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentrações de diferentes fertilizantes nitrogenados (NO₃ e NH₄) em plantas a 14 ou 16 dias após a inoculação e crescendo a 33 e 35 dias, respectivamente, em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. A colonização pelas bactérias foi quantificado pelo método do NMP. Os dados de dez indivíduos foram analisados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. OBTENÇÃO DE CULTURA DE TECIDO *IN VITRO* DE CANA-DE-AÇÚCAR CV. SP70-1143

O desenvolvimento das técnicas de cultura de tecidos de plantas foi inicialmente estabelecido como um procedimento a fim de construir padrões para investigar o desenvolvimento e crescimento das plantas (Henriques *et al.*, 2010). Atualmente, a técnica de cultura de tecidos de plantas também é aplicada aos estudos de nutrição mineral de plantas. A cultura de plantas *in vitro* baseia-se na capacidade que uma célula vegetal totipotente tem em se desenvolver até regenerar um organismo inteiro (Alves *et al.*, 1999). Assim órgãos ou plantas inteiras são obtidas através desse sistema. O meio de cultura mais utilizado para esse cultivo atualmente é a composição descrita por Murashigue e Skoog (1962).

Para obter plantas para o experimento proposto, foram cultivadas plântulas *in vitro* de cana-de-açúcar cv. SP70-1143. Os clones de cana-de-açúcar foram obtidos utilizando o meio MS suprido com hormônios que favorecem a multiplicação da parte aérea para a formação da touceira (conjunto de clones de uma planta). A regeneração da parte aérea foi alcançada com a aplicação do hormônio citocinina (Fig. 6). A citocinina é assim denominado devido a sua principal capacidade de regulação da citocinese (HENRIQUES *et al.*, 2010). O hormônio 6-BA, que também pertence à classe das citocininas, foi adicionado ao meio de multiplicação para aumentar a capacidade de regeneração através da estimulação da competência de divisão celular (VELTCHEVA & SVETLEVA, 2005). As plântulas de cana-de-açúcar pré-cultivadas com esses hormônios são favorecidas à induzir a proliferação de células competentes pré-existent no tecido.

Para favorecer o enraizamento das plântulas de cana-de-açúcar foi adicionado ao meio MS hormônios como a auxina que auxiliam a formação das raízes adventícias. Apenas um clone de plântula da touceira formada em meio que favorece a multiplicação (MSM) foi separada em cada frasco para o cultivo hidropônico. As auxinas são hormônios importantes na regulação do crescimento e desenvolvimento vegetal. A principal função das auxinas é promover o crescimento de raízes e caules, induzindo o

alongamento de novas células a partir dos seus respectivos meristemas (HENRIQUES *et al.*, 2010). Na formação de raízes adventícias as auxinas são as que apresentam maiores efeitos de formação. Ácido indol-3-butírico (IBA) é um auxina sintética que estimula a maior produção de enraizamento adventício em estacas caulinares e foliares (HARTMANN *et al.*, 2002).

Em ambos os meios que favorecem a multiplicação (MSM) e o enraizamento das plântulas (MSE) foi adicionado também hormônio cinetina o qual é um composto sintético do hormônio citocinina. A cinetina foi descoberta a partir da hidrólise do DNA, sendo primeiramente descrita como uma substância com habilidade de iniciar e sustentar a proliferação celular em cultura de tecidos de tabaco (KERBAUY, 2004). A ação dos hormônios auxinas e citocininas é de extrema importância para a formação completa do corpo da planta sob diversos aspectos, tais como, indução do alongamento e divisão celular e para a alteração do padrão de diferenciação das células. A razão entre citocininas e auxinas é o que determina o desenvolvimento dos tecidos aéreos e radiculares, respectivamente (HENRIQUES *et al.*, 2010).

Ao longo do crescimento das plântulas que estavam em meio que favorece o enraizamento (MSE), foi observado que as plântulas não se desenvolviam como o esperado. Ao verificar a concentração dos compostos no meio MSE, foi apurado que a concentração estava abaixo do recomendado em cerca de 1000x inferior a concentração recomendada no protocolo descrito inicialmente por Murashige & Skoog (1962). Deste modo, o desenvolvimento das raízes foi parcial, não alcançando o desejado. É possível observar na Fig. 7 o desenvolvimento das raízes após um mês em cultivo no meio MSE.



Figura 6 - Plântula de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* em meio MS



Figura 7 - Plântulas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* em meio MSE

4.2. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE COLONIZAÇÃO DA BACTÉRIA ENDOFÍTICA *G. diazotrophicus* ESTIRPE PAL5 (BR11281) MARCADAS COM RFP EM PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR CV. SP70-1143

A bactéria *G. diazotrophicus* marcada com a proteína RFP (*red fluorescent protein*) crescida em meio líquido, foi visualizada em microscopia de fluorescência antes de ser inoculada no sistema hidropônico com diferentes concentrações e fontes de N com o objetivo de confirmar que se estava inoculando a bactéria desejada. As imagens foram realizadas por microscopia de fluorescência de campo escuro e de campo claro da bactéria endofítica *G. diazotrophicus* crescida em meio líquido usadas para inoculação como demonstra a Fig. 8 (A e B). Após um dia da inoculação da bactéria endofítica *G. diazotrophicus* foi realizado um teste com as plântulas *in vitro*, onde foi visualizada a partir da microscopia de fluorescência de campo escuro e campo claro, a bactéria colonizando uma raiz de cana-de-açúcar, como demonstra a Fig. 8 (C e D).

A visualização em microscopia de fluorescência é possível devido ao gene repórter, o qual é um tipo de marcador introduzido na bactéria que não confere nenhum tipo de prejuízo às células e, ao mesmo tempo, produz um fenótipo observável em microscopia (Glick *et al.*, 1993). O sistema de marcação por RFP é uma das alternativas ao sistema GFP (*green fluorescent protein*), permitindo o uso simultâneo de bactérias

com marcadores distintos. O gene repórter RFP que é uma proteína vermelha fluorescente que foi descoberta em corais da espécie *Discosoma striata* (Shaner *et al.*, 2004) e sua visualização não é afetada pelas organelas das raízes.

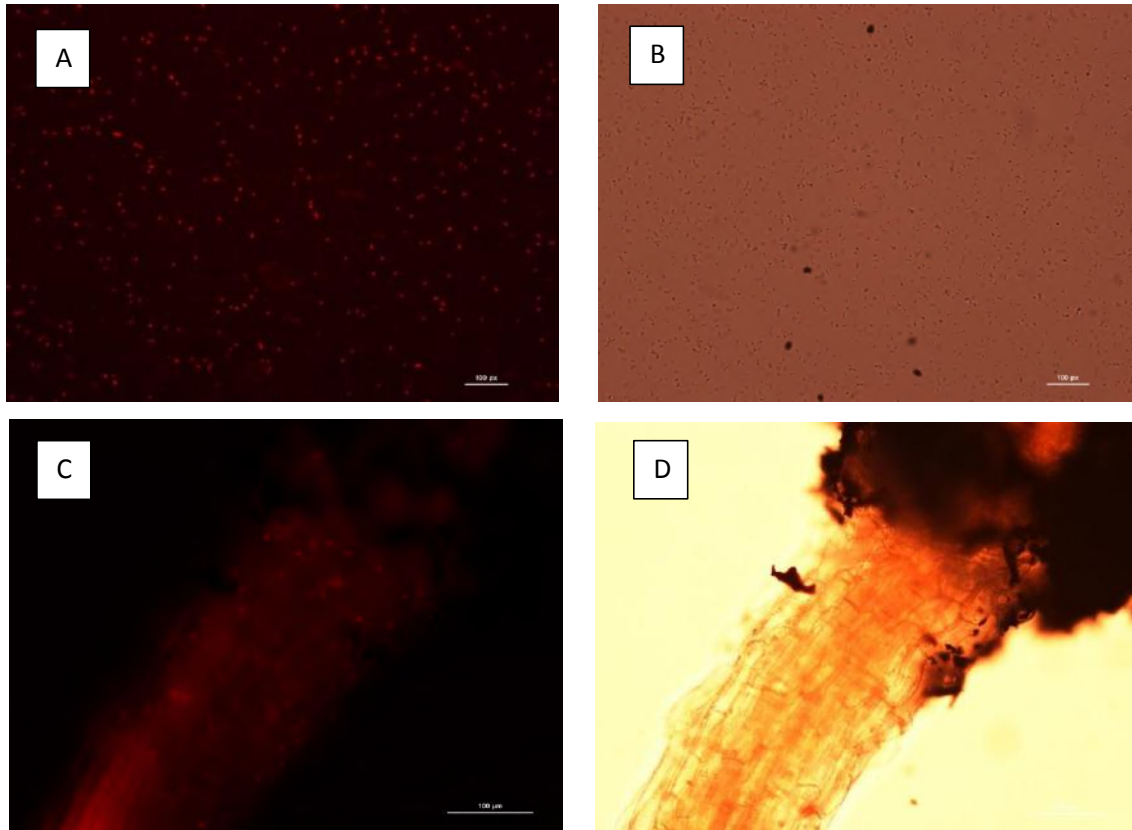


Figura 8 - Bactéria *G. diazotrophicus* inoculada em cana-de-açúcar, visualizada por microscopia. As imagens foram feitas um dia após a inoculação, por microscopia de fluorescência de campo escuro (A e C) e de campo claro (B e D). A e B mostram imagens das bactérias crescidas em meio líquido usadas para a inoculação; e C e D mostram imagens das bactérias colonizando uma raiz de cana-de-açúcar

4.3. CULTIVO DE PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EM SISTEMA DE HIDROPONIA COM QUATRO CONDIÇÕES DISTINTAS DE FERTILIZANTES QUÍMICOS NITROGENADOS COM AS CONCENTRAÇÕES: ALTO (5 mM) E BAIXO (0,5 mM) DOS COMPOSTOS: NITRATO (NO_3^-) E UREIA ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), INOCULADAS OU NÃO COM A BACTÉRIA ENDOFÍTICA *G. diazotrophicus* ESTIRPE PAL5 (BR11281)

Para investigar o efeito da fonte e concentração do nitrogênio na taxa de colonização das plantas de cana-de-açúcar com a bactéria diazotrófica *G.*

diazotrophicus o sistema de cultivo em hidroponia foi utilizado. Após crescimento *in vitro* em condições assépticas, as plantas de cana-de-açúcar foram transferidas para solução nutritiva (0,5X) de Hoagland e receberam uma proteção de plástico para diminuir a taxa de evapotranspiração (Fig. 9). Após uma semana de adaptação a cobertura plástica foi removida e a solução nutritiva de Hoagland renovada. Como as plantas de cana-de-açúcar não estavam com os tecidos radiculares bem desenvolvidos as mesmas foram mantidas por dez dias na solução Hoagland 2 (0,5X) sem N.



Figura 9 - Representação das plântulas com a proteção de plástico para diminuir a taxa de evapotranspiração

Em seguida, foi realizada a inoculação com diferentes concentrações (0,5 e 5 mM) e fontes de N (NO_3 e NH_4) nas plântulas com a bactéria *G. diazotrophicus* e sem bactéria. As plântulas controles (sem bactéria) foram mantidas durante 12 dias neste sistema até a coleta (Figs. 10 e 11) e as plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* permaneceram no sistema hidropônico por 14 ou 16 dias, como demonstrado nas Figs. 12 e 13. Em 14 dias foram retiradas todas as plântulas inoculadas com bactéria endofítica em baixo N (0,5 mM) e em 16 dias foram retiradas todas as plântulas inoculadas com a bactéria endofítica em alto N (5 mM).

As plântulas de cana-de-açúcar foram retiradas do sistema hidropônico em diferentes dias devido à limitação do tempo para retirá-las de todas as condições no mesmo dia.

Logo depois, foram realizadas as análises fenotípicas apresentadas por cada plântula mantida em cada condição de tratamento.

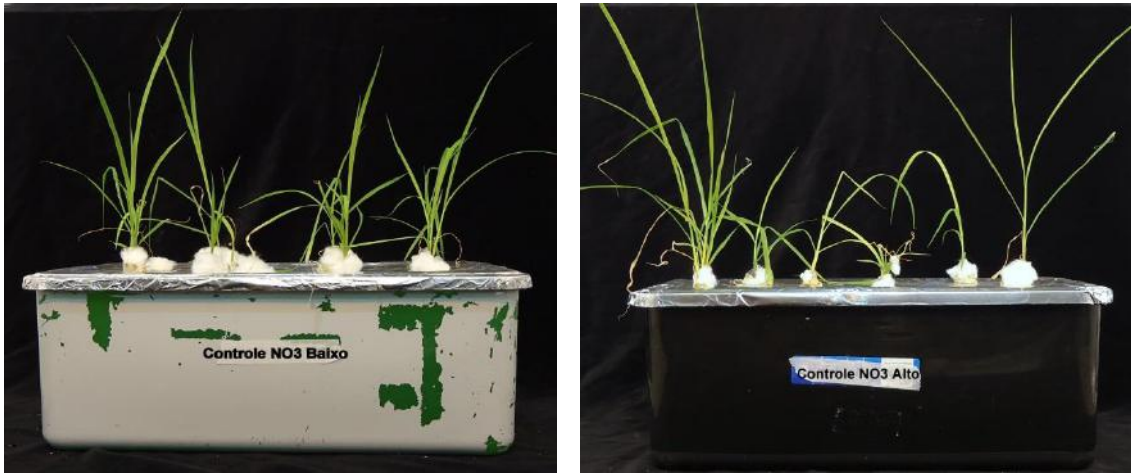


Figura 10 - Plântulas controle no sistema hidropônico (sem inoculação de bactéria) crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de NO_3

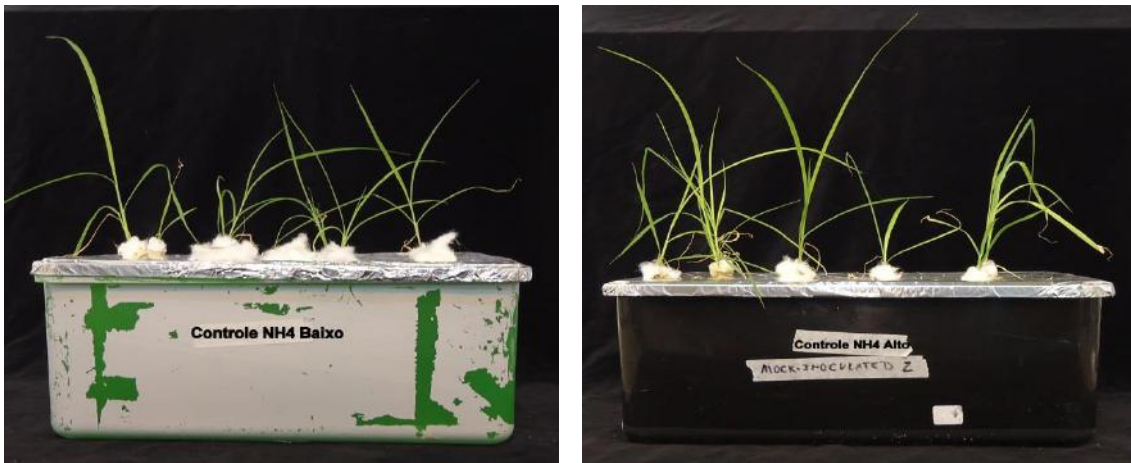


Figura 11 - Plântulas controle no sistema hidropônico (sem inoculação de bactéria) crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de NO_4

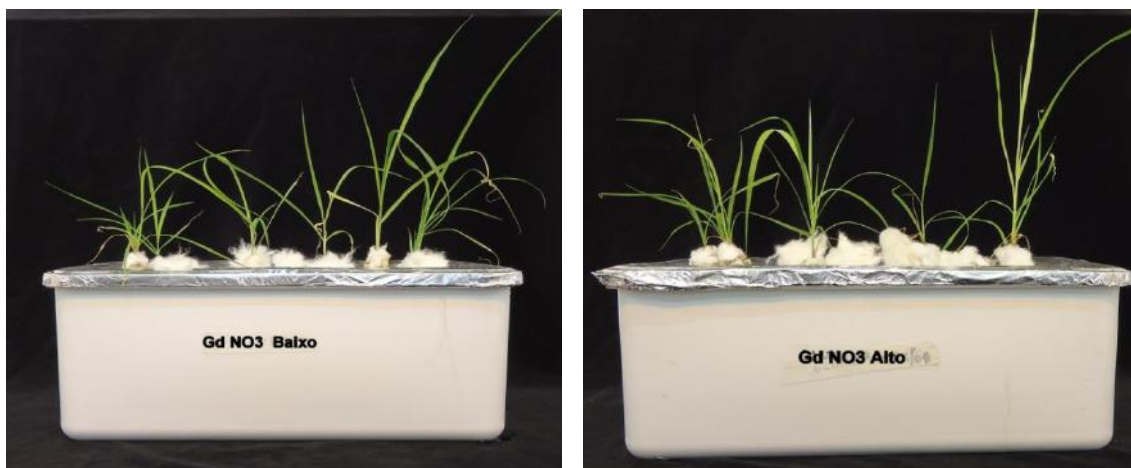


Figura 12 - Plântulas no sistema hidropônico inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de NO_3

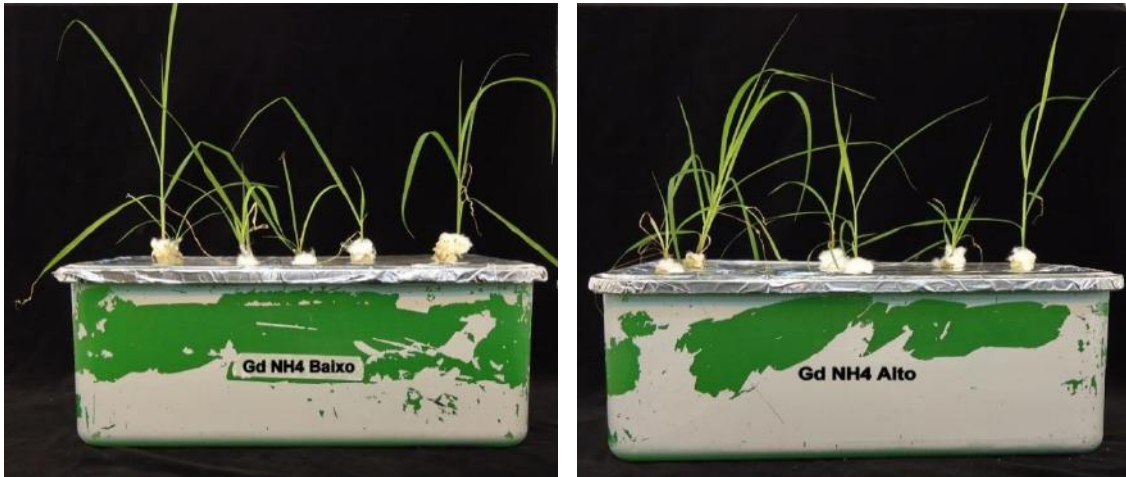


Figura 13 - Plântulas no sistema hidropônico inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de NH_4

4.4. AVALIAÇÃO DA CONTRIBUIÇÃO DA BACTÉRIA ENDOFÍTICA *G. diazotrophicus* PARA O DESENVOLVIMENTO VEGETAL ATRAVÉS DAS ANÁLISES FENOTÍPICAS

As características fenotípicas apresentadas por cada planta, tais como, comprimento da parte aérea, comprimento das raízes (Fig. 14), peso fresco da parte aérea, peso fresco das raízes e peso seco da parte aérea, foram coletadas após 12 dias as plântulas controle, ou seja, sem inoculação de bactéria em diferentes concentrações e fontes de N (Fig. 15). Após 14 ou 16 dias foram coletadas as mesmas características em plântulas inoculadas com a bactéria endofítica *G. diazotrophicus* em diferentes concentrações (0,5 e 5 mM) e fontes de N (NO_3 e NH_4), como demonstra a Fig. 16.

Tabela com todos os dados das características fenotípicas apresentadas por cada planta em diferentes condições de tratamento (em apêndice).

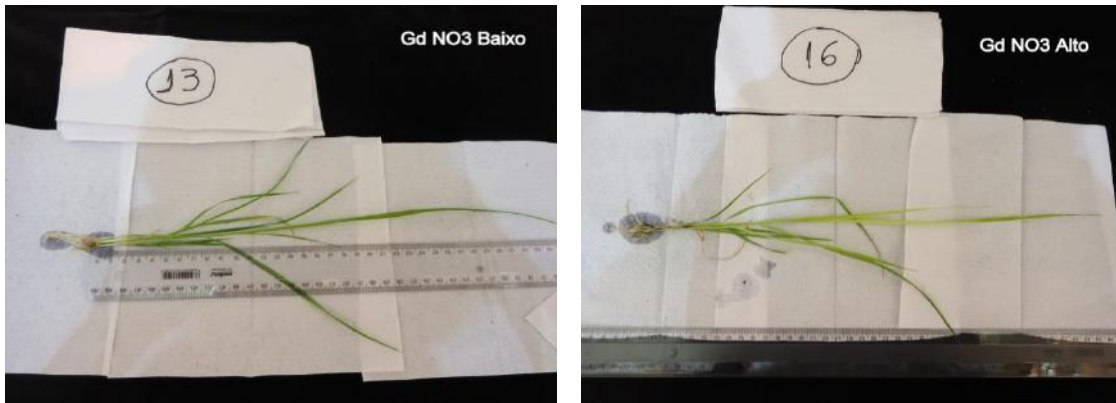


Figura 14 - Demonstração de como foi feita a análise fenotípica do comprimento da parte aérea e das raízes das plântulas retiradas do sistema hidropônico

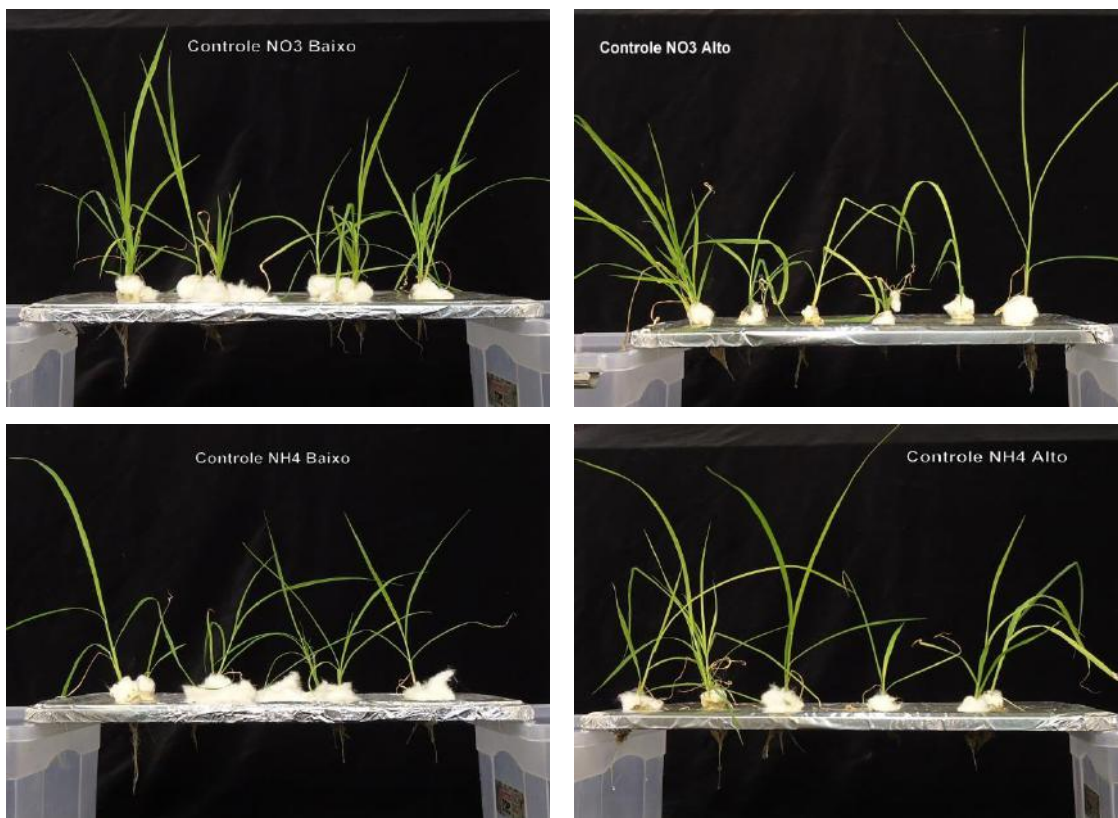


Figura 15 - Características fenotípicas apresentadas pelas plântulas controle (sem inoculação de bactéria) crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de NO_3 e NH_4 . Após 12 dias da inoculação de diferentes fertilizantes nitrogenados

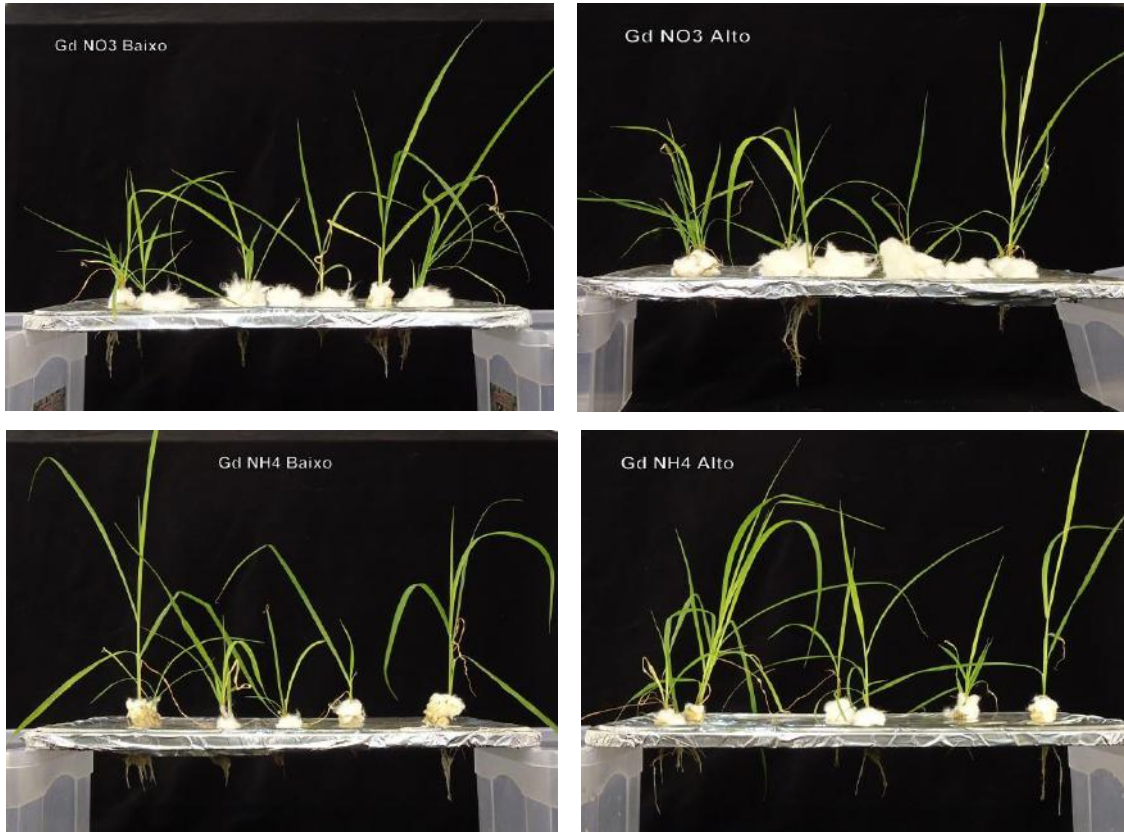


Figura 16 - Características fenotípicas apresentadas pelas plântulas inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de NO_3 e NH_4 , respectivamente, após 14 e 16 dias da inoculação com diferentes fertilizantes nitrogenados

A partir dos dados coletados foram feitas as análises da média e desvio padrão apresentados pelas plântulas utilizando a ferramenta Excel da Microsoft Office. Foi possível verificar que o desvio padrão permaneceu alto em todas as análises fenotípicas como observaremos a seguir, e os resultados não obtiveram uma diferença significativa em nível de análise estatística ($P < 0,05$) nos tratamentos quanto à contribuição da bactéria *G. diazotrophicus* para o desenvolvimento vegetal.

Entretanto, para comprimento da parte aérea foi possível observar uma tendência de aumento do crescimento, as plântulas apresentaram um melhor desenvolvimento quando tratadas com a concentração de N alta (5 mM) para a fonte de NO_3 quando comparada com o tratamento em baixa concentração (0,5 mM) de NO_3 . Contudo, para as plântulas tratadas com NH_4 , foi possível observar uma tendência inversa das plântulas terem se desenvolvido melhor em baixa concentração de N para a fonte de NH_4 (0,5 mM) quando comparado com o tratamento em alta concentração (0,5 mM) de NH_4 , como demonstrado nas Figs. 17 e 18.

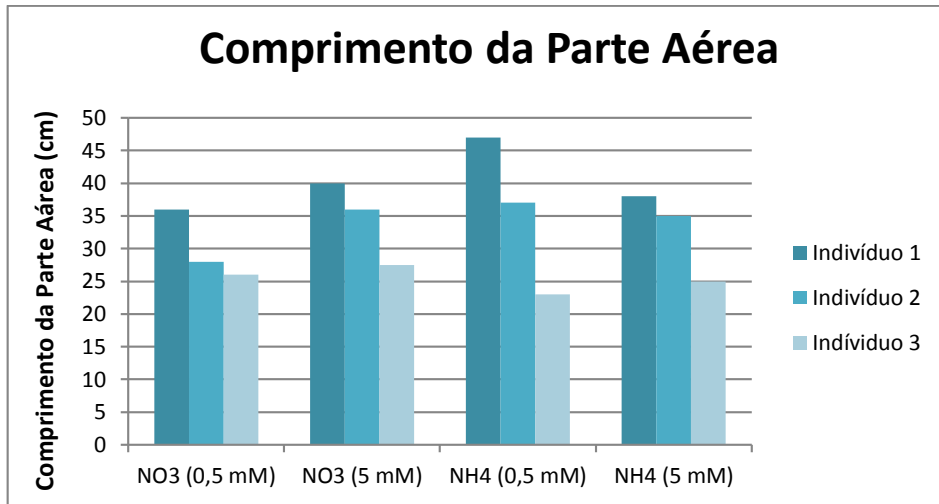


Figura 17 - Análise do comprimento da parte aérea das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*, crescendo em diferentes concentrações de fertilizantes químico nitrogenado. O gráfico apresenta os dados dos comprimentos das raízes de cada três plantas testadas e inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo de 14 a 16 dias em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. No total os dados de 12 indivíduos foram analisados

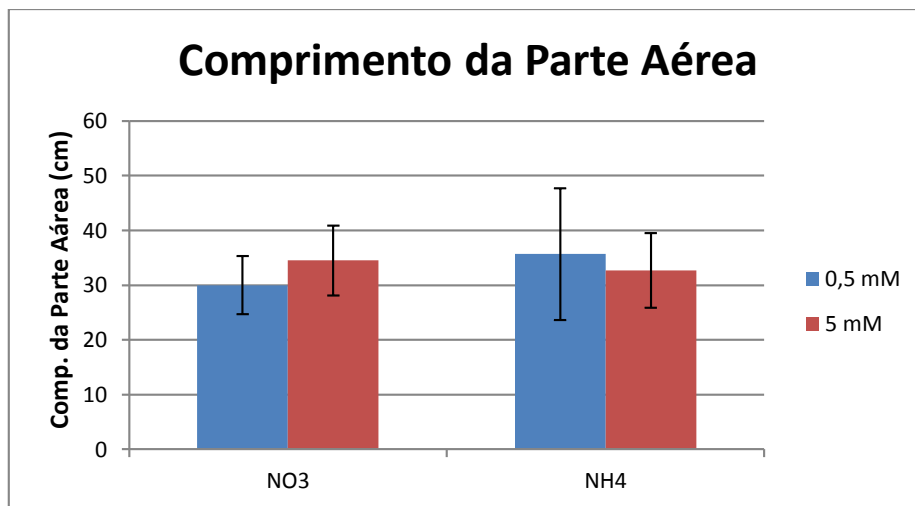


Figura 18 - Os valores representam a média em três indivíduos analisados por condição de tratamento e a barra indica o desvio padrão do comprimento da parte aérea

Para comprimento das raízes observou que ambas as plântulas sob a fonte de NO_3 e NH_4 tiveram uma tendência de aumento do crescimento, as raízes se desenvolveram melhor sob a concentração alta de N (5 mM) tanto para a fonte de NO_3 quanto para a fonte de NH_4 quando comparadas as plântulas tratadas com baixa concentração de NO_3 e NH_4 , como demonstrado nas Figs. 19 e 20.

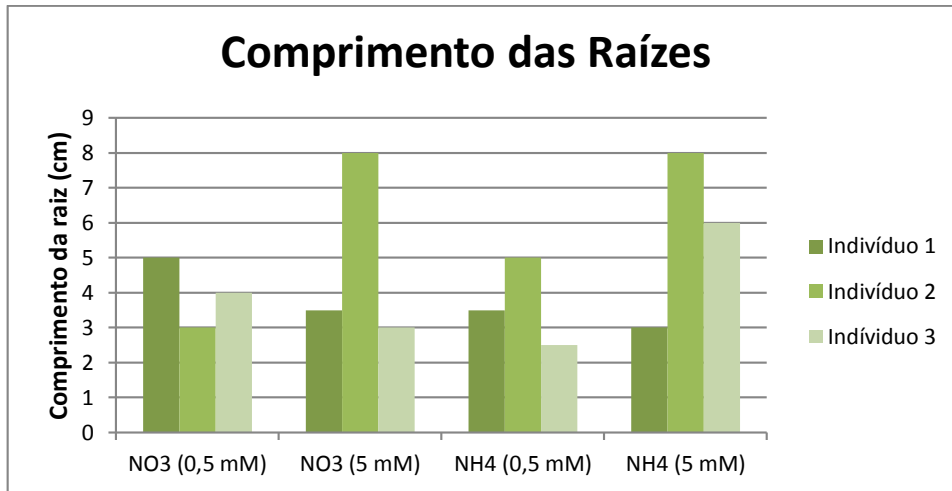


Figura 19 - Análise do comprimento das raízes das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*, crescendo em diferentes concentrações de fertilizantes químico nitrogenado. O gráfico apresenta os dados dos comprimentos das raízes de cada três plantas testadas e inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo de 14 a 16 dias em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. No total os dados de 12 indivíduos foram analisados

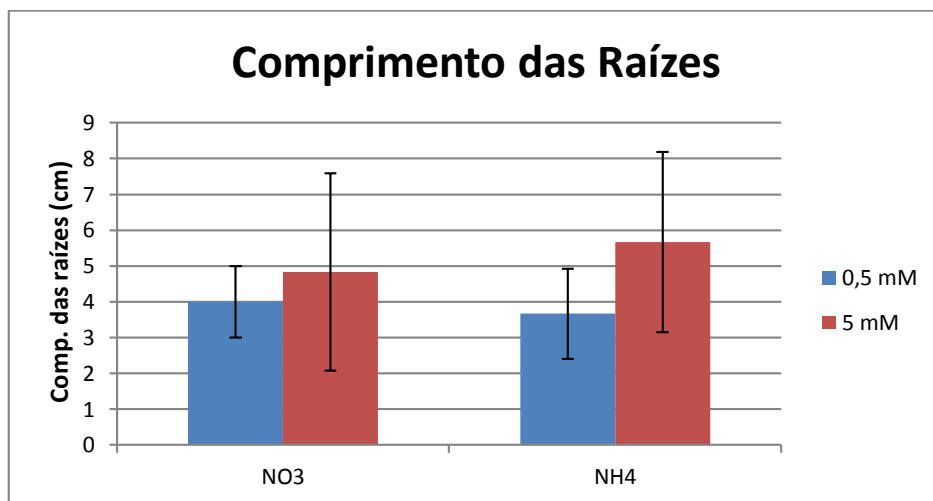


Figura 20 - Os valores representam a média em três indivíduos analisados por condição de tratamento e a barra indica o desvio padrão do comprimento das raízes

Para peso fresco da parte aérea, as diferenças foram bem pequenas. Mas foi observável uma tendência de um maior acúmulo de biomassa nas plântulas crescidas em concentração baixa (0,5 mM) de N para a fonte NO₃ quando comparadas as plântulas crescidas em alta concentração (5 mM). Porém, também obtiveram uma tendência de maior acúmulo de biomassa em concentração alta de N (5 mM) para a fonte NH₄, quando comparadas com as plântulas mantidas em baixa concentração (0,5 mM) de N para a fonte NH₄ (Figs. 21 e 22).

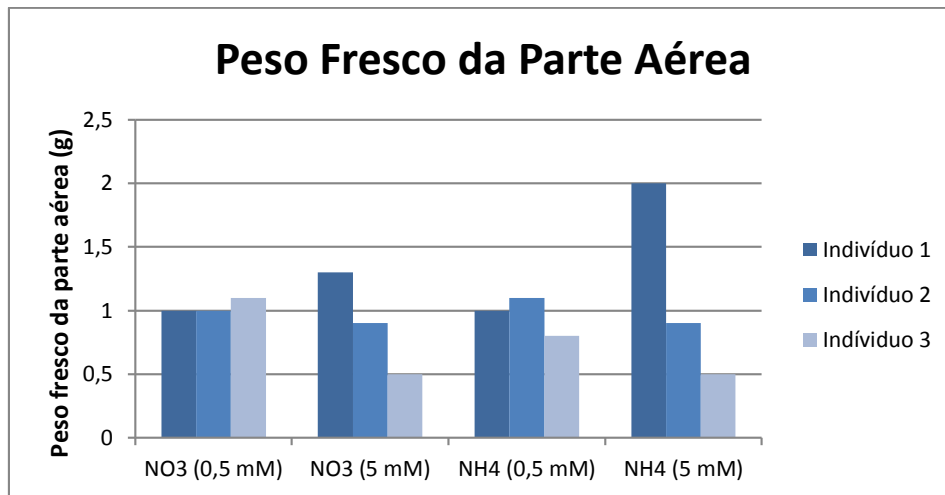


Figura 21 - Análise do peso fresco da parte aérea das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*, crescendo em diferentes concentrações de fertilizantes químico nitrogenado. O gráfico apresenta os dados dos comprimentos das raízes de cada três plantas testadas e inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo de 14 a 16 dias em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. No total os dados de 12 indivíduos foram analisados

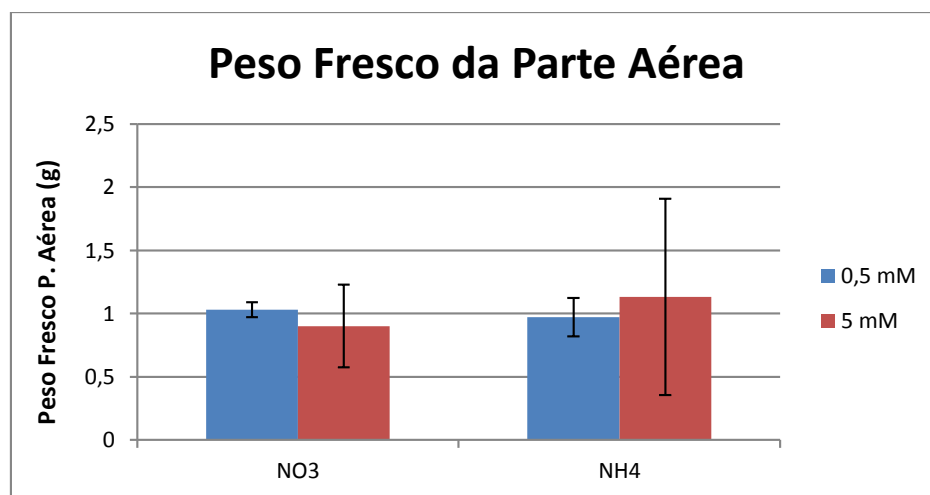


Figura 22 - Os valores representam a média em três indivíduos analisados por condição de tratamento e a barra indica o desvio padrão do peso fresco da parte aérea

Para peso fresco das raízes, a tendência para acúmulo de biomassa foi igual tanto para as plântulas mantidas sob a concentração de N baixa (0,5 mM) quanto para as plântulas mantidas em alta (5 mM) de NO₃. Contudo, para as plântulas crescidas sob a fonte de N NH₄, houve uma tendência para um maior acúmulo da biomassa as plântulas tratadas em alta concentração (5 mM) quando comparadas as plântulas tratadas em baixa concentração (0,5 mM) de NH₄, como demonstrado nas Figs. 23 e 24.

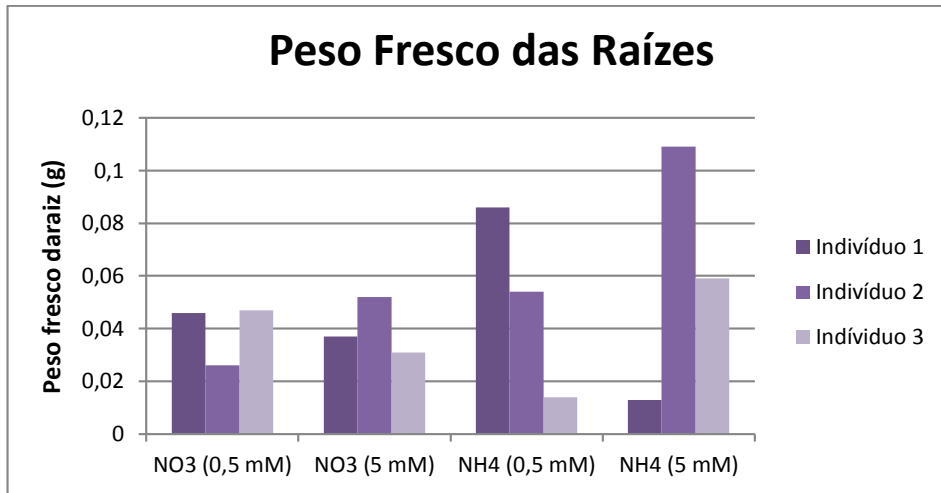


Figura 23 - Análise do peso fresco da parte aérea das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*, crescendo em diferentes concentrações de fertilizantes químico nitrogenado. O gráfico apresenta os dados dos comprimentos das raízes de cada três plantas testadas e inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo de 14 a 16 dias em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. No total os dados de 12 indivíduos foram analisados

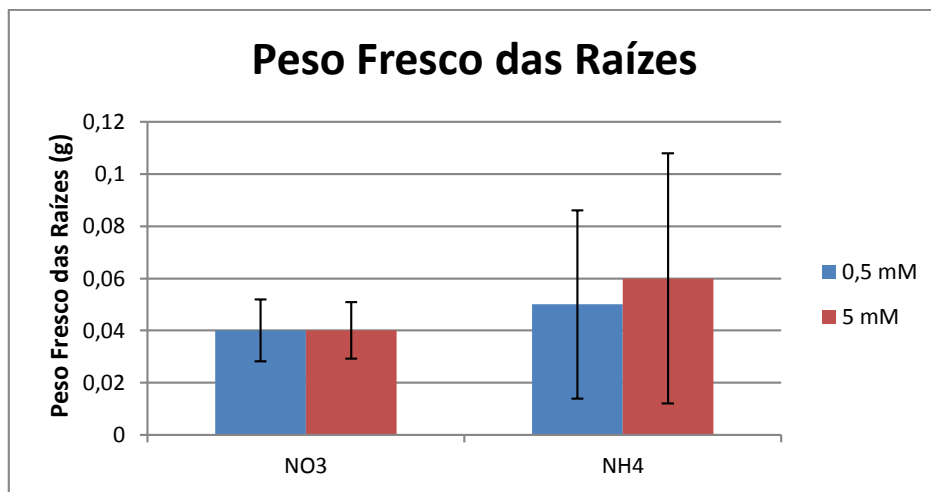


Figura 24 - Os valores representam a média em três indivíduos analisados por condição de tratamento e a barra indica o desvio padrão do peso fresco das raízes

Para peso seco da parte aérea, ambas as plântulas obtiveram uma tendência de maior acúmulo de biomassa quando mantidas em concentração alta de N (5 mM) tanto para a fonte de NO₃ quanto para de NH₄ quando comparadas as plântulas mantidas em baixa concentração (0,5 mM) de NO₃ e NH₄. (Figs. 25 e 26).

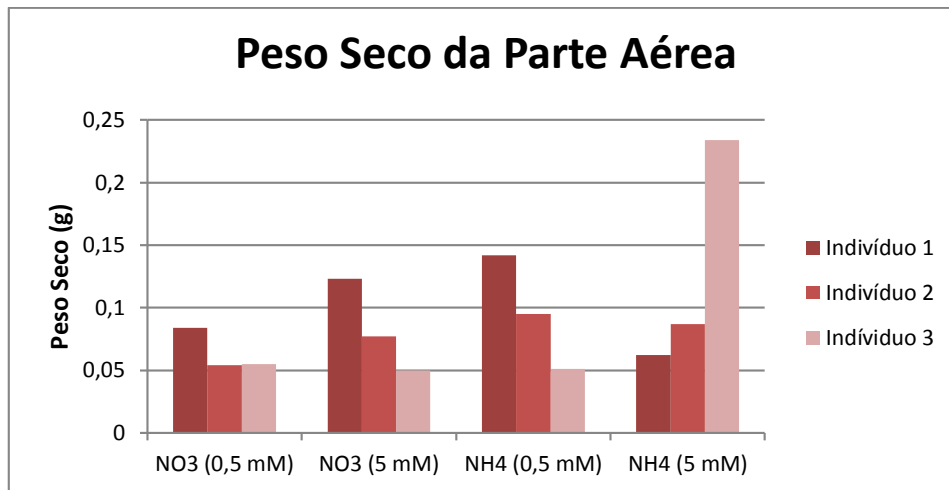


Figura 25 - Análise do peso seco da parte aérea das plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*, crescendo em diferentes concentrações de fertilizantes químico nitrogenado. O gráfico apresenta os dados dos comprimentos das raízes de cada três plantas testadas e inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* crescendo de 14 a 16 dias em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. No total os dados de 12 indivíduos foram analisados

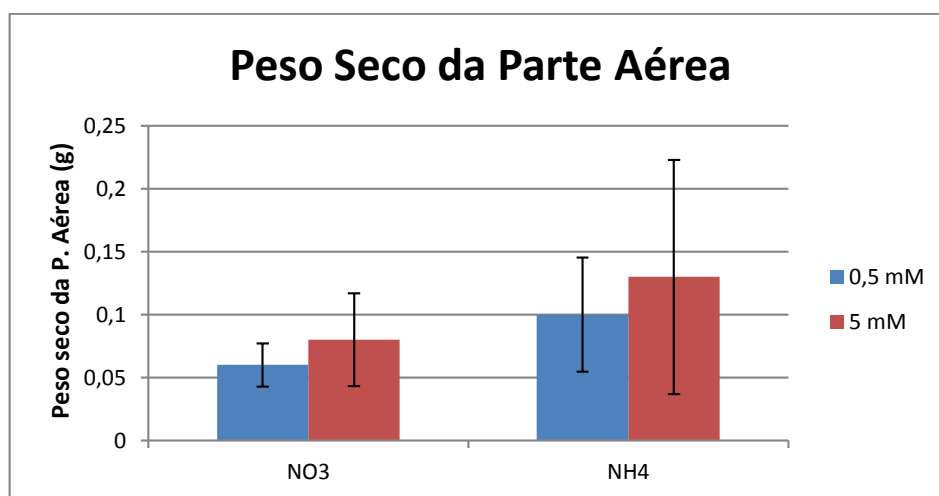


Figura 26 - Os valores representam a média em três indivíduos analisados por condição de tratamento e a barra indica o desvio padrão do peso seco da parte aérea

O método-padrão para se medir a produtividade biológica de uma cultura é através da análise do crescimento (MAGALHÃES, 1979). Segundo Moreira *et al.* (2010), as bactérias diazotróficas associativas podem contribuir para o crescimento vegetal não apenas pelo fornecimento de nitrogênio, mas também através de outros recursos como produção de fitormônios, oposição a fitopatógenos, solubilização de fosfatos, dentre outros.

As plântulas de cana-de-açúcar foram cultivadas por um mês na solução que favorece o enraizamento. Infelizmente nem todas as plântulas apresentaram crescimento e desenvolvimento das raízes na mesma proporção, sendo utilizadas no cultivo

hidropônico plântulas de cana-de-açúcar em diferentes estágios de desenvolvimento. O que possivelmente explica os resultados das análises fenotípicas das plântulas terem apresentados desvios padrões tão altos. Em relação à análise fenotípica não ter tido uma diferença significativa, sugere que o tempo (14 ou 16 dias) da inoculação da bactéria não foi o suficiente para que associação que tivesse resultados positivos e benéficos para a planta.

4.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO FERTILIZANTE QUÍMICO NITROGENADO NA TAXA DE COLONIZAÇÃO INTERNA DA BACTÉRIA ENDOFÍTICA

O meio LGI-P semissólido contém uma alta concentração de sacarose, sendo o meio ideal para isolar a bactéria endofítica *G. diazotrophicus*. Neste meio, alíquotas de diluições seriadas das amostras de raízes das plantas testadas são inoculadas e incubadas à temperatura de 30 °C. Após aproximadamente sete dias, ocorreu a formação de uma película característica do crescimento da bactéria endofítica microaerófila e fixação de N₂, juntamente com a mudança de cor de amarelo para laranja devido a acidificação do meio, sendo que o meio abaixo da película fica incolor, devido à assimilação do azul de bromotimol pelas bactérias (DÖBEREINER *et al.*, 1995), como observável na Fig. 27.



Figura 27 - Demonstração da colonização de *G. diazotrophicus* no meio semissólido LGI-P, formação de uma película (halo) característica do crescimento da bactéria microaerófila e fixação de N_2 , juntamente com a mudança de cor do meio devido a acidificação do meio, sendo que o meio abaixo da película fica incolor devido à assimilação do azul de bromotimol pelas bactérias

Após quatro dias da incubação foi possível observar que os frascos de plântulas controles continham a formação da película característica de fixação de N_2 por bactéria diazotrófica, como demonstra a Fig. 28. A partir de então iniciou-se alguns testes até descobrir que as plântulas iniciais estavam contaminadas. Para confirmar a contaminação utilizou-se uma alíquota do frasco controle contaminado e foi realizada a visualização em microscopia, sendo observados bactérias, fungos e protozoários, como demonstrado na Fig. 29.

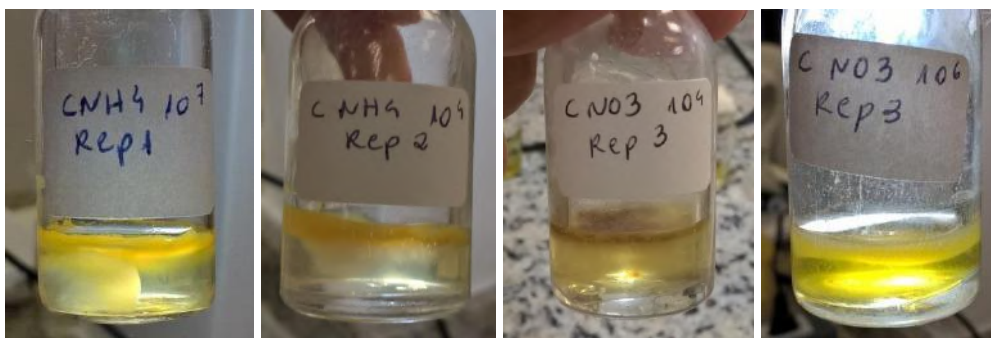


Figura 28 - Demonstração dos frascos de plantas controle contaminados, crescimento de bactérias algumas com caráter de bactéria fixadora de N_2 pela formação do halo (película) característica

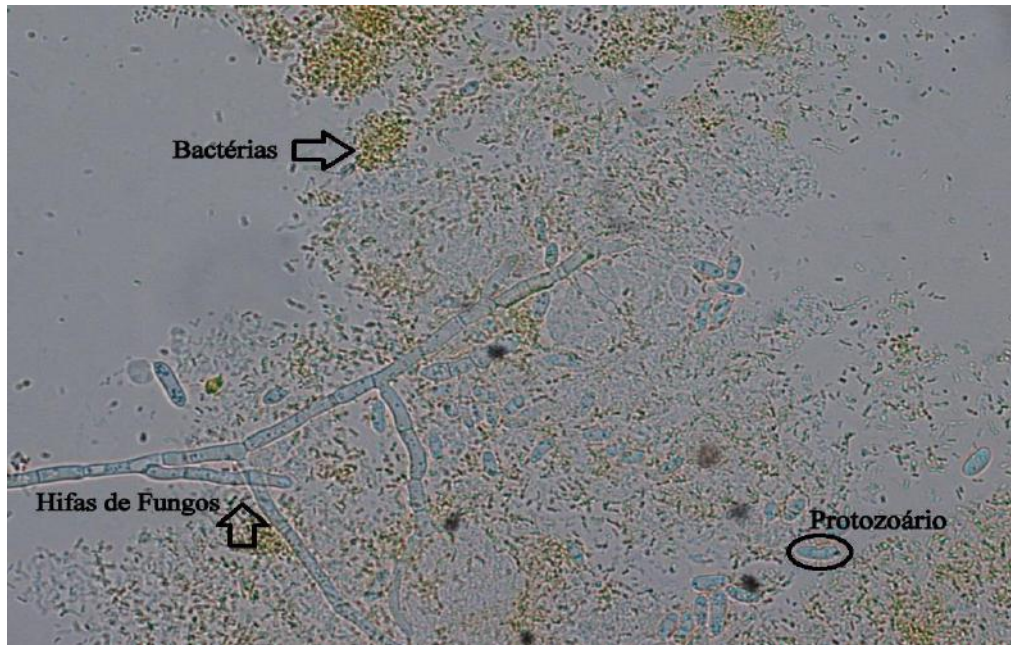


Figura 29 - Visualização por microscopia de fluorescência de campo claro, de uma alíquota dos frascos contendo as diluições das plântulas controle contaminadas. É possível observar as hifas de fungos, protozoários (paramécios) e muitas bactérias. A imagem foi feita 14 dias após iniciado o tratamento com diferentes concentrações e fontes de nitrogênio

A fim de tentar encontrar a causa, em que parte do experimento ocorreu à contaminação foi realizado um teste o qual utilizou as raízes de uma plântula da cultura *in vitro* mantida no meio que favorece o enraizamento (MSE) e repetiu todo procedimento como realizado com as demais plântulas no sistema hidropônico. Em seguida, verificou-se que nos frascos de diluição 10 havia contaminação, ficando evidente que a contaminação das plântulas ocorreu ainda na fase da cultura *in vitro*, antes das plântulas entrarem no sistema hidropônico.

Segundo Reis Júnior *et al.* (2000), a associação entre *G. diazotrophicus* e a cana-de-açúcar pode ser limitada severamente quando inoculado com altas doses de fertilizante nitrogenado. Isso pode interferir também no desenvolvimento fisiológico e na qualidade da colheita de cana-de-açúcar. Em seu estudo, culturas adubadas com 100 kg N ha⁻¹ obtiveram um percentual de isolados muito maior do que aqueles fertilizados com 300 kg N ha⁻¹. Rivera *et al.* (1991) também obteve resultados semelhantes em um experimento de campo que mostrava que altas concentrações do mineral N diminui a população de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar, e que as populações foram restabelecidos quando o teor de N do solo diminuiu.

Foram realizadas análises da média e desvio padrão de cada três plântulas testadas e inoculadas com *G. diazotrophicus* em cada condição de tratamento, utilizando

a ferramenta Excel da Microsoft Office. O propósito foi verificar o efeito do nitrogênio na taxa de colonização interna do cultivar pela bactéria endofítica *G. diazotrophicus* crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de diferentes fertilizantes nitrogenados (NO_3 e NH_4). Foi possível observar que associação entre a cana-de-açúcar cv. SP70-1143 com a bactéria endofítica *G. diazotrophicus* teve uma tendência de ocorrer melhor nas plântulas mantidas sob a concentração alta de N (5 mM) para a fonte NO_3 quando comparada com as plântulas mantida em baixa concentração (0,5 mM) de NO_3 . Entretanto, para as plântulas tratadas com NH_4 , foi possível observar uma tendência inversa. A associação se beneficiou na concentração baixa de N (0,5 mM) para a fonte de NH_4 quando comparado as plântulas crescidas em alta concentração de N (5 mM), como demonstrado nas Figs. 30 e 31.

O fato de ter ocorrido a contaminação das plântulas controle, indica que pode ter ocorrido também a contaminação nas plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* por outros tipos de bactérias diazotróficas. Isso dificultou a verificação de um resultado satisfatório como observado em estudos realizados anteriormente. Desta forma, para comprovar a hipótese seria necessário à repetição do experimento com os devidos cuidados para evitar a contaminação cruzada entre tratamentos.

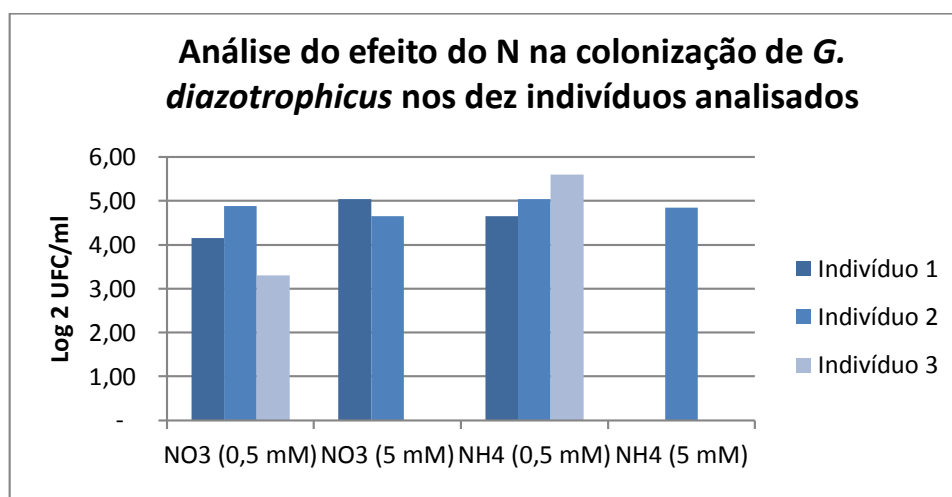


Figura 30 - Análise do efeito do nitrogênio na colonização de *G. diazotrophicus*, crescendo em baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) concentração de diferentes fertilizantes nitrogenados (NO_3 e NH_4). A colonização pelas bactérias foi quantificado pelo método do NMP. O gráfico apresenta os valores plotados numa escala de log₂, em plantas a 14 e 16 dias após a inoculação e crescendo a 33 e 35 dias respectivamente, em meios de cultivo contendo as concentrações indicadas de fertilizante nitrogenado. Os dados de dez indivíduos foram analisados

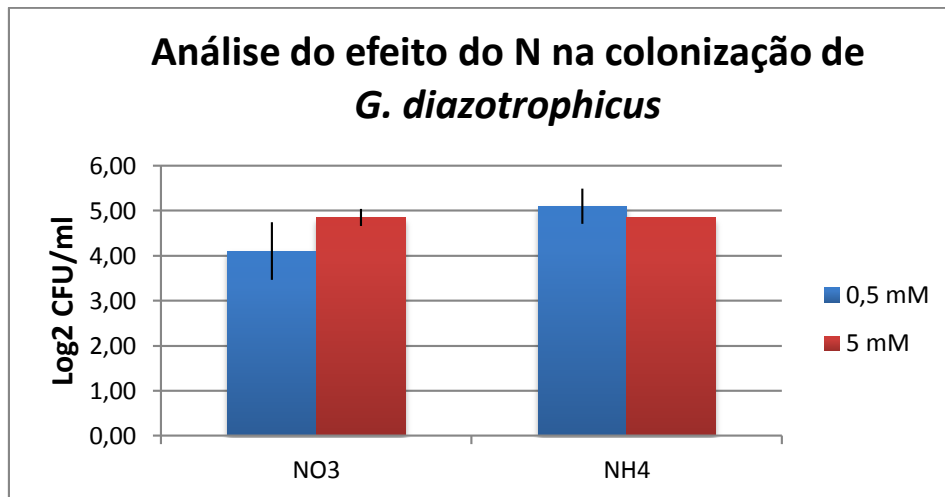


Figura 31 - Os valores representam a média em dez indivíduos analisados e a barra indica o desvio padrão da análise do efeito do nitrogênio na colonização de *G. diazotrophicus*

5. CONCLUSÕES

O processo de obtenção da cultura de tecido *in vitro* de cana-de-açúcar cv. SP70-1143 foi realizado com êxito. Foi possível obter as plântulas cultivadas em meio MS, MSM e MSE, como também foi satisfatório o aprendizado de diversas técnicas para cultura de meristemas, o trabalho técnico realizado de modo asséptico, contagem de bactérias pelo método NMP (através da tabela de MCCrandy), realização de meios de cultura e técnicas de microbiologia.

A inoculação de plântulas de cana-de-açúcar com a bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* cultivadas em quatro condições distintas de fertilizantes químicos nitrogenados: com alto (5 mM) e baixo (0,5 mM) nitrato (NO_3^-) e com alto (5 mM) e baixa (0,5 mM) ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$) foi realizada com êxito, como também foi satisfatório o aprendizado em microscopia de fluorescência e sistema hidropônico para a obtenção desse resultado.

Os resultados em relação à avaliação da contribuição da bactéria endofítica *G. diazotrophicus* para o desenvolvimento vegetal através das análises fenotípicas não foram satisfatórios, e os resultados não obtiveram diferença significativa.

Avaliação do efeito da concentração do fertilizante químico nitrogenado na taxa de colonização interna do cultivar pela bactéria endofítica também não foi satisfatório, e não houve a obtenção de um resultado significativo como outros estudos anteriores obtiveram.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIERO, A. **Desenvolvimento e avaliação de diferentes rotas de produção de etanol biocombustível a partir de resíduos de indústrias lácteas.** 2013. 47 p. Editora UFPR, Universidade Federal do Panamá, Panamá.

ALVES, A.; QUECINI, V.; VIEIRA, M. 1999. **Plant transformation: advances and perspectives.** Sei. Agric. 56 (1).

BODDEY, R. M., OLIVEIRA, O. C. de, URQUIAGA, S., REIS, V. M., OLIVARES, F. L. de, BALDANI, V. L. D., & DOBEREINER, J. 1995. **Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement.** Plant and Soil, 174 (1-2): 195–209.

BREDEMEIER, C. & MUNDSTOCK, C. 2000. **Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas.** Ciência Rural, Santa Maria, 30 (2): 365-372.

CARVALHO, T. L. G. de, FERREIRA, P. C. G., & HEMERLY, A. S. 2011. **Sugarcane Genetic Controls Involved in the Association with Beneficial Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria.** Tropical Plant Biology, 4 (1): 31-41.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A; de ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P. *et al.* 2011. **Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): A Reference Study for the Regulation of Genetically Modified Cultivars in Brazil.** Tropical Plant Biology, 4 (1): 62-89.

CRAWFORD, N. M. 1995. **Nitrate: nutrient and signal for plant growth.** The Plant Cell, Rockville, 7 (7): 859-868.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D. & BALDANI, J. I. 1995. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** Embrapa SPI. Itaguaí, Rio de Janeiro, 60 p.

GLICK, B. & THOMPSON, J. 1993. **Methods in plant molecular biology and biotechnology.** 1ª Ed. CRC Press, Inc. USA, 384 p.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. VAN; BERG, G.; PIRTTILA, A. M., COMPANT, S., CAMPISANO, A., SESSITSCH, A. 2015. **The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, 79 (3): 293-320.

HARTMANN, H.T.; KESTER, D.E.; DAVIS JUNIOR, F.T.; GENEVE, R.L. 2002. **Plant propagation: principles and practices.** 7ª Ed. New Jersey: Prentice Hall, 880 p.

HENRIQUES, A. B.; POIAN, A. T. da; CALLADO, C. H.; RIZZINI, C. M; REINERT, F.; CUNHA, M. da; VALENTIN, Y. Y. **Botânica I**. 2011b. V. 2, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 240p.

HENRIQUES, A. B.; RIZZINI, C. M; REINERT, F. **Botânica II**. 2010b. V. 3, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 222p.

HOAGLAND D. R., & ARNON, D. I. 1950. **The water-culture method for growing plants without soil**. Circ Calif Agric Exp Stn 347: 32.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2004. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 452p.

KIERS, E. T.; DUHAMEL, M.; BEESETTY, Y.; MENSAH, J. A.; FRANKEN, O.; VERBRUGGEN, E.; BUCKING, H. 2011. **Reciprocal Rewards Stabilize Cooperation in the Mycorrhizal Symbiosis**. Science, 333(6044): 880–882.

KIERS, E. T., ROUSSEAU, R. A., WEST, S. A., & DENISON, R. F. 2003. **Host sanctions and the legume–rhizobium mutualism**. Nature, 425(6953): 78–81.

MADIGAN, M. T.; MARTIKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 2016. 14ª Ed. Artmed. Porto Alegre, RS. 1006p.

MAGALHÃES, A. C. N. 1979. **Análise quantitativa do crescimento**. In: FERRI, M.G. Fisiologia Vegetal. EPU/EDUSP, São Paulo. 1: 331-350.

MAPA- Ministério da Agricultura. **Cana de açúcar**. Cultura de vegetais. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar> [Acessado em 13 de junho de 2016].

MOREIRA, F. M. de S.; da SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; de CARVAHO, F. 2010. **Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações**. Comunicata Scientiae 1(2): 74-99.

MURASHIGE T. & SKOOG F. 1962 **A revised medium for rapid growth and bioassays with tohaoco tissue cultures**. Physiol Plant 15: 473-497.

LEIGH, G. J.; FISHER, K.; NEWTON, W. E. LEIGH, G. J.; FISHER, K.; NEWTON, W. E. 2002. **Nitrogen Fixation at the Millenium**. Leigh Jeffery, 1-5.

REIS JÚNIOR, F. B. dos & REIS, V. 2000. **M. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.)**. Plant and Soil. 219: 153–159.

RIVERA, R.; VELAZCO, A.; TRETO, E. 1991. **La fertilizacion (^{15}N), nutricion nitrogenada y actividad de los microorganismos nitro fijadores en la caña de azucar, cepa de caña planta, cultivada sobre suelo ferralítico rojo.** Cultivos Tropicales, 12: 21-28.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. 2013. **Biological nitrogen fixation in non-legume plants.** Annals of Botany, 111: 743-767.

SHANER, N. C.; CAMPBELL, R. E.; STEINBACH, P. A.; GIEPMANS, B. N.; PALMER, A. E.; TSIEN, R. Y. 2004. **Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein.** Nat Biotechnol, 22:1567-72.

TAVARES, E. S.; REINERT, F.; VALENTIN, Y. Y. 2010. **O incrível poder dos seres clorofilados.** Volume único. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 244p.

VELTCHEVA, M.; SVETLEVA, D.; PETKOVA SP.; PERL, A. 2005. **In vitro regeneration and genetic transformation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)** Problems and progress. Scientia Horticulturae, 107: 2-10.

XIANG, C.; HAN, P.; OLIVER, D. 1999. **In solium selection for *Arabidopsis* transformants resistant to kanamycin.** Plant Mol. Biol. Rep. 17: 59-65.

WITSCHI, H. 2000. **Fritz Haber: December 9, 1868-January 29, 1934.** Toxicology, 149 (2000): 3-15.

7. APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela representa as características fenotípicas apresentadas pelas plântulas controle (sem inoculação de bactéria) e pelas plântulas inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus*. Após 12 a 16 dias do início do tratamento com diferentes concentrações e fontes de fertilizantes nitrogenados. A letra A indica alta concentração e a letra B indica baixa concentração.

Tratamento	Peso fresco raízes (g)	Peso fresco P. Aérea (g)	Peso Seco P. Aérea (g)	Comp. P. Aérea (cm)	Comp. Raízes (cm)
Cont NO3 B	0,056	1,7	0,115	30	6
Cont NO3 B	0,12	1,5	0,127	30	3
Cont NO3 B	0,049	1,0	0,056	26	4
Cont NO3 A	0,122	1,7	0,163	33	4
Cont NO3 A	0,097	0,7	0,057	34	4
Cont NO3 A	0,046	0,5	0,036	27	3,5
Cont NH4 B	0,045	0,7	0,067	35	6
Cont NH4 B	0,043	0,5	0,045	23	4
Cont NH4 B	0,036	0,5	0,028	30	3
Cont NH4 A	0,104	1,1	0,116	31	6
Cont NH4 A	0,114	0,7	0,070	36	2
Cont NH4 A	0,056	0,4	0,046	26	3
Gd NO3 B	0,046	1,0	0,084	36	5
Gd NO3 B	0,026	1,0	0,054	28	3
Gd NO3 B	0,047	1,1	0,055	26	4
Gd NO3 A	0,037	1,3	0,123	40	3,5
Gd NO3 A	0,052	0,9	0,077	36	8
Gd NO3 A	0,031	0,5	0,050	27,5	3
Gd NH4 B	0,086	1,0	0,142	47	3,5
Gd NH4 B	0,054	1,1	0,095	37	5
Gd NH4 B	0,014	0,8	0,051	23	2,5
Gd NH4 A	0,013	2,0	0,234	38	3
Gd NH4 A	0,109	0,9	0,087	35	8
Gd NH4 A	0,059	0,5	0,062	25	6

8. ANEXOS

ANEXO A - Tabela de McCrady utilizada para contagem de bactérias pelo método de número mais provável (NMP) descrito por Döbereiner *et al.* (1995).

Tabela 5. Tabela de McCrady para cálculo do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas em contagem com três e cinco frascos/diluição.

A - 3 tubos/diluição					
Diluição com crescimento	Número de diazotróficos	Diluição com crescimento	Número de diazotróficos	Diluição com crescimento	Número de diazotróficos
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,4	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		