**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Caracterização fisiológica e do perfil de expressão gênica do
transporte de nitrogênio em genótipos contrastantes para processo
de fixação biológica de N₂ de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**

Layanne Batista Souza

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2015**

Layanne Batista Souza
Bacharel em Ciências Biológicas

Caracterização fisiológica e do perfil de expressão gênica do transporte de nitrogênio em genótipos contrastantes para processo de fixação biológica de N₂ de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Orientador:
Prof. Dr. **ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA FIGUEIRA**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Souza, Layanne Batista

Caracterização fisiológica e do perfil de expressão gênica do transporte de nitrogênio em genótipos contrastantes para processo de fixação biológica de N_2 de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) . - - Piracicaba, 2015.

165 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Absorção de N 2. Transportadores de membrana 3. Interação planta microrganismo
4. Metagenoma 5. Novos métodos de sequenciamento I. Título

CDD 633.61
S729c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais

Luis Souza e Lucia Souza,

Por sempre me apoiarem e nunca medirem esforços para as minhas conquistas;

Ao meu irmão

Leonardo Souza,

Pelo amor, amizade e conselhos;

DEDICO

À Deus,

O bem mais precioso, o refúgio nas horas de desespero,

Que me concedeu saúde

Para lutar pelos meus objetivos;

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira pela orientação, pelos valiosos ensinamentos, pela oportunidade de poder trabalhar em sua equipe e pela amizade durante quase oito anos.

À Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' (ESALQ-USP) e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade de realização do meu doutorado.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) pela estrutura e pelo apoio.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa e suporte financeiro necessário para a realização deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida nos meses iniciais do curso.

Aos Profs. Drs. José Albertino Bendassolli e Paulo Trivellin pelo suporte na realização das análises no Laboratório de Isótopos Estáveis CENA-USP.

À Profa. Dra. Joana Falcão Salles pelo acolhimento no laboratório *Microbial Ecology (University of Groningen)* durante seis meses, pelos ensinamentos, excelentes contribuições e discussões, e pelos momentos agradáveis enquanto estive longe de casa.

Ao Dr. Heitor Cantarella pela disponibilidade do experimento de campo e ao Dr. Zaqueu Montezano pela ajuda com a coleta do experimento e demais esclarecimentos.

Ao Prof. Dr. Lee Tseng Sheng Gerald e ao Dr. Eduardo Bressan por cederem os inóculos e pelas contribuições durante a realização do projeto.

Aos técnicos do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP: Felipe Campana, Inês Possignolo, Paulo Cassieri, Raquel Orsi e Wlamir Godoy pela atenção e auxílio na execução deste trabalho, além da amizade.

Aos meus companheiros do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Aline Pedroso, Aline Peruchi, Bruna Factor, Daniela Bardella, Deborah Nishimura, Eduardo Bressan, Fernando Ferreira, Flávia Bento, Jamille Silva, João Nebó, Karina Brandão, Lucas Anjos, Raysa Gevartosky, Renato Ferreira, Roberto Camargo, Rodolfo Maniero e Thaís Barros pela ótima convivência, troca de experiências e

contribuições no trabalho. De maneira especial queria agradecer as minhas Gras: Danielle Scotton, Isabela Camargo, Juliana Leles e Thaísa Pinheiro, sem esquecer Juliana Deganello, pela amizade, carinho, paciência e ensinamentos durante esses muitos anos de convivência.

Ao grupo do nitrogênio: Alessandra Koltun, André Tagliaferro, Joni Lima, Luís Damasceno, Marielle Vitti e Melissa Alves meu muito obrigada, pela amizade, pelas risadas e choros, pela ajuda e pelos conhecimentos compartilhados.

À Gabriela Juliano, muito mais que uma estagiária, uma amiga e grande incentivadora. Obrigada por me aturar tanto tempo e fazer das nossas eternas tardes no fluxo um momento mais agradável. Esse trabalho também é seu!

Agradeço a minha família: minha mãe, Lucia, meu pai, Luis e meu irmão, Leonardo, pelo apoio, incentivo, confiança e amor em todos os momentos da minha vida. Vocês são os meus exemplos.

Aos meus avós, tios e primos, por todas as palavras carinhosas e incentivos durante esta caminhada. Em especial a titia Edineusa que nunca mediu esforços para me ajudar e acolher durante tantos anos.

À Pedro Montes pelo amor, incentivo, companheirismo e compreensão em todos os momentos até a conclusão deste trabalho. E também a sua família, que me acolheu tão bem, pelo carinho e por sempre me incentivar nessa caminhada.

Às minhas queridas amigas e companheiras nessa jornada de muitos anos na casa do Seu Heleno: Amanda Abdo, Elisa Matos, Fabiana Mingossi, Jéssica Nora, Juliana Araújo, Letícia Gervinski, Michele Pereira, Tatiane Beloni e Vívian Carvalho por estarem comigo em todos os momentos, pelo incentivo, ajuda, distração e por ser a minha família aqui.

Às amigas e amigos que o doutorado me proporcionou e tornaram meus dias mais felizes: Alice Cassetari, Ana Lo Buono, Bruna Gonçalves, Elcio Ferreira, Fábio Pértile, Gisele Nunes, Giselle Gomes, Glaucia Lacerda, João Luís, Ligia Leite, Luciano França, Matheus Vieira, Mylenne Pinheiro, Naiara Célide, Nara Gustinelli, Paulo Roger e Yuri Ramos.

Aos meus amigos da Bahia, BH e Alfenas que sempre se fizeram presentes, entenderam a minha ausência e me incentivaram nessa caminhada.

E a todos não citados que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese.

Agradeço de coração.

*“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez.”*

George Bernard Shaw

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Hipóteses	20
1.2 Objetivos	20
1.3 Revisão Bibliográfica	21
1.3.1 Fertilizantes nitrogenados e a cana-de-açúcar.....	21
1.3.2 Fixação Biológica de Nitrogênio e microrganismos associados à cana-de-açúcar	23
1.3.3 Sinalização da associação cana-de-açúcar x microrganismos	27
1.3.4 Transporte de nitrogênio	28
1.3.4.1 Transportadores de amônio	31
1.3.4.2 Transportadores de nitrato	33
Referências	35
2 COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA EM CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS <i>IN VITRO</i> E EM CONDIÇÕES DE CAMPO.....	47
Resumo	47
Abstract	47
2.1 Introdução	48
2.2 Material e Métodos	51
2.2.1 Ensaio de inoculação para análise da comunidade de bactérias <i>in vitro</i>	51
2.2.2 Ensaio de inoculação para análise da comunidade de bactérias endofíticas em campo	52
2.2.3 Extração de DNA.....	53
2.2.4 Descrição da comunidade bacteriana por sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA	54
2.2.5 Análise das sequências obtidas	54
2.2.6 Análise da estrutura da comunidade bacteriana em campo.....	55
2.2.6.1 Amplificação de gene 16S rRNA e <i>nifH</i> de bactérias	55
2.2.6.2 Análise por <i>Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis</i> (DGGE)	57
2.2.6.3 Análise Estatística	57

2.3 Resultados e Discussão	58
2.3.1 Composição da comunidade bacteriana com base no gene 16S rRNA em cana-de-açúcar cultivada <i>in vitro</i>	58
2.3.2 Estrutura e composição da comunidade bacteriana em cana-de-açúcar cultivada em campo com base em DGGE do gene 16S rRNA.....	66
2.3.2.1 Análise da estrutura da comunidade bacteriana em campo	66
2.3.2.2 Análise da composição da comunidade bacteriana em campo por sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA	69
2.4 Conclusões	78
Referências.....	79
3 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DO PROCESSO DE ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO NA INTERAÇÃO CANA-DE-AÇÚCAR x BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS	85
Resumo	85
Abstract.....	85
3.1 Introdução.....	86
3.2 Material e Métodos	88
3.2.1 Material vegetal e micropropagação	88
3.2.2 Cultivo de bactérias diazotróficas	89
3.2.3 Ensaio de inoculação <i>in vitro</i>	90
3.2.3.1 Experimento 1: Inoculação com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	90
3.2.3.2 Experimento 2: Inoculação com a combinação das bactérias <i>G. diazotrophicus</i> , <i>H. seropedicae</i> , <i>H. rubrisubalbicans</i> , <i>A. amazonense</i> e <i>B. tropica</i> ,.....	91
3.2.3.3 Experimento 3: Inoculação com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> para biomassa	92
3.2.4 Ensaio de cinética de absorção de N pela raiz de cultivares de cana-de-açúcar	92
3.2.5 Ensaio de N acumulado em cultivares de cana-de-açúcar	93
3.2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA	93
3.2.7 Identificação de genes das famílias <i>AMTs</i> (<i>AMMONIUM TRANSPORTERS</i>) e <i>NRTs</i> (<i>NITRATE TRANSPORTERS</i>)	95
3.2.8 Desenho de iniciadores para genes das famílias <i>AMTs</i> (<i>AMMONIUM TRANSPORTERS</i>) e <i>NRTs</i> (<i>NITRATE TRANSPORTERS</i>).....	95

3.2.9 Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR).....	96
3.3 Resultados e Discussão	97
3.3.1 Caracterização do transporte de amônio e nitrato pela raiz de cana-de-açúcar durante a associação com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	97
3.3.1.1 Expressão dos transportadores de nitrato nas raízes de cana-de-açúcar durante a associação com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	108
3.3.1.2 Expressão dos transportadores de amônio nas raízes de cana-de-açúcar durante a associação com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	117
3.3.2 Caracterização do transporte de amônio e nitrato pela raiz de cana-de-açúcar durante a associação com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> , <i>Azospirillum amazonense</i> e <i>Burkholderia tropica</i>	123
3.3.2.1 Expressão dos transportadores de nitrato nas raízes de cana-de-açúcar durante a associação com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> , <i>Azospirillum amazonense</i> e <i>Burkholderia tropica</i>	128
3.3.2.2 Expressão dos transportadores de amônio nas raízes de cana-de-açúcar durante a associação com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> , <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> , <i>Azospirillum amazonense</i> e <i>Burkholderia tropica</i>	132
3.3.3 Efeito da associação de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> por períodos longos no processo de aquisição de N em pela raiz de genótipos de cana-de-açúcar	135
3.3.3.1 Expressão dos transportadores de nitrato nas raízes de cana-de-açúcar durante a associação com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> por períodos longos	141
3.3.3.2 Expressão dos transportadores de amônio nas raízes de cana-de-açúcar durante a associação com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> por períodos longos	147
3.4 Conclusões.....	150
Referências	151
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	159
ANEXOS	163

RESUMO

Caracterização fisiológica e do perfil de expressão gênica do transporte de nitrogênio em genótipos contrastantes para processo de fixação biológica de N₂ de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

A cana-de-açúcar é uma cultura agrícola de grande importância econômica para o Brasil, e a expansão de seu cultivo para solos marginais requer uma maior utilização de fertilizantes à base de nitrogênio (N). Na maioria dos países produtores, a adubação nitrogenada se baseia em altas doses de aplicação, enquanto, no Brasil, o seu uso é relativamente baixo devido, em parte, ao processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) pela ação de bactérias diazotróficas. Além da FBN, as plantas adquirem fontes de N, como amônio e nitrato, por meio de transportadores de membranas localizados nas raízes. Há evidências que a associação com microrganismos pode favorecer as plantas por meio da regulação dos genes de transportadores de N. Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar o transporte de amônio e nitrato, avaliando a expressão gênica dos principais transportadores de N em cana-de-açúcar cultivada *in vitro* sob o efeito da associação com bactérias diazotróficas. Também foi descrita a comunidade bacteriana de plântulas *in vitro*, bem como o efeito da fertilização com N e da inoculação com bactérias diazotróficas em plantas maduras. Plântulas de 'SP70-1143' e 'Chunee', que contrastam para FBN, foram empregadas em ensaios *in vitro* sob diversas concentrações e fontes de N em associação ou não com uma estirpe de *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou uma mistura de bactérias diazotróficas (*G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*). A caracterização do transporte de N por meio de ensaios de absorção de nitrato e amônio marcados (¹⁵N) revelou que a interação entre cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus* induziu a expressão do gene do transportador de nitrato *ScNRT2.1*, o que levou a uma tendência no aumento no influxo de nitrato, assim como dos genes de transportadores de amônio *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3*, resultando em maiores influxos de amônio apenas para a cultivar 'SP70-1143'. Já a associação da cana-de-açúcar com a mistura de bactérias diazotróficas revelou que somente houve indução transcricional de *ScAMT1.1*, o que resultou na maior absorção de amônio em 'SP70-1143'. Por sua vez, quando analisada a interação *in vitro* por 30 dias, a presença da bactéria, apesar de transiente, possivelmente favoreceu a expressão dos genes de transportadores de nitrato *ScNRT1.1* e *ScNRT2.1*, e do transportador de amônio *ScAMT1.1*, resultando no maior acúmulo de ¹⁵N-nitrato de amônio nas plantas de 'SP70-1143'. Foi detectada uma comunidade bacteriana associada a plântulas micropropagadas, a qual é distinta entre os genótipos 'SP70-1143' e 'Chunee' e se altera com a inoculação com *G. diazotrophicus*. Para as plantas cultivadas em campo, a comunidade bacteriana existente foi alterada pela fertilização de N, mas não pela inoculação com diazotróficas. Portanto, a inoculação com bactérias diazotróficas parece induzir a expressão dos principais genes transportadores de amônio e nitrato em plântulas do genótipo 'SP70-1143' resultando na maior absorção de fontes inorgânicas de N.

Palavras-chave: Absorção de N; Transportadores de membrana; Interação planta-microrganismo; Metagenoma; Novos métodos de sequenciamento

ABSTRACT

Physiological characterization and gene expression profile of the transport of nitrogen in contrasting cultivars for biological nitrogen fixation of sugarcane (*Saccharum* spp.)

Sugarcane has a large economic importance to Brazil, and it's the expansion of cultivation to marginal soils requires a larger application of nitrogen fertilizers (N) to maintain yield. In most producing countries, N fertilization is based on high application rates, whereas in Brazil N fertilization is relatively low, possibly due in part, to the process of biological nitrogen fixation (BNF). In addition, plants acquire inorganic N sources from the soil by membrane transporters that may be regulated by association with microorganisms. This study aimed to characterize the ammonium and nitrate transport evaluating the gene expression profile of the major transporters grown *in vitro* in association with diazotrophic bacteria. It was also described the bacterial community in micropropagated plants, as well as the effect of N fertilization or inoculation with nitrogen fixing bacteria in mature plants. 'SP70-1143' and 'Chunee' which contrasted to BNF, were used in *in vitro* experiments in several concentrations and N source, in association or not with a strain of *Gluconacetobacter diazotrophicus* or a bacteria mixture (*G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* and *Burkholderia tropica*). The characterization of the N transport by uptake assays with ¹⁵N-labeled ammonium and nitrate, revealed that the interaction between sugarcane x *G. diazotrophicus* induced, the nitrate transporter gene *ScNRT2.1* expression, which lead to trend to increase nitrate influx, as well as the ammonium transporter genes *ScAMT1.1* and *ScAMT1.3*, resulting in higher ammonium influx in 'SP70-1143'. Sugarcane associated with the bacterial mixture revealed a transcriptional induction of *ScAMT1.1* resulting in larger ammonium acquisition in 'SP70-1143'. Further, the presence of bacteria *in vitro* for 30 days, although transient, possibly favored the expression of nitrate transporters *ScNRT1.1* and *ScNRT2.1*, and the ammonium transporter *ScAMT1.1*, resulting in accumulation of ¹⁵N-ammonium nitrate in 'SP70-1143'. A bacterial community associated with *in vitro* plants of 'SP70-1143' and 'Chunee' was detected with different composition between genotypes, and which changed with artificial inoculation. For plants grown in the field, the bacterial community was affected by N fertilization but not by inoculation with diazotrophic. These results indicate that the inoculation with diazotrophic bacteria appears to induce the expression of the major ammonium and nitrate transporters genes in 'SP70-1143' plants resulting in higher uptake of inorganic N sources.

Keywords: N uptake; Membrane transporter; Plant-microorganism interaction; Metagenome; New sequencing methods

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é o nutriente derivado do solo quantitativamente mais importante para a produção das culturas, sendo necessária a sua adição para obtenção de produtividades agrícolas satisfatórias. O advento da produção sintética de fertilizante nitrogenados no início do século XX aumentou significativamente a produção da agricultura (TILMAN et al., 2002). Porém, a fabricação de fertilizantes nitrogenados apresenta alto custo energético e o uso intensivo desse insumo implica em diversas consequências ambientais (ROCKSTROM, 2009). Estima-se que as perdas de N no sistema solo-planta sejam em torno de 50% e 70% (PEOPLES et al., 1995), resultando na contaminação de solos, corpos de água e de ecossistemas marinhos (TILMAN, 1999; SCHRÖDER et al., 2004; VITOUSEK et al., 2009; FOLEY et al., 2011); na contaminação da atmosfera pela emissão de gases causadores do efeito estufa, em especial o N_2O (TILMAN et al., 2001; GALLOWAY et al., 2008; BURNEY et al., 2010), e no constante aumento do N reativo em ecossistemas terrestres (AUSTIN et al., 2013; MARTINELLI; FILOSO, 2008). Consequentemente, há uma necessidade de melhorar a eficiência do uso de fertilizantes nitrogenados pelas plantas cultivadas, buscando diminuir as perdas de N e seus efeitos deletérios ao ambiente (TILMAN et al., 2002; ROCKSTROM, 2009; MUELLER et al., 2012).

A cana-de-açúcar é uma cultura agrícola de grande importância econômica para o Brasil, sendo utilizada para a produção de açúcar e etanol (GOLDEMBERG et al., 2004), oferecendo uma grande contribuição para a produção de biocombustíveis (SOMERVILLE et al., 2010). A expansão dessa cultura para solos marginais no Brasil requer uma maior utilização de fertilizantes à base de N para manter a produtividade. A maioria dos países produtores de cana-de-açúcar emprega altas doses de aplicação de fertilizantes nitrogenados, resultando num desequilíbrio entre as taxas de entrada e saída de N (ROBINSON et al., 2014). Por exemplo, na China até 512 Gg de N são aplicados no cultivo da cana-de-açúcar, enquanto apenas 75 Gg de N são removidos no momento da colheita. Baseado nesse cenário há uma extensa preocupação com os impactos ambientais causados pelas perdas de N para o ambiente (SEARCHINGER et al., 2008; VITOUSEK et al., 2009). Além disso, a resposta da cana-de-açúcar à aplicação de fertilizantes nitrogenados é baixa quando comparada a outras plantas cultivadas (ROBINSON et al., 2011). A recuperação do N aplicado varia entre 20 a 40% (MEYER et al., 2007; KINGSTON, ANINK, ALLEN.,

2008; FRANCO et al., 2011), com perdas de 50% do N total aplicado, decorrente da lixiviação e/ou volatilização (TRIVELIN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2007). Portanto, as grandes quantidades de N aplicadas ao solo trazem dúvidas quanto à sustentabilidade da produção de cana-de-açúcar para a aplicação em biocombustíveis, empregado na substituição dos combustíveis fósseis, e estão em desacordo com um sistema baseado na redução da emissão de carbono (ROBINSON et al., 2011).

Por outro lado, apesar da extensiva área de plantio de cana-de-açúcar no Brasil, o uso de fertilizantes nitrogenados pela cultura no país é relativamente baixo ($60\text{-}100\text{ kg ha}^{-1}$) quando comparado a outros grandes produtores, como China ($100\text{-}755\text{ kg ha}^{-1}$) e Índia ($150\text{-}400\text{ kg ha}^{-1}$) (ROBINSON et al., 2011). A baixa demanda de fertilização nitrogenada no cultivo de cana-de-açúcar no Brasil poderia se originar, em parte, do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), que poderia representar até 60% do N acumulado em cultivares mais responsíveis à FBN pela ação de bactérias diazotróficas (BALDANI et al., 2002).

O interesse pela FBN em cana-de-açúcar começou na década de 1950, com trabalhos pioneiros liderados pela Dra. Johanna Döbereiner, que isolou as bactérias fixadoras de nitrogênio *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica* da rizosfera da planta (DÖBEREINER; RUSCHEL 1958). A partir de então, outras diazotróficas foram isoladas e incluíam espécies de *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Derrxia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* (GRACIOLLI; RUSCHEL, 1981; RENNIE et al., 1982 CAVALCANTE; DÖBEREINER 1988; BALDANI et al., 1986, 1996). Com o objetivo de promover o crescimento vegetal e reduzir parcialmente ou totalmente a aplicação de fertilizantes nitrogenados, foi desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ) inoculante para cana-de-açúcar contendo as bactérias diazotróficas *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *Burkholderia tropica* (EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2015). Diversos estudos conduzidos sobre a inoculação de cana-de-açúcar com a mistura destas cinco estirpes específicas de bactérias diazotróficas demonstraram aumentos na matéria seca de colmos e raiz, produtividade de colmos e FBN (OLIVEIRA et al., 2002; CANUTO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2003, 2006; SCHULTZ et al., 2012).

Porém, há controvérsias se os incrementos de produtividade da cana inoculada derivam da FBN pelo fornecimento de N pelas bactérias diazotróficas ou

por algum outro fator benéfico indireto, como por exemplo, fatores promotores de crescimento. Não há evidências de que a FBN contribui com quantidades significativas de N em sistemas de cultivo de cana-de-açúcar na África do Sul, apesar de terem sido detectados endofíticos diazotróficos nos tecidos da cana-de-açúcar expressando genes que codificam a enzima nitrogenase (HOEFSLOOT et al., 2005). Da mesma forma, uma avaliação dos sistemas de produção de cana-de-açúcar na Austrália sugeriu que esta cultura não estaria obtendo a maioria do N necessário para o seu desenvolvimento via FBN (BIGGS et al., 2002). Diferentemente do encontrado nesses países, no Brasil, a quantificação da FBN em cana-de-açúcar já foi estimada em 30 a 60% do nitrogênio acumulado na planta (OLIVEIRA et al., 2006). No entanto, a FBN é ainda questionada e alguns trabalhos relataram que a menor demanda de N no Brasil derivaria da disponibilidade da matéria orgânica do solo (DOURADO-NETO et al., 2010; FRANCO et al., 2011).

A principal forma de aquisição de N inorgânico por plantas cultivadas consiste na absorção de fontes de N, como amônio e nitrato, pelo sistema radicular (MILLER et al., 2007; MARSCHNER, 2012). A família de genes responsável pela absorção de amônio é denominada *AMTs* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*) (GAZZARRINI et al., 1999), enquanto o nitrato é transportado principalmente pela ação dos produtos da família de genes chamada *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*) (CEREZO et al., 2001).

Há indicações do efeito da interação simbiótica de plantas com microrganismos tanto na regulação gênica dos transportadores de amônio quanto de nitrato. No tomateiro, quando em associação com as bactérias fixadoras de N_2 *Azospirillum brasilense* ou *Azoarcus* sp., houve um maior número de transcritos do transportador de amônio *LeAMT1.2* em relação a plantas não inoculadas ou inoculadas com outras espécies de diazotróficas, como *Azotobacter vinelandii* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BECKER et al., 2002). Plantas de *Arabidopsis thaliana* durante a associação com a rizobactéria *Phyllobacterium brassicacearum* apresentaram uma indução da expressão de membros da família de transportadores de nitrato *NRT2* (KECHID et al., 2013).

Entretanto, a forma como a interação de endofíticos com plantas hospedeiras pode afetar a absorção de N e as bases moleculares dessa interação ainda permanecem a ser elucidadas, particularmente no caso da cana-de-açúcar. A nossa principal hipótese seria que a interação de bactérias diazotróficas com cana-de-

açúcar poderia afetar favoravelmente a aquisição de formas inorgânicas de N pela regulação diferencial dos genes codificadores dos transportadores *AMT* e *NRT*. Considerando esse aspecto, o presente trabalho teve como objetivos averiguar a composição da comunidade bacteriana em cana-de-açúcar após a inoculação com bactérias diazotróficas sob o efeito da fertilização nitrogenada e em plântulas *in vitro*, e caracterizar fisiologicamente o processo de absorção de N e a regulação dos principais genes codificadores de transportadores de nitrato e amônio em genótipos contrastantes para fixação biológica de N (FBN) durante associação com bactérias diazotróficas.

1.1 Hipóteses

- Plântulas de cana-de-açúcar mantidas em condições *in vitro* não possuem ou possuem minimamente microrganismos endofíticos, e sua composição é alterada pela inoculação artificial;
- A inoculação da cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas permite a sua permanência durante todo o ciclo da cultura;
- A associação com bactérias diazotróficas exerce um efeito positivo na absorção de formas inorgânicas de nitrogênio em cana-de-açúcar, por meio da indução da expressão dos genes codificadores de transportadores de nitrato (*NRT*) e amônio (*AMT*).

1.2 Objetivos

- Analisar a composição da comunidade de bactérias em plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* e em condições de campo, inoculadas ou não com bactérias diazotróficas, por meio do sequenciamento massivo do gene 16S rRNA;
- Avaliar a cinética de absorção de ^{15}N e a fonte preferencial de N inorgânico em genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para FBN sob a associação ou não com bactérias diazotróficas;
- Caracterizar o perfil transcricional dos genes ortólogos da família de transportadores de amônio (*AMTs- AMMONIUM TRANSPORTERS*) e transportadores de nitrato (*NRTs- NITRATE TRANSPORTERS*) em genótipos

de cana-de-açúcar contrastantes para FBN em associação ou não com bactérias diazotróficas.

1.3 Revisão Bibliográfica

1.3.1 Fertilizantes nitrogenados e a cana-de-açúcar

O nitrogênio (N) é o nutriente derivado do solo quantitativamente mais importante (ROBINSON et al., 2014). A utilização dos fertilizantes nitrogenados, produzidos pelo processo 'Haber-Bosch', ocasionou o aumento expressivo da produtividade da agricultura moderna (GALLOWAY; COWLING, 2002; TILMAN et al., 2002). No entanto, a produção desses fertilizantes representa um alto custo financeiro e energético incorporando anualmente, junto com o cultivo de leguminosas, aproximadamente 120 milhões de toneladas de N_2 da atmosfera em formas reativas de N no solo, com diversas consequências ambientais (ROCKSTROM, 2009). Estima-se que as perdas de N no sistema solo-planta sejam em torno de 50% e 70% (PEOPLES et al., 1995), resultando na contaminação de corpos de água e de ecossistemas marinhos, devido principalmente à lixiviação de nitrato (TILMAN, 1999; SCHRÖDER et al., 2004; VITOUSEK et al., 2009; FOLEY et al., 2011); na contaminação da atmosfera pela emissão de gases causadores do efeito estufa, como o óxido nitroso (N_2O) (TILMAN et al., 2001; GALLOWAY et al., 2008; BURNEY et al., 2010), e no constante aumento do N reativo em ecossistemas terrestres (AUSTIN et al., 2000; MARTINELLI; FILOSO, 2008). Nesse cenário há, portanto, uma extensa preocupação em relação às perdas de nitrogênio (N), que podem causar efeitos deletérios ao ambiente, existindo, assim, a necessidade premente de melhorar a eficiência do uso de fertilizantes a base de N pelas plantas cultivadas (TILMAN et al., 2002; SEARCHINGER et al., 2008; ROCKSTROM, 2009; MUELLER et al., 2012).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é um matéria prima primordial para a produção de biocombustíveis no Brasil, por apresentar uma eficiente produção de biomassa, sendo cultivada para obtenção de colmos, os quais acumulam elevados níveis de sacarose, utilizados tanto para a produção de açúcar como de etanol (WHEALS et al., 1999; GOLDEMBERG et al., 2004). Com o objetivo de maximizar a produção dessa fonte de combustíveis renovável, a fertilização de nitrogênio (N) no

cultivo da cana-de-açúcar é uma prática comum, usada para atingir níveis satisfatórios de produtividade.

Apesar da extensa área de plantio de cana-de-açúcar, o uso de fertilizantes a base de N pela agricultura brasileira pode ser considerado baixo ($60\text{-}100\text{ kg ha}^{-1}$), quando comparado a países como Índia e China, que aplicam taxas de fertilizantes em torno de $400\text{ e }750\text{ kg ha}^{-1}$, respectivamente (ROBINSON et al., 2011). Porém, ainda assim podem ocorrer perdas na ordem de 50% do N total aplicado, decorrente da lixiviação e/ou volatilização (TRIVELIN et al., 2002), o que sugere uma baixa eficiência na absorção de N pela cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011). Com isso, as grandes quantidades de fertilizantes de N aplicadas no solo contrastam com a sustentabilidade proposta na produção dos biocombustíveis (MILER et al., 2010).

A relação entre N e o acúmulo de biomassa em plantas cultivadas é dependente da regulação de múltiplos processos fisiológicos. A absorção de N e a assimilação de carbono via fotossíntese são processos fundamentais para o acúmulo de biomassa (GASTAL; LEMAIRE, 2002). Plantas de cana-de-açúcar crescidas em condições de limitação de N possuem menor translocação de carbono (C) para a parte aérea, devido ao decréscimo na taxa de fotossíntese e consequente translocação de C para as raízes, aumentando a razão entre raiz e parte aérea e levando a perdas de produtividade (HARTT, 1970; van HEERDEN et al., 2010). Por outro lado, o excesso da fertilização de N no solo pode diminuir o acúmulo de sacarose nos colmos durante o desenvolvimento (RESENDE et al., 2006), possivelmente devido ao desvio de esqueletos de C para a via de assimilação de N (STITT et al., 2002).

A aplicação de fertilizantes nitrogenados em cana-de-açúcar ocorre na fase inicial de desenvolvimento da cultura, na qual ocorre a captura máxima de N, seguida de armazenamento e uso do N para produção de biomassa ao longo do ciclo da cultura. Experimentos de campos utilizando fertilizantes nitrogenados marcados (^{15}N) demonstraram que em 'cana-planta', apenas 40% do N total absorvido/metabolizado é derivado do fertilizante, enquanto que em 'cana-soca' pode-se chegar a 70% na fase de crescimento exponencial (FRANCO et al., 2011). Durante a fase de maturação, ocorre um decréscimo acentuado do N total em cana-de-açúcar, o que sugere que a absorção e transporte de N possuem papel fundamental, principalmente durante a fase de crescimento exponencial da cana-de-açúcar (FRANCO et al., 2011).

1.3.2 Fixação Biológica de Nitrogênio e microrganismos associados à cana-de-açúcar

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é uma das principais formas de entrada de N nos ecossistemas e é intermediada por vários microrganismos diazotróficos. Por definição, bactérias endofíticas ocupam tecidos internos das plantas sem causar danos aos seus hospedeiros (HALLMANN et al., 1997). Essas bactérias são em geral neutras ou benéficas às plantas e possuem a capacidade de colonizar as raízes e outros tecidos internos do vegetal, sem causar sintomas de doenças (REIS et al., 2006). Pode ser uma relação simbiótica, onde as bactérias se beneficiam por colonizarem um ambiente protegido contra vários estresses bióticos e abióticos (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998), e em contrapartida podem promover o crescimento da planta hospedeira por meio de diversos mecanismos (GOVINDARAJAN et al., 2006).

As bactérias endofíticas diazotróficas possuem um complexo enzimático denominado nitrogenase, responsável pela redução do nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia (NH_3), no processo conhecido como FBN. Além da FBN, essas bactérias podem também promover efeitos benéficos na planta sob várias formas, podendo ser denominadas bactérias promotoras de crescimento (*Plant Growth Promoting Bacteria* – PGPB), com efeitos potenciais diretos, como a produção de fitormônios (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003), solubilização de fósforo (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999) e aceleração dos processos de mineralização de nutrientes (PERSELLO-CARTINEAUX; NUSSAUME; ROBAGLIA, 2003), ou efeitos indiretos como o antagonismo a fitopatógenos (MUTHUKUMARASAMY; REVATHI; VADIVELU, 2000), entre outros. Essas bactérias colonizam espaços intercelulares nos tecidos de caules e raízes e podem ser encontradas também na rizosfera.

Em 1950, trabalhos liderados pela Dra. Johanna Döbereiner foram pioneiros na pesquisa da FBN em plantas de cana-de-açúcar, quando isolaram bactérias fixadoras de nitrogênio *Beijerinckia fluminensis* e *Beijerinckia indica* da rizosfera da planta (DÖBEREINER; RUSCHEL 1958). A partir de então, outras diazotróficas foram isoladas e incluíam espécies de *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* (GRACIOLLI; RUSCHEL, 1981; RENNIE et al., 1982 CAVALCANTE; DÖBEREINER 1988; BALDANI et al., 1986, 1996). Trabalhos clássicos para quantificar a contribuição desses

microrganismos associados à FBN em cana-de-açúcar, utilizando técnicas de diluição isotópica (^{15}N), revelaram que 40 a 60% do N da planta (genótipo 'CB47-89') foi derivado da FBN (LIMA; BODDEY; DÖBEREINER, 1987) enquanto que outros genótipos ('SP70-1143' e 'CB45-3') foram mais promissores, atingindo até 70% de contribuição devido a FBN (URQUIAGA et al., 1992).

A partir da descoberta das bactérias diazotróficas e sua potencial utilização para a FBN, foi desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ) um inoculante para cana-de-açúcar que tem por finalidade promover o crescimento vegetal com uma redução total ou parcial da aplicação de fertilizantes nitrogenados, pois as bactérias fixam nitrogênio do ar e disponibilizam o nutriente para a planta (EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2015). O produto é veiculado em sacos plásticos contendo turfa estéril e as seguintes estirpes de bactérias: *A. amazonense* estirpe BR 11115 (CBAmC), originalmente isolada a partir do caule da variedade de cana-de-açúcar 'CB45-3'; *G. diazotrophicus* estirpe BR 11281 (PAL5), isolada a partir das raízes da variedade comercial 'SP77-5181' (CAVALCANTE; DOEBEREINER 1988); *H. seropedicae* estirpe BR 11335 (HRC 54) e *H. rubrisubalbicans* estirpe BR 11504 (HCC 103), isoladas a partir das raízes da variedade 'SP70-1143' e colmos da variedade 'SP70-1284', respectivamente; e *Burkholderia tropica* estirpe BR 11366 (Ppe8), isolada a partir das gemas da variedade 'SP71-1406' (OLIVEIRA et al. 2009). Cada pacote de 250 g contém uma estirpe de bactéria, que precisa ser misturada a água e pode ser aplicado tanto na cana-planta quanto na cana-soca (EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2015). No Brasil, estudos conduzidos em cana-de-açúcar demonstraram efeito positivo da inoculação com a mistura destas cinco estirpes específicas de bactérias diazotróficas sob a matéria seca de colmos e raiz, produtividade de colmos e a FBN (OLIVEIRA et al., 2002, 2003, 2006; CANUTO et al., 2003; SCHULTZ et al., 2012). A análise da contribuição da FBN, utilizando a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , mostrou que a inoculação com a mistura das bactérias diazotróficas promoveu aumento de 30% do N total acumulado, sugerindo que o inoculante desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia pode ser uma estratégia para melhorar a FBN na cultura da cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002).

Porém, permanecem controvérsias se os incrementos de produtividade da cana-de-açúcar inoculada derivam da FBN pelo fornecimento de N pelas diazotróficas ou por algum outro fator benéfico, como por exemplo, fatores promotores de crescimento. Não há evidência de que a FBN contribui com

quantidades significativas de N em sistemas de cultivo de cana-de-açúcar na África do Sul, apesar de terem sido detectados endofíticos diazotróficos nos tecidos da planta, expressando genes que codificam a enzima nitrogenase (HOEFSLOOT et al., 2005). Da mesma forma, uma avaliação dos sistemas de cultivo de cana-de-açúcar na Austrália sugeriu que esta cultura não estaria obtendo a maioria do N necessário para o seu desenvolvimento via FBN (BIGGS et al., 2002). Por outro lado, no Brasil, a quantificação da FBN em cana-de-açúcar trouxe respostas positivas, com contribuições médias entre 30 e 60% do nitrogênio acumulado na planta (OLIVEIRA et al., 2006). No entanto, a FBN é ainda questionada e alguns trabalhos relataram que grande parte do N na cultura de cana-de-açúcar não é derivada da fertilização nitrogenada e sim, derivada do N estocado na matéria orgânica do solo (DOURADO-NETO et al., 2010; FRANCO et al., 2011).

O conhecimento da comunidade bacteriana associada a culturas agrícolas é um passo importante para a compreensão de como os microrganismos influenciam a produtividade das culturas, e os novos métodos de sequenciamento tem permitido a ampliação do conhecimento sobre o microbioma de diversas condições biológicas. A maioria das bactérias endofíticas isoladas de colmos e folhas da cana-de-açúcar, determinadas por sequenciamento do gene 16S rRNA, e dependentes de cultivo em meio, pertencem às famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae (MAGNANI et al., 2010, 2013). As bactérias diazotróficas perfazem apenas 10% dos isolados que apresentam atividade da nitrogenase, não tendo sido detectadas pelo sequenciamento do 16S rRNA diazotróficas endofíticas, como *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp. e *Azospirillum* spp., normalmente associadas a cana-de-açúcar. Esta discrepância pode ser devido ao uso de meio de cultura livre de nitrogênio para o isolamento de bactérias, às variações geográficas e ambientais ou uma combinação destes fatores (MAGNANI et al., 2010). Em outro estudo, bactérias endofíticas foram isoladas de várias cultivares utilizando o mesmo meio de cultura, e a prevalência de bactérias diazotróficas variaram de 0,02 a 3,86% do total da comunidade bacteriana, dependendo da cultivar (SUMAN et al., 2001).

A avaliação da comunidade bacteriana da rizosfera de cana-de-açúcar sob condições distintas de fertilização com nitrogênio (sem adubação ou 120 kg ha⁻¹ de N) em dois momentos, revelou pouca diferença para níveis taxonômicos mais altos entre os níveis de N aplicado, sendo o filo Proteobacteria (29,6%) predominante em todas as amostras, seguido por Acidobacteria (23,4%), Bacteroidetes (12,1%),

Firmicutes (10,2%) e Actinobacteria (5,6%). A exceção foi o filo Verrucomicrobia, cuja prevalência em solos fertilizados com nitrogênio foi de aproximadamente 0,7% em comparação ao 5,2% em solo não-fertilizado, sugerindo que a maior presença deste grupo poderia ser um indicador de menor disponibilidade de nitrogênio nos solos. (PISA et al., 2011). Quando analisado em níveis taxonômicos mais baixos, foi encontrada uma maior diversidade associada às plantas que receberam adubação nitrogenada, com predominância do gênero *Bacillus*, e foram encontrados também gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio e/ou promotoras do crescimento, como *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Burkholderia* (PISA et al., 2011).

Um menor número de diazotróficas cultiváveis foi encontrado em tecidos de cana-de-açúcar quando plantas foram fertilizadas com alta concentração de N (FUENTES-RAMIREZ et al., 1999; MUTHUKUMARASAMY et al., 2002; MEDEIROS et al., 2006). Suman et al. (2008) estudaram o estabelecimento da população de diazotróficas em cana-de-açúcar submetida a níveis crescentes de nitrogênio e encontraram que a população de *G. diazotrophicus* foi maior com a fertilização de 75 kg ha⁻¹ (N₇₅), comparada ao solo não fertilizado (N₀) e ao solo fertilizado com 150 kg ha⁻¹ (N₁₅₀), enquanto que a população de *Herbaspirillum* aumentou de N₀ ao N₁₅₀. No entanto, ainda permanece por ser elucidado se em condições suficientes de N e/ou alto N, plantas de cana-de-açúcar utilizam preferencialmente o processo de absorção de N pelas raízes a despeito do processo de FBN, e quais são as implicações do status de N na planta alterando a sinalização da absorção de N dependente da sinalização planta x endofíticos.

Recentemente, Yeoh e colaboradores (2015) investigaram o efeito da aplicação de fertilizantes nitrogenados na comunidade bacteriana, baseado no perfil do gene 16s rRNA no solo e em raízes de cana-de-açúcar submetidas à baixa (40 kg N ha⁻¹) e alta fertilização de N (160-180 kg N ha⁻¹), e ainda, avaliaram se a população das bactérias diazotróficas associadas à raiz seria maior em resposta a entradas reduzidas de N (40 kg N ha⁻¹). A menor dose (40 kg N ha⁻¹) de aplicação de fertilizantes nitrogenados apresentou pouco efeito sobre a comunidade bacteriana, e não aumentou a abundância relativa das bactérias diazotróficas (YEOH et al., 2015). Além disso, sob baixa fertilização de N, cultivares de cana-de-açúcar da Austrália apresentaram menor produção de biomassa e teor de nitrogênio, o que reflete a falta da contribuição da FBN, indicando que a manipulação das taxas de adubação

nitrogenada não melhora a produtividade da cana-de-açúcar pelo aumento das populações destas bactérias naquelas condições. A utilização de recomendação de fertilizantes nitrogenados aumentou a produção de biomassa e teor de nitrogênio, e os solos correspondentes tiveram maior abundância de genes de nitrificação e desnitrificação (YEOH et al., 2015).

Além disso, alguns dos questionamentos sobre as bactérias diazotróficas é a permanência ou a competição dessas bactérias inoculadas frente aos endofíticos encontrados naturalmente em cana-de-açúcar. A variedade de cana-de-açúcar 'RB867515' foi inoculada no plantio com a mistura de bactérias diazotróficas (*A. amazonense*; *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *B. tropica*), sendo a inoculação repetida a cada ano após a colheita. Um acompanhamento da comunidade diazotrófica, por meio de transcritos de 16S rRNA e *nifH*, revelou que apenas transcritos de *G. diazotrophicus* e *B. tropica* foram detectados seis meses após a última inoculação, o que pode ser interpretado como que os inoculantes são apenas uma parte muito pequena da comunidade bacteriana no momento da amostragem (FISCHER et al., 2011), e podem apresentar diferenças quanto a capacidade competitiva. As outras bactérias inoculadas podem ter colonizado as plantas apenas transitoriamente, mas não foram capazes de manter um nível persistente de colonização, porque teriam sido superadas pelas demais (FISCHER et al., 2011).

1.3.3 Sinalização da associação cana-de-açúcar x microrganismos

Houve progresso na identificação das bases moleculares da associação planta x microrganismos, possibilitando o entendimento das vias de sinalização e dos processos fisiológicos desencadeados nesta interação. A análise de sequências expressas (*ESTs*, *expressed sequence tags*) a partir de bibliotecas de cDNA de vários tecidos e órgãos de cana inoculados com bactérias fixadoras de N, *G. diazotrophicus* e *H. rubrisubalbicans*, e ainda, estudos de proteômica, têm possibilitado a identificação de genes e peptídeos essenciais no processo de sinalização para FBN (CAVALCANTE et al., 2007; dos SANTOS et al., 2009). Por meio de análise semi-quantitativa de transcritos amplificados, o receptor de etileno *ScER1* (*ETHYLENE RECEPTOR1*), assim como os dois fatores de transcrição *ScERF1* e *ScERF2* (*ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR*) apresentaram níveis

distintos de expressão na cultivar 'SP70-1143', mais eficiente para FBN quando comparada a outras cultivares. Enquanto os genes *ScERF2* e *ScER1* são mais expressos em 'SP70-1143', o gene *ScERF1* é regulado negativamente nesse genótipo, quando inoculado com bactérias diazotróficas (CAVALCANTE et al., 2007), indicando o envolvimento da sinalização por etileno no processo de fixação de N em cana-de-açúcar. Genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para fixação biológica de N apresentam padrão de repressão distintos dos transcritos do gene do receptor do tipo quinase *SHR5* (VINAGRE et al., 2006). O genótipo com maior capacidade de FBN, 'SP70-1143' (URQUIAGA et al., 1992) demonstrou uma maior repressão de *SHR5* em comparação ao genótipo com baixa resposta a FBN ('Chunee') quando inoculados com *G. diazotrophicus* (VINAGRE et al., 2006), sugerindo que o receptor do tipo quinase *SHR5* possivelmente está envolvido no reconhecimento de bactérias endofíticas ou pode ser um componente abaixo na cascata de sinalização para associação planta-endofíticos (VINAGRE et al., 2006).

A inoculação de cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas e outras bactérias benéficas tem sido estudada (GOVINDARAJAN et al., 2006). Porém ainda permanece por ser elucidada se a aquisição de N da FBN pode ser derivada de endofíticos ou a partir de bactérias da rizosfera. Atualmente, a FBN não é um foco nos países produtores porque os fertilizantes sintéticos podem ser usados para aumentar a produção das culturas, embora os efeitos deletérios ao ambiente tenham sido observados (ROBINSON et al., 2014). O advento da metagenômica e metatranscriptômica para a caracterização de comunidades bacterianas (HUGENHOLTZ; TYSON 2008), combinado com o conhecimento dos processos biológicos do solo, podem ajudar no avanço sobre os estudos da FBN em cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2014).

1.3.4 Transporte de nitrogênio

As plantas utilizam o sistema radicular para adquirir fontes orgânicas e inorgânicas de N no solo, como amônio e nitrato (MILLER et al., 2007; MARSCHNER, 2012). Fertilizantes nitrogenados são aplicados na forma de uréia, nitrato de amônio ou sulfato de amônio, geralmente com uma única aplicação no início do ciclo da cana-de-açúcar. A uréia é rapidamente convertida em amônio ou em nitrato (WOOD et al., 2010), enquanto o amônio sofre o processo de nitrificação.

A nitrificação é a via dominante para o fluxo de N, e ocorre por meio da atividade microbiana no solo, na qual o amônio é convertido em nitrato (NO_3^-) pelas bactérias *Nitrosomonas* sp. e *Nitrobacter* spp. (SUBBARAO et al., 2012) (Figura 1), se tornando assim a forma de N mais abundante na maioria dos solos cultivados (MILLER et al., 2007). O nitrato absorvido é transportado para a parte aérea, onde é reduzido no citoplasma a nitrito pela Nitrato Redutase (NR), sendo depois reduzido nos plastídeos a amônio pela Nitrito Redutase (NiR) e pela Glutamina Sintetase (GS) (Figura 1) (LAM et al., 1996). O amônio derivado da redução do nitrato, ou resultante diretamente da absorção, é assimilado em aminoácidos via ciclo GS/GOGAT (Glutamina-2-oxoglutarato Aminotransferase) (Figura 1) (LAM et al., 1996).

Figura 1 - Rotas esquemáticas de absorção de N da rizosfera, incluindo a fonte de fertilizante nitrogenado a ser adquirido, principalmente na forma de amônio e nitrato pelas raízes, transporte e assimilação, e remobilização no interior da planta. Abreviações: AMT, transportadores de amônio; AS, asparagina sintetase; Asn, asparagina; Asp, aspartato; GDH, glutamato desidrogenase; Gln, glutamina; Glu, glutamato; GOGAT, glutamato sintase; GS, glutamina sintetase; NiR, nitrito redutase; NR, nitrato redutase; NRT, transportadores de nitrato (XU et al., 2012)

O transporte através de membranas dessas formas de N (amônio e nitrato) em plantas ocorre por meio de transportadores de membrana. Os transportadores responsáveis pela aquisição de N do solo são classificados quanto a sua afinidade pelo substrato, sendo que os transportadores de alta afinidade (*High Affinity Transporter System* ou *HATS*) são responsáveis pela aquisição de N em concentrações menores que 1 mM, enquanto que os transportadores de baixa afinidade (*Low Affinity Transporter System* ou *LATS*) realizam o transporte de forma não saturável para crescentes concentrações de N acima de 1 mM presentes no solo (GLASS et al., 2002).

1.3.4.1 Transportadores de amônio

O amônio, que é a fonte preferencial de N para a maioria das plantas cultivadas, é transportado pela família de genes denominada *AMTs* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*), a qual adquire este nutriente quando presente em baixas concentrações (GAZZARRINI et al., 1999). Foram identificadas famílias gênicas de *AMTs* em genomas de plantas, como *Arabidopsis thaliana* (seis membros de genes *AMTs*), soja *Glycine max* (16 *AMTs*), *Medicago truncatula* (seis *AMTs*), arroz - *Oryza sativa* (12 *AMTs*), tomate - *Solanum lycopersicum* (4 *AMTs*) (LOQUÉ; von WIRÉN, 2004; RUFFEL et al., 2008; KOBAYASHI et al., 2010), e alguns membros foram identificados em *Lotus japonicus* (ROGATO et al., 2008), sorgo - *Sorghum bicolor* (KOEGL et al., 2013) e milho - *Zea mays* (GU et al., 2013). Com base em *ESTs* presentes em bancos de dados de sequências expressas de cana-de-açúcar conjuntamente com dados de RNA-seq, foram identificados homólogos aos seis genes *AMTs* de *arabidopsis* em cana-de-açúcar, de acordo com o Dr. Joni Esrom Lima (dados não publicados).

A aquisição/absorção de amônio via *AMTs* ocorre de forma aditiva, sendo que as diversas proteínas transportadoras apresentam afinidades distintas pelo substrato (YUAN et al., 2007). Estudos de absorção de ^{15}N -amônio em mutantes duplos de *arabidopsis* demonstraram que os transportadores *AMT1.1* e *AMT1.3* apresentam maior capacidade para absorção de amônio, sendo responsáveis por 70% do amônio total absorvido, enquanto que, o transportador *AMT1.2* confere cerca de 25% da absorção dessa forma de N pelas raízes (LOQUÉ et al., 2006; YUAN et al., 2007). Outro transportador, o *AMT1.5*, que possui baixa capacidade para transporte com K_m de 4,5 μM , também promove a entrada de amônio em células radiculares (YUAN et al., 2007).

Para atender a demanda de N da planta, as distintas *AMTs* são reguladas de acordo com o *status* de N na planta. Sob condição de deficiência de N, os genes codificando os transportadores *AMTs* são mais expressos na raiz, porém essa resposta é temporal (LOQUÉ et al., 2006). Por exemplo, plantas de *arabidopsis* cultivadas em condições de baixo N apresentam indução da expressão de *AMT1.1* e *AMT1.3* em poucas horas. Por outro lado, *AMT1.2* e *AMT2.1* apresentam aumento nos níveis de transcritos após um período maior de deficiência de N (GAZZARRINI et al., 1999; SOHLENKAMP et al., 2002; LOQUÉ et al., 2006). Em condições de

suficiência de N, diferentes respostas à aplicação externa de N foram observadas e tais respostas variam de acordo com a espécie vegetal estudada. Homólogos de *AMTs* em tomate (*LeAMT1.2*) e arroz (*OsAMT1.1* e *OsAMT1.2*) são induzidos pela aplicação externa de amônio, enquanto que os transportadores *AMT1.1* e *AMT1.3* de *arabidopsis* têm seus transcritos reduzidos drasticamente (LOQUÉ; von WIRÉN, 2004). Portanto, diferenças na via de sinalização desses transportadores indicam variações entre espécies para a forma de coordenar as flutuações na concentração de N no ambiente.

Há indicações do efeito da interação das plantas com microrganismos na regulação dos transportadores de N. Em soja (*Glycine max*), o transportador de amônio *GmAMT4.1* responde em termos de transcrição localmente a presença da micorriza arbuscular (MA), indicando o transporte direto de amônio em arbúsculos induzidos por micorrizas (KOBAE et al., 2010). Os transportadores de alta afinidade da família gênica *AMT* de *Lotus japonicus* são regulados transcricionalmente por micorrizas. Amônio secretado pelas micorrizas se liga a proteína *LjAMT2.2*, localizada em células arbusculares da raiz, facilitando assim o influxo de amônio no citosol da célula (GUETHER et al., 2009).

Plantas não leguminosas, como tomateiro, quando em associação com as bactérias fixadoras de N₂ *Azospirillum brasilense* ou *Azoarcus* sp. apresentam maior número de transcritos do transportador *LeAMT1.2* em relação a plantas não inoculadas, ou inoculadas com outras espécies de diazotróficas, como *Azotobacter vinelandii* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BECKER et al., 2002). Na interação com tomateiro, *Azospirillum brasilense* pode excretar amônio, o que representaria um sinal regulatório para expressão gênica de *LeAMT1.2*. No entanto, essa resposta parece ser regulada diretamente pelo *status* de N no local da colonização, sendo que a indução na expressão desse transportador também ocorre pela aplicação tópica de amônio (BECKER et al., 2002). Ainda permanece por ser elucidado se *A. brasilense* tem a habilidade de excretar amônio.

Em *arabidopsis*, o gene da subfamília *AMT2* foi ligeiramente regulado negativamente em plantas inoculadas com *Phyllobacterium* sp.. Uma possível explicação para a alteração na regulação de genes de transportadores de nitrogênio na associação *arabidopsis* x *Phyllobacterium* sp. sugere que as bactérias podem fornecer outra fonte de N para a planta, e esta fonte poderia interferir nos processos de regulação de demanda N (MANTELIN et al., 2006). Portanto, o efeito de bactérias

diazotróficas na interação com diversas plantas não está bem estabelecido e estudos são necessários para entender se as diazotróficas auxiliam a entrada de N pelas proteínas transportadoras.

1.3.4.2 Transportadores de nitrato

O nitrato é a fonte de N inorgânico mais abundante na maioria dos solos cultivados, sendo transportado para dentro das células radiculares principalmente pela ação dos produtos da família de genes chamada *NRT* (*NITRATE TRANSPORTERS*) (CEREZO et al., 2001). No genoma de arroz, foi predita a existência de uma família gênica com cerca de 80 membros, enquanto que em arabidopsis, há 53 membros da subfamília *NRT1* (TSAY et al., 2007). Dentre os 53 membros da subfamília *NRT1* identificados em arabidopsis, nove proteínas *NRT1* já foram funcionalmente caracterizadas como transportadores de nitrato (GOJON et al., 2009). Para o transporte de alta afinidade, foram identificados sete membros da subfamília *NRT2* em arabidopsis e quatro membros em arroz, milho e sorgo (PLETT et al., 2010; FENG et al., 2011; GARNETT et al., 2013). Em cana-de-açúcar, foram identificados 45 membros da subfamília *NRT1* e seis membros da subfamília *NRT2*, segundo Dr. Joni Esrom Lima (comunicação pessoal).

O principal transportador de nitrato é o *NRT1.1*, que possui dupla afinidade para o substrato, apresentado alta afinidade (μM) ou baixa afinidade (mM) dependendo do estado de fosforilação da proteína (LIU; TSAY, 2003). Esse transportador foi caracterizado como sendo o sensor para o status de nitrato na raiz. Estudos em mutantes *nrt1.1* de arabidopsis demonstraram que a proteína quinase CIPK23 regula *NRT1.1* para o transporte de nitrato em baixa ou alta afinidade por meio de fosforilação do resíduo T101 (HO et al., 2009). Além disso, *NRT1.1* é capaz de regular a expressão do transportador de alta afinidade *NRT2.1* (MUÑOS et al., 2004). Quando o nitrato está disponível em baixas concentrações no solo, a transcrição do transportador de alta afinidade *NRT2.1* tem sua expressão aumentada, resultando numa maior absorção dessa forma inorgânica de N (CEREZO et al., 2001). A localização na membrana plasmática e a estabilidade do transportador *NRT2.1* é dependente da proteína transmembrana NAR2 (WIRTH et al., 2007), sendo um indício do nível de regulação pós-transcricional para esse transportador.

Recentemente, *AtNRT2.5* foi identificado como sendo um importante transportador de nitrato em raízes e folhas de *Arabidopsis* (LEZHNEVA et al., 2014). Em condições de longo períodos de deficiência de N, *AtNRT2.5* é expresso em células da epiderme e pelos radiculares realizando o transporte constitutivo de tipo HATS. Na parte aérea, esse transportador é expresso no sistema vascular, sendo responsável pelo transporte de nitrato armazenado nos vacúolos das células da bainha do feixe e do mesófilo foliar de plantas de *Arabidopsis* (KOTUR; GLASS, 2014; LEZHNEVA et al., 2014). Em *Arabidopsis* e milho, *AtNRT2.5* é restritamente regulado em condições limitantes de N em raízes. (KOTUR; GLASS, 2014; LEZHNEVA et al., 2014).

Evidências vêm se acumulando que transportadores de nitrato possivelmente também obedecem a sinais dependentes da interação planta-microrganismos. Plantas de tomate, quando inoculadas com micorrizas arbusculares, apresentaram alta expressão do gene codificador do transportador de nitrato *LeNRT2.3* (HILDEBRANDT et al., 2002). Esse fenômeno foi acompanhado pelo aumento dos transcritos da nitrato redutase (*NIA*) do fungo, o que sugere que o excesso de nitrato do metabolismo do microrganismo é absorvido pela planta (HILDEBRANDT et al., 2002).

Em *A. thaliana* foram identificados dois genes transportadores de NO_3^- da família *NRT2* (*NRT2.5* e *NRT2.6*) como sendo fortemente regulados em resposta à inoculação com estirpe STM196 de *Phyllobacterium brassicacearum*. Ambos os genes são necessários para a promoção do crescimento de plantas induzido por *P. brassicacearum* STM196, identificando assim, dois novos genes que codificam produtos benéficos em interações bióticas (MANTELIN et al., 2006; KECHID et al., 2013). Por outro lado, a inoculação de *Arabidopsis* com *Phyllobacterium* sp. diminuiu o acúmulo de transcritos dos genes *AtNRT1.1* e *AtNRT2.1*. Embora modestas, estas reduções aparentam possuir importância biológica, uma vez os transcritos de *AtNRT1.1* e *AtNRT2.1* representam cerca de 15% e 80% de transcritos totais da família *NRT* em raízes, respectivamente (MANTELIN et al., 2006).

Apesar da importância da relação de absorção de N com a presença de microrganismos fixadores de N durante o desenvolvimento das plantas, informações sobre a absorção de N e a regulação dos transportadores de amônio e nitrato em cana-de-açúcar permanecem escassas. Em experimentos realizados em condições controladas, plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus*

apresentaram maior absorção de N (BODDEY et al., 2001; SUMAN et al., 2008), o que sugere que o transporte de N pode ser regulado pela associação de bactérias fixadoras de N em cana-de-açúcar. Outra evidência vem da análise de mais de 260.000 sequências expressas (*ESTs, expressed sequence tags*) a partir de bibliotecas de cDNA de vários tecidos e órgãos em diferentes estádios de desenvolvimento presente no banco SUCEST- *Sugarcane EST Project* (VETTORE et al., 2003). A análises de bibliotecas de cDNA identificaram transportadores de nitrato sendo expressos apenas em tecidos de cana-de-açúcar inoculados com *H. rubrisubalbicans* (NOGUEIRA et al., 2001).

Referências

- AUSTIN, A.T.; BUSTAMANTE, M.C.; NARDOTO G.B.; MITRE S.K., PÉREZ T.; OMETTO J.P.H.B.; ASCARRUNZ N.L.; FORTI M.C.; LONGO K.; GAVITO M.E.; ENRICH-PRAST A.; MARTINELLI L.A. Latin America' s nitrogen challenge. **Science**, Washington, v. 340, n. 6129, p. 149, 2013.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 36, p. 86–93, 1986.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of *Pseudomonas rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb nov; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 46, n. 3, p. 802–810, 1996.
- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.; DÖBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane: reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 29, n. 4, p. 417-423, 2002.
- BECKER, D.; STANKE, R.; FENDRIK, I.; FROMMER, W.B.; VANDERLEYDEN, J.; KAISER, W.M.; HEDRICH, R. Expression of the NH₄⁺ - transporter gene LeAMT1;2 is induced in tomato roots upon association with N₂-fixing bacteria. **Planta**, Berlin, v. 215, p. 424-429, 2002.
- BIGGS, I.M.; STEWART, G.R.; WILSON, J.R.; CRITCHLEY, C. N-15 natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 238, p. 21-20, 2002.
- BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of the 15N natural abundance technique for the quantification of the contribution

of N₂ fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, Sidney, v. 28, p. 889-895, 2001.

BURNEY, J.A.; DAVIS, S.J.; LOBELL, D.B. Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 107, n. 26, p. 12052–12057, 2010.

CANUTO, E.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 62-64, 2003.

CAVALCANTE, J.J.V.; VARGAS, C.; NOGUEIRA, C.E.M.; VINAGRE, F.; SCHWARCZ, K.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 673-686, 2007.

CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, p. 23–31, 1988.

CEREZO, M.; TILLARD, P.; FILLEUR, S.; MUÑOS, S.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 1, p. 262–271, 2001.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Review in Plant Sciences**, London, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOURADO-NETO, D.; POWLSON, D.; ABU BAKAR, R.; BACCHI, O.O.S.; BASANTA, M.V.; THI CONG, P.; KEERTHISINGHE, G.; ISMAILI, M.; RAHMAN, S.M.; REICHARDT, K.; SAFWAT, M.S.A.; SANGAKKARA, R.; TIMM, L.C.; WANG, J.Y.; ZAGAL, E.; van KESSEL, C. Multiseason recoveries of organic and inorganic nitrogen-15 in tropical cropping systems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 74, p. 139-152, 2010.

Dos SANTOS M.F.; MUNIZ De PÁDUA, V.L.; De MATOS NOGUEIRA, E.; HEMERLY, A.S.; DOMONT, G.B. Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 73, p. 917-931, 2009.

EMBRAPA AGROBIOLOGIA. **Estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação em cana-de-açúcar**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agrobiologia/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/550/estirpes-de-bacterias-fixadoras-de-nitrogenio-para-inoculacao-em-cana-de-acucar>>. Acesso em: 15 set. 2015.

FENG, H.; YAN, M.; FAN, X.; LI, B.; SHEN, Q.; MILLER, A.J.; XU, G. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and

carbon status. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 7, p. 2319–2332, 2011.

FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAUJO, J.L.; REIS, V.M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTER, M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum sp.*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 356, p. 83-99, 2011.

FOLEY, J.A.; RAMANKUTTY, N.; BRAUMAN, K.A.; CASSIDY, E.S.; GERBER, J.S.; JOHNSTON, M.; MUELLER, N.D.; O'CONNELL, C.; RAY, D.K.; WEST, P.C.; BALZER, C.; BENNETT, E.M.; CARPENTER, S.R.; HILL, J.; MONFREDA, C.; POLASKY, S.; ROCKSTROM, J.; SHEEHAN, J.; SIEBERT, S.; TILMAN, D.; ZAKS, D.P. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, London, v. 478, n. 7369, p. 337–342, 2011.

FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, E.C.A.; TRIVELIN, P.C.O. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 29–41, 2011.

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

GALLOWAY, J.N.; COWLING, E.B. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. **Ambio**, Stockholm, v. 31, p. 64–71, 2002.

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

GARNETT, T.; CONN, V.; PLETT, D.; CONN, S.; ZANGHELLINI, J.; MACKENZIE, N.; ENJU, A.; FRANCIS, K.; HOLTHAM, L.; ROESSNER, U.; BOUGHTON, B.; BACIC, A.; SHIRLEY, N.; RAFALSKI, A.; DHUGGA, K.; TESTER, M.; KAISER, B.N. The response of the maize nitrate transport system to nitrogen demand and supply across the lifecycle. **New Phytologist**, London, v. 198, n. 1, p. 82–94, 2013.

GASTAL, F.; LEMAIRE, G. N uptake and distribution in crops : an agronomical and ecophysiological perspective. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 789–799, 2002.

GAZZARRINI, S.; LEJAY, L.; GOJON, A.; NINNEMANN, O.; FROMMER, W.B.; VON WIREN, N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 3, pp.937–947, 1999.

GLASS, A.D.M.; BRITTO, D.T.; KAISER, B.N.; KINGHORN, J.R.; KRONZUCKER, H.J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M.Y.; UNKLES, S.E.; VIDMAR, J.J. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 855-864, 2002.

GRACIOLLI, L.A.; RUSCHEL, A.P. Microorganisms in the phyllosphere and rizosphere of sugarcane. In: VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P. (Ed.). **Associative N₂-fixation**. Boca Raton: CRC Press, 1981. v. 2, p. 91-101.

GOJON, A.; NACRY, P.; DAVIDIAN, J.C. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, p. 328–338, 2009.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; NASTARI, P.M.; LUCON, O. Ethanol learning curve-the Brazilian experience. **Biomass Bioenergy**, Amsterdam, v. 26, p. 301-304, 2004.

GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 280, n. 1/2, p. 239-252, 2006.

GU, R.; DUAN, F.; AN, X.; ZHANG, F.; von WIRÉN, N.; YUAN, L. Characterization of AMT-mediated high-affinity ammonium uptake in roots of maize (*Zea mays* L.). **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 54, n. 9, p. 1515-1524, 2013.

GUETHER, M.; NEUHÄUSER, B.; BALESTRINI, R.; DYNOWSKI, M.; LUDEWIG, U.; BONFANTE, P.A. Mycorrhizal specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, p. 73-83, 2009.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARTT, C.E. Effect of nitrogen deficiency upon translocation of ¹⁴C in sugarcane. **Plant Physiology**, Rockville, v. 46, p. 419–422, 1970.

HILDEBRANDT, U.; SCHMELZER, E.; BOTHE, H. Expression of nitrate transporter genes in tomato colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, p. 125–136, 2002.

HO, C.H.; LIN, S.H.; HU, H.C.; TSAY, Y.F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, Cambridge, v. 138, n. 6, p. 1184–1194, 2009.

HOEFSLOOT, G.; TERMORSHUIZEN, A.J.; WATT, D.A.; CRAMER, M.D. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. **Plant and Soil**, The Hague, v. 277, p. 85-96, 2005.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G.W. Microbiology: metagenomics. **Nature**, London, v. 455, p. 481–483, 2008.

KECHID, M.; DESBROSSES, G.; ROKHSI, W.; VAROQUAUX, F.; DJEKOUN, A.; TOURAINE, B. The NRT2.5 and NRT2.6 genes are involved in growth promotion of *Arabidopsis* by the plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. **New Phytologist**, London, v. 198, p. 514–524, 2013.

KINGSTON, G.; ANINK, M.C.; ALLEN, D. Acquisition of nitrogen by ratoon crops of sugarcane as influenced by waterlogging and split applications. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Mackay, v. 30, p. 202–211, 2008.

KOBAE, Y.; TAMURA, Y.; TAKAI, S.; BANBA, M.; HATA, S. Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 51, p. 1411–1415, 2010.

KOEGEL, S.; AIT LAHMIDI, N.; ARNOULD, C.; CHATAGNIER, O.; WALDER, F.; INEICHEN, K.; BOLLER, T.; WIPF, D.; WIEMKEN, A.; COURTY, P.E. The family of ammonium transporters (AMT) in *Sorghum bicolor*: two AMT members are induced locally, but not systemically in roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, London, v. 198, p. 853–865, 2013.

KOTUR, Z.; GLASS, A.D. A 150 kDa Plasma membrane complex of AtNRT2.5 and AtNAR2.1 is the major contributor to constitutive high-affinity nitrate influx in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 38, n. 8, p. 1490–1502, 2014.

LAM, H.M.; COSCHIGANO, K. T.; OLIVEIRA, I. C.; MELO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G. M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into aminoacids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 569–593, 1996.

LEZHNEVA, L.; KIBA, T.; FERIA-BOURRELLIER, A.B.; LAFOUGE, F.; BOUTET-MERCEY, S.; ZOUFAN, P.; SAKAKIBARA, H.; DANIEL-VEDELE, F.; KRAPP, A. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 80, n. 2, p. 230–241, 2014.

LIMA, E.; BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using on ¹⁵N aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 165–170, 1987.

LIU, K.-H.; TSAY, Y.-F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 1005–1013, 2003.

LOQUÉ, D.; von WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1293–1305, 2004.

LOQUÉ, D.; YUAN, L.; KOJIMA, S.; GOJON, A.; WIRTH, J.; GAZZARRINI, S.; ISHIYAMA, K.; TAKAHASHI, H. Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. **Plant Journal**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 522–534, 2006.

MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

MAGNANI, G.S.; CRUZ, L.M.; WEBER, H.; BESPALHOK, J.C.; DAROS, E.; BAURA, V.; YATES, M.G.; MONTEIRO, R.A.; FAORO, H.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Culture-independent analysis of endophytic bacterial communities associated with Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 4549-4558, 2013.

MANTELIN, S.; DESBROSSES, L.E.; LARCHER, M.; TRANBARGER, T. J.; CLEYET-MAREL, J.; TOURAIN, B. Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. **Planta**, Berlin, v. 223, p. 591–603, 2006.

MARSCHNER, H.; MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. New York: Academic Press, 2012. 651 p.

MARTINELLI, L.A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges. **Ecological Applications**, Washington, v. 18, n. 4, p. 885–898, 2008.

MEDEIROS, A.F.A.; POLIDORO, J.C.; REIS, V.M. Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum spp.*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 279, p. 141-152, 2006.

MEYER, J.; SCHMANN, A.; WOOD, R.; NIXON, D.; van den BERG, M. Recent advances to nitrogen use efficiency of sugarcane in the South African sugar industry. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Mackay, v. 26, p. 238–246, 2007.

MILLER, A.J.; FAN, X.; ORSEL, M.; STITH, S.J.; WELLS, D.M. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2297–2306, 2007.

MUÑOS, S.; CAZETTES, C.; FIZAMES, C.; GAYMARD, F.; TILLARD, P.; LEPETIT, M.; LEJAY, L.; GOJON, A. Transcript profiling in the chl1-5 mutant of Arabidopsis reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 2433–2447, 2004.

MUELLER, N.D.; GERBER, J.S.; JOHNSTON, M.; RAY, D.K.; RAMANKUTTY, N.; FOLEY, J.A. Closing yield gaps through nutrient and water management. **Nature**, London, v. 490, n. 7419, p. 254–257, 2012.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; VADIVELU, M. Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotricum falcatum* a causal organism of red-rot of sugarcane. **Current Science**, Bangalore, v. 78, n. 9, p. 193-198, 2000.

MUTHUKUMARASAMY, R.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C.; REVATHI, G. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 137-145, 2002.

NOGUEIRA, E.M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H.; VARGAS, C.; PADUA, V.L.M.; SILVA, F.R.; SANTOS, R.V.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 199-206, 2001.

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

OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 59-61, 2003.

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

OLIVEIRA, M.W.; FREIRE, F.M.; MACEDO, G.A.R.; FERREIRA, J. Nutrição mineral e adubação da cana-de-açúcar. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, p. 30-43, 2007.

OLIVEIRA, A.L.M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 45, p. 106-113, 2009.

PEOPLES, M.B.; MOSIER, A.R.; FRENEY, J.R. Minimizing gaseous losses of nitrogen. In: BACON, P.E. (Ed.). **Nitrogen fertilizer in the environment**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 565-606.

PERSELLO-CARTINEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 26, n. 2, p. 189-199, 2003.

PISA, G.; MAGNANI, G.S.; WEBER, H.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J.P.; PEDROSA, F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 12, p. 1215-1221, 2011.

PLETT, D.; TOUBIA, J.; GARNETT, T.; TESTER, M.; KAISER, B.N.; BAUMANN, U. Dichotomy in the NRT Gene families of dicots and grass species. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, e. 15289, 2010.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, p. 29-54, 1998.

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

RENNIE, R.J.; FREITAS, J.R.; RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugarcane (*Saccharum* sp.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 28, p. 462–467, 1982.

RESENDE, A.; XAVIER, R.; De OLIVEIRA, O. Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco, N.E. Brazil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 281, p. 339-351, 2006.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 4, e. 19045, 2011.

ROBINSON, N.; VOGT, J. Nitrogen physiology of sugarcane. In: MOORE, P.H.; BOTHA, F.C. (Ed.). **Sugarcane: physiology, biochemistry & functional biology**. Hoboken: Wiley, 2014. p. 169–195.

ROCKSTRÖM, J.; STEFFEN, W.; NOONE, K.; PERSSON, A.; STUART CHAPIN, F.; LAMBIN, E.F.; LENTON, T.M.; SCHEFFER, M.; FOLKE, C.; SCHELLNHUBER, H.J.; NYKVIST, B.; WIT, C.A.; HUGHES, T.; van der LEEUW, S.; RODHE, H.; SÖRLIN, S.; SNYDER, P.K.; COSTANZA, R.; SVEDIN, U.; FALKENMARK, M.; KARLBERG, L.; CORELL, R.W.; FABRY, V.J.; HANSEN, J.; WALKER, B.; LIVERMAN, D.; RICHARDSON, K.; CRUTZEN, P.; FOLEY, J.A. A safe operating space for humanity. **Nature**, London, v. 461, p. 472–475, 2009.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, p. 319-339, 1999.

ROGATO, A.; D'APUZZO, E.; BARBULOVA, A.; OMRANE, S.; STEDEL, C.; SIMON-ROSIN, U.; KATINAKIS, P.; FLEMETAKIS, M.; UDVARDI, M.; CHIURAZZI, M. Tissue-specific down-regulation of LjAMT1;1 compromises nodule function and enhances nodulation in *Lotus japonicus*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 68, n. 6, p. 585-595, 2008.

RUFFEL, S.; FREIXES, S.; BALZERGUE, S.; TILLARD, P.; JEUDY, C.; MARTIN-MAGNIETTE, M.L.; van der MERWE, M.J.; KAKAR, K.; GOUZY, J.; FERNIE, A.R.;

UDVARDI, M.; SALON, C.; GOJON, A.; LEPETIT, M. Systemic signaling of the plant nitrogen status triggers specific transcriptome responses depending on the nitrogen source in *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, n. 4, p. 2020–2035, 2008.

SCHRÖDER, J.; SCHOLEFIELD, D.; CABRAL, F. The effects of nutrient losses from agriculture on ground and surface water quality: the position of science in develop indicator for regulation. **Environmental Science and Policy**, Amsterdam, v. 7, p. 15-23, 2004.

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

SEARCHINGER, T.; HEIMLICH, R.; HOUGHTON, R. A.; DONG, F.; ELOBEID, A.; FABIOSA, J.; TOKGOZ, S.; HAYES, D.; YU, T. Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. **Science Express**, Washington, v. 319, p. 1238–1240, 2008.

SOHLENKAMP, C.; WOOD, C.C.; ROEB, G.W.; UDVARDI, M.K. Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a high-affinity ammonium transporter of the plasma membrane. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, p. 1788–1796, 2002.

SOMERVILLE, C.; YOUNGS, H.; TAYLOR, C.; DAVIS, S.C.; LONG, S.P. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. **Science**, Washington, v. 329, p. 790–792, 2010.

STITT, M.; MULLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.R.; KRAPP, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 959–970, 2002.

SUBBARAO, G.V.; SAHRAWAT, K.L.; NAKAHARA, K.; ISHIKAWA, T.; KISHII, M.; RAO, I.M.; HASH, C.T.; GEORGE, T.S.; SRINIVASA, R.P.; NARDI, P.; BONNETT, D.; BERRY, W.; SUENAGA, K.; LATA, J.C. Biological nitrification inhibition (BNI): a novel strategy to regulate nitrification in agricultural systems. **Advances in Agronomy**, New York, v. 114, p. 249–302, 2012.

SUMAN, A.; SHASANY, A.K.; SINGH, M.; SHAHI, H.N.; GAUR, A.; KHANUJA, S.P.S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, p. 39-45, 2001.

SUMAN, A.; SHRIVASTAVA, A.K.; GAUR, A.; SINGH, P.; SINGH, J.; YADAV, R.L. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 54, p.1-11, 2008.

TILMAN, D. Global environmental impacts of agricultural expansion : The need for sustainable and efficient practices. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 96, p. 5995–6000, 1999.

TILMAN, D.; FARGIONE, J.; WOLFF, B.; D'ANTONIO, C.; DOBSON, A.; HOWARTH, R.; SCHINDLER, D.; SCHLESINGER, W.H.; SIMBERLOFF, D.; SWACKHAMER, D. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, Washington, v. 292, n. 5515, p. 281–284, 2001.

TILMAN, D.; CASSMAN, K.; MATSON, P.; NAYLOR, R. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, London, v. 418, p. 671-677, 2002.

TRIVELIN, P.C.O.; OLIVEIRA, M.W. Perdas do nitrogênio da uréia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 2, p. 193–201, 2002.

TSAY, Y.F.; CHIU, C.C.; TSAI, C.B.; HO, C.H.; HSU, P.K. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 12, p. 2290–300, 2007.

URQUIAGA, S.; CRUZ, H.S.; BODDEY, R.M.; Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen- 15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114.1992.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; DA SILVA, A.M.; FERRO, M.I.T; NOBREGA, F.G. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 13, p. 2725-2735, 2003.

VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K.; CAVALCANTE, J.; NOGUEIRA, E.M.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 559-69, 2006.

VITOUSEK, P.M.; NAYLOR, R.; CREWS, T.; DAVID, M.B.; DRINKWATER, L.E.; HOLLAND, E.;JOHNES, P,J;; KATZENBERGER, J.; MARTINELLI, L.A.; MATSON, P,A.; NZIGUHEBA, G.; OJIMA, D.; PALM C.A;;ROBERTSON, G.P.; SANCHEZ, P.A.; TOWNSEND, A.R.; ZHANG, F.S. Agriculture nutrient imbalances in agricultural development. **Science**, Washington, DC, v. 324, p. 1519-1520, 2009.

van HEERDEN, P.D.R.; DONALDSON, R.A.; WATT, D.A.; SINGELS, A. Biomass accumulation in sugarcane: unravelling the factors underpinning reduced growth phenomena. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 11, p. 2877–2887, 2010.

WHEALS, A.E., BASSO, L.C., ALVESAND, D.M.G., AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 17, p. 482-487, 1999.

WIRTH, J.; CHOPIN, F.; SANTONI, V.; VIENNOIS, G.; TILLARD, P.; KRAPP, A.; LEJAY, L.; DANIEL- VEDELE, F.; GOJON, A. Regulation of root nitrate uptake at the

NRT2. 1 Protein level in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 32, p. 23541–23552, 2007.

WOOD, A.W.; SCHROEDER, B.L.; DWYER, R. Opportunities for improving the efficiency of use of nitrogen fertiliser in the Australian sugar industry. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Mackay, v. 32, p. 221–233, 2010.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A.J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 153–182, 2012.

YEOH, Y.K.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; DENNIS, P.G.; ROBINSON, N.; RAGAN, M.A.; SCHMIDT, S.; HUGENHOLTZ, P. The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application. **Environmental Microbiology**, Oxford, publicado online Jun. 2015. doi: 10.1111/1462-2920.12925. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26032777>> Acesso em: 13 nov. 2015.

YUAN, L.; LOQUE, D.; KOJIMA, S.; RAUCH, S.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; TAKAHASHI, H.; von WIRÉN, N. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 8, p. 2636–2652, 2007.

2 COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA EM CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS *IN VITRO* E EM CONDIÇÕES DE CAMPO

Resumo

A expansão da cultura da cana-de-açúcar para solos marginais no Brasil requer uma maior utilização de fertilizantes à base de nitrogênio (N) para manter a produtividade. A maioria dos países produtores de cana-de-açúcar emprega altas taxas de aplicação de N, enquanto no Brasil o seu uso é relativamente baixo. Essa baixa demanda de fertilização de N poderia ser devido ao processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), que é uma das principais formas de entrada de N nos ecossistemas, intermediada por vários microrganismos diazotróficos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a estrutura das comunidades bacterianas em plantas de cana-de-açúcar e como essa comunidade é afetada por inoculações artificiais com outras bactérias e por fertilização nitrogenada. Por meio do sequenciamento de nova geração, investigamos a comunidade bacteriana associada a plântulas micropropagadas de 'SP70-1143' e 'Chunee', contrastantes para a capacidade de FBN. Num segundo experimento, plantas do genótipo 'IAC87-3396' cultivadas em campo por três anos foram avaliadas para a comunidade bacteriana comparando o efeito de fertilização nitrogenada (0 ou 100 kg N ha⁻¹) e inoculação com bactérias diazotróficas segundo recomendação da Embrapa. Foi detectada uma comunidade bacteriana associada a plântulas de cana-de-açúcar de 'SP70-1143' e 'Chunee' mantidas em condições *in vitro*, com composição distinta entre os genótipos. A inoculação artificial com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* afetou a composição dessa comunidade de bactérias. Plantas de 'IAC87-3396' cultivadas em campo apresentaram diferenças importantes na comunidade bacteriana sob efeito da fertilização de N. A inoculação com as bactérias diazotróficas nesse experimento mostrou a detecção dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia* em plantas inoculadas, três anos após a primeira inoculação. A fertilização com N tendeu a reduzir a diversidade encontrada nas plantas de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Novos métodos de sequenciamento; 16S rRNA; Diazotróficas; Inoculação; Metagenoma

Abstract

The expansion of sugarcane cultivation for marginal soils in Brazil requires greater use of nitrogen fertilizers to maintain yield. The largest sugarcane producing countries apply high N rates, whereas Brazil uses relatively low amounts. Low requirement for nitrogen fertilization in sugarcane cultivation in Brazil could be due to biological nitrogen fixation (BNF), which is one of the main forms of N input to ecosystems mediated by several diazotrophic microorganisms. The objective of this study was to evaluate the structure of bacterial community in sugarcane plants, and how this community is affected by artificial inoculation and N fertilization. By new generation sequencing (NGS), we investigated the bacterial community associated with *in vitro* plantlets of 'SP70-1143' and 'Chunee', that contrast for the ability to FBN. In a second experiment, sugarcane plants 'IAC87-3396' grown in the field for three years were evaluated for the bacterial community, comparing the effect of nitrogen fertilization (0 and 100 kg N ha⁻¹) and inoculation with diazotrophic bacterial according to Embrapa's recommendation. Bacterial communities associated with the

in vitro plants of 'SP70-1143' and 'Chunee' were detected with different composition. Artificial inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* affected the composition of the bacterial community. 'IAC87-3396' plants grown in the field for three years showed an effect of N fertilization in bacterial community. Artificial inoculation with diazotrophic bacteria enabled the detection of *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* and *Burkholderia* genus. N fertilization tended to reduce the diversity of the bacterial community.

Keywords: New sequencing methods; 16S rRNA; Diazotrophic; Inoculation; Metagenome

2.1 Introdução

Bactérias endofíticas ocupam tecidos internos das plantas sem causar danos aos seus hospedeiros (HALLMANN et al., 1997). Essa comunidade bacteriana pode desempenhar um papel importante na produção agrícola por promover benefícios à planta, com efeitos potenciais diretos, como a produção de fitormônios (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003), solubilização de fósforo (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999) ou efeitos indiretos, como o antagonismo a fitopatógenos (MUTHUKUMARASAMY; REVATHI; VADIVELU, 2000), entre outros. As bactérias denominadas diazotróficas possuem a capacidade de reduzir nitrogênio atmosférico (N_2) a amônia (NH_3) por meio de um complexo enzimático denominado nitrogenase, num processo conhecido como fixação biológica de nitrogênio (FBN). As bactérias diazotróficas colonizam espaços intercelulares dos tecidos em caules, colmos e raízes, mas também podem ser encontradas na rizosfera.

A cana-de-açúcar é uma cultura agrícola de grande importância econômica para o Brasil, sendo utilizada para a produção de açúcar e etanol (GOLDEMBERG et al., 2004). Apesar da sua extensiva área de plantio, o uso de fertilizantes nitrogenados pela cultura no Brasil é relativamente baixo ($60-100 \text{ kg ha}^{-1}$), quando comparado a outros países grandes produtores, como China ($100-755 \text{ kg ha}^{-1}$) e Índia ($150-400 \text{ kg ha}^{-1}$) (ROBINSON et al., 2011). Com isso, tem sido considerada a hipótese que a baixa demanda do cultivo de cana-de-açúcar por N no Brasil poderia derivar da suficiência obtida a partir da ocorrência efetiva da FBN (RUSCHEL; HENIS; SALATI, 1975; LIMA; BODDEY; DÖBEREINER, 1987).

Diversas bactérias diazotróficas foram isoladas de cana-de-açúcar desde o início dos trabalhos pioneiros liderados pela Dra. Johanna Döbereiner, como por exemplo: *Azospirillum* spp., *Azotobacter* spp., *Derxia* spp., *Enterobacter* spp.,

Erwinia spp., *Gluconacetobacter* spp., *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp. (GRACIOLLI; RUSCHEL, 1981; RENNIE et al., 1982 CAVALCANTE; DÖBEREINER 1988; BALDANI et al., 1986, 1996; REIS et al., 2004). Associado a descoberta dessas bactérias diazotróficas, trabalhos foram conduzidos para quantificar a FBN em cana-de-açúcar revelando que, potencialmente, 40 a 70% do N encontrado na planta derivaria da FBN (LIMA; BODDEY; DÖBEREINER, 1987; URQUIAGA et al., 1992).

A partir da identificação dessas bactérias diazotróficas e seu potencial uso para aumento da FBN, foi desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ) inoculante para cana-de-açúcar que tem por finalidade “promover o crescimento vegetal com uma redução total ou parcial da aplicação de fertilizantes nitrogenados, pois as bactérias fixariam nitrogênio do ar e disponibilizariam o nutriente para a planta” (EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2015). O produto é veiculado em preparações contendo turfa estéril e as seguintes estirpes de bactérias: *A. amazonense* estirpe BR 11115 (CBAmC), originalmente isolada a partir do caule da variedade de cana-de-açúcar CB45-3; *G. diazotrophicus* estirpe BR 11281 (PAL5), isolada a partir das raízes da variedade comercial ‘SP77-5181’ (CAVALCANTE; DOEBEREINER 1988); *H. seropedicae* estirpe BR 11335 (HRC 54) e *H. rubrisubalbicans* estirpe BR 11504 (HCC 103), isoladas a partir das raízes da variedade ‘SP70-1143’ e colmos da variedade ‘SP70-1284’, respectivamente; e *Burkholderia tropica* estirpe BR 11366 (Ppe8), isolada a partir das gemas da variedade ‘SP71-1406’ (OLIVEIRA et al., 2009).

Nas condições brasileiras, o uso desse inoculante em cana-de-açúcar aumentou a produção de matéria seca de colmos e raiz, produtividade de colmos e também da FBN (OLIVEIRA et al., 2002, 2003, 2006; CANUTO et al., 2003; SCHULTZ et al., 2012). Porém, a ocorrência de FBN em cana-de-açúcar é questionada e permanece por ser esclarecida. Na África do Sul, por exemplo, não há evidência de que a FBN contribui com quantidades significativas de N, apesar de terem sido detectados endofíticos diazotróficos nos tecidos de cana (HOEFSLOOT et al., 2005). Portanto, permanece por ser elucidado se as bactérias estão realmente fixando nitrogênio e o fornecendo para a planta, ou se os incrementos de produtividade observados nas plantas inoculadas são derivados de algum outro fator benéfico que não a FBN, como por exemplo, fatores promotores de crescimento (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003;

PERSELLO-CARTINEAUX; NUSSAUME; ROBAGLIA, 2003). No Brasil, outros trabalhos indicam que grande parte do N utilizado pela cultura seria fornecido pela matéria orgânica do solo (DOURADO-NETO et al., 2010; FRANCO et al., 2011), o que justificaria a baixa demanda de N pela cultura.

A investigação sobre a comunidade bacteriana associada a culturas agrícolas pode contribuir para o entendimento de como microrganismos influenciam a produtividade das culturas. A maioria das bactérias endofíticas isoladas de colmos e folhas da cana-de-açúcar, determinadas por sequenciamento do gene 16S rRNA, e dependentes de cultivo em meio, pertencem às famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae (MAGNANI et al., 2010; 2013). Do total, as bactérias diazotróficas cultivadas perfazem apenas 10% dos isolados que apresentaram atividade da nitrogenase (MAGNANI et al., 2010). Bactérias diazotróficas endofíticas, como *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp. e *Azospirillum* spp., normalmente associadas à cana-de-açúcar, não foram detectadas pelo sequenciamento do 16S rRNA. Em outro estudo, bactérias endofíticas foram isoladas de várias cultivares utilizando o mesmo meio de cultura, e a prevalência de bactérias diazotróficas variou de 0,02 a 3,86% do total da comunidade bacteriana cultivável, dependendo da cultivar amostrada (SUMAN et al., 2001).

As bactérias que ocorrem naturalmente nas culturas agrícolas podem ser afetadas por diversos aspectos. Há questionamentos acerca da fertilização com N sobre a comunidade de bactérias endofíticas e, principalmente, diazotróficas em cana-de-açúcar (FUENTES-RAMIREZ et al., 1999; MUTHUKUMARASAMY et al., 2002; MEDEIROS et al., 2006; PISA et al., 2011; YEOH et al., 2015). Uma avaliação da comunidade bacteriana da rizosfera de cana-de-açúcar sob condições distintas de fertilização com N (sem adubação ou 120 kg ha⁻¹ de N) revelou pouca diferença entre os filos encontrados para diversos níveis de fertilização; por outro lado, quando analisado em nível de gênero, uma maior diversidade foi associada às plantas que receberam adubação nitrogenada em oposição às plantas que não foram fertilizadas (PISA et al., 2011).

Além disso, há questões envolvendo a permanência e a capacidade de competição de bactérias diazotróficas introduzidas artificialmente por inoculação frente aos endofíticos nativos encontrados naturalmente em cana-de-açúcar. Experimentos com cana-de-açúcar inoculada com a mistura de cinco bactérias diazotróficas comercializadas pela Embrapa Agrobiologia revelaram que seis meses

após a última inoculação, apenas transcritos de 16S rRNA e *nifH* de duas espécies (*G. diazotrophicus* e *B. tropica*) das cinco inoculadas inicialmente (*A. amazonense*; *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *B. tropica*) (FISCHER et al., 2011). A hipótese considerada foi que o inoculante artificial é apenas uma pequena parte da comunidade bacteriana no momento da amostragem e podem apresentar diferenças quanto a capacidade competitiva (FISCHER et al., 2011). No entanto, novos estudos são necessários para avaliar se esses inoculantes artificiais apresentam capacidade competitiva, tornando-se então persistentes durante o ciclo de vida da cultura (cana-planta e cana-soca), tanto sob fertilização com N ou não e independente da cultivar utilizada, ou se essa colonização é apenas transitória.

A inoculação artificial com as cinco bactérias comercializadas pela Embrapa Agrobiologia foi também testada em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, tidas como isentas de contaminantes microbianos (OLIVEIRA et al., 2003, 2009). Supõe-se que a micropropagação eliminaria a diversidade natural de bactérias endofíticas das plantas de cana-de-açúcar e com isso seria possível apenas reintroduzir microrganismos benéficos de interesse, como, por exemplo, as bactérias diazotróficas, para então serem levadas a campo (REIS et al., 1999). Porém, há controvérsias quanto a existência de culturas totalmente ou predominantemente axênicas.

Para ampliar o conhecimento sobre a comunidade bacteriana em cana-de-açúcar quando inoculadas ou não com bactérias diazotróficas, sob condições contrastantes de fertilização nitrogenada (0 ou 100 kg ha⁻¹), o presente trabalho teve como objetivo analisar a composição da comunidade endofítica de bactérias em plantas cultivadas *in vitro* e em condições de campo, por meio do sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA empregando a abordagem de metagenômica e sequenciamento de nova geração (NGS).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Ensaio de inoculação para análise da comunidade de bactérias *in vitro*

Plantas micropropagadas de 'SP70-1143' e 'Chunee', obtidas por meio de cultura *in vitro* de ápices, foram crescidas em condição constante de suficiência de N (2 mM de NH₄NO₃). Antes dos experimentos de inoculação, as plantas foram

submetidas a um tratamento de deficiência de N (-N) por 24 h, utilizando o meio MR sem fonte de nitrogênio (concentração final de Macronutrientes MS: 1900 mg L⁻¹ KCl; 440 mg L⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 370 mg L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 170 mg L⁻¹ KH₂PO₄; Micronutrientes: 22,3 mg L⁻¹ MnSO₄.H₂O; 8,6 mg L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 6,2 mg L⁻¹ H₃BO₃; 0,25 mg L⁻¹ Na₂MoO₄.2H₂O; 0,025 mg L⁻¹ CuSO₄.5H₂O; 0,025 mg L⁻¹ CoCl₂.6H₂O; 37,25 mg L⁻¹ Na₂EDTA; 27,85 mg L⁻¹ FeSO₄.7H₂O; e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem) e com sacarose reduzida (2 g L⁻¹). Em seguida, as plântulas foram inoculadas ou não com 0,1 mL de uma suspensão de *Gluconacetobacter diazotrophicus* crescidas por 48 h contendo 10⁸ células bacterianas (determinada em espectrofotômetro a 600 nm), utilizando meio MR desprovido de fonte de nitrogênio e de carbono. Após 48 h, as plântulas foram submetidas ao tratamento de presença de N (+N), no qual 0,2 mM de nitrato de amônio foi adicionado ao meio de cultura, no qual permaneceu por 72 h e 60 d. As plantas foram mantidas a 28° C com um fluxo de fótons fotossintéticos de 80 μmol m⁻² s⁻¹ por 16 h dia⁻¹. Após o período de 72 h e 60 d, duas plantas de cada tratamento de cada variedade (Tratamento 1: plântulas inteiras não inoculadas; Tratamento 2: plântulas inteiras inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* e submetidas a presença de N por 72 h; Tratamento 3: plântulas inteiras inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* e submetidas a presença de N por 60 d) foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a extração de DNA.

2.2.2 Ensaio de inoculação para análise da comunidade de bactérias endofíticas em campo

As plantas da variedade 'IAC87-3396' foram inoculadas ou não durante o plantio com o inoculante fornecido pela Embrapa Agrobiologia (Seropédica – RJ) contendo as cinco espécies de bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) e submetidas a tratamentos sem adubação (0 kg N ha⁻¹) ou com adubação de nitrogênio (100 kg N ha⁻¹). A inoculação foi realizada em seções de colmos com 0,45 m de comprimento (toletes com três gemas viáveis), que foram imersos por 60 min em solução preparada com 2,5 kg do produto inoculante (500 g do produto de cada espécie) em um volume de 100 L de água limpa. O produto inoculante contém turfa em pó como veículo inerte para os

microrganismos. O material propagativo foi retirado da solução após o período de imersão e plantado em 13 de abril de 2010. Para a inoculação das bactérias nos ciclos seguintes de cana-soca foi utilizado o inoculante com material polimérico como veículo. A dosagem foi de 1250 mL (250 mL do produto para cada espécie) num volume de 100 L de água limpa.

Três plantas de cada tratamento (Tratamento 1: 0N – plantas não inoculadas sem adubação nitrogenada; Tratamento 2: 0N+I – plantas inoculadas com a mistura das cinco bactérias diazotróficas sem adubação nitrogenada; Tratamento 3: 100N - plantas não inoculadas submetidas a adubação de nitrogênio 100 kg N ha⁻¹; Tratamento 4: 100N+I - plantas inoculadas com a mistura das cinco bactérias diazotróficas submetidas a adubação nitrogenada 100 kg N ha⁻¹) tiveram folhas (folha +1 e +3) coletadas em 05 de agosto de 2013 (2º soqueira, terceiro corte). As amostras de folhas foram desinfestadas superficialmente com etanol 70%, e ambos os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e as amostras foram armazenadas a -80° C até a extração de DNA.

2.2.3 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de acordo por Doyle e Doyle (1990) com pequenas modificações. As amostras foram maceradas em almofariz na presença nitrogênio líquido até a obtenção de pó fino. Em seguida, foram adicionados 700 µL de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA; 1% Polivinilpirrolidona; 100 µg mL⁻¹ Proteinase K; 0,2% β-mercaptoetanol) e foram incubados à 65° C por 30 min. Em seguida, a suspensão foi extraída utilizando-se mesmo volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), quando os tubos foram misturados gentilmente por 1 min, em seguida, centrifugados por 7 min a 10.000 g. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo e homogeneizado com 650 µL de fenol, sendo centrifugado por 7 min a 10.000 g. Após esse procedimento, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e homogeneizado com o 200 µL de tampão de extração (sem proteinase K) e 650 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), sendo, então, centrifugado por 7 min a 10.000 g. Novamente, foi adicionado 650 µL clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e centrifugado por 7 min a 10.000 g. Do sobrenadante resultante, transferiu-se 550 µL para um novo tubo e a ele foi adicionado igual volume de isopropanol, misturado

gentilmente, e, posteriormente, centrifugado por 7 min a 10.000 g. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao sedimentado (*pellet*) formado foi adicionado 250 µL de 70% etanol, sendo posteriormente centrifugado por 2 min a 10.000 g. Após essa centrifugação o líquido foi descartado e esperou-se o *pellet* formado secar a temperatura ambiente. O DNA obtido foi dissolvido em 30 µl de Tris-RNase (10 mM Tris-HCl; 10 µg µL⁻¹ de RNase). As amostras de DNA foram quantificadas em fluorômetro Hoefer DyNA Quant 200.

2.2.4 Descrição da comunidade bacteriana por sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA

O sequenciamento em larga escala foi realizado na plataforma MiSeq System (Illumina; San Diego, CA, EUA) no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ-USP, Piracicaba-SP, utilizando amostras de plântulas inteiras de cana-de-açúcar dos genótipos ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ do ensaio de inoculação *in vitro* e amostras de folhas (*pool* de folhas +1 e +3) da variedade ‘IAC87-3396’ referente ao ensaio de inoculação em campo.

A abordagem taxonômica utilizada para caracterizar as comunidades bacterianas baseou-se no sequenciamento da região V6-V8 do gene 16S rRNA utilizando os iniciadores 968F (5'- AACGCGAAGAACCTTAC -3') (GOMES et al., 2001) e 1401R-1b (5'- CGGTGTGTACAAGACCCGGAACG -3') (BRONS; van ELSAS, 2008), nos quais foram adicionados pré adaptadores indicados pelo fabricante. Após a primeira PCR do gene alvo 16S rRNA, foi feita uma segunda PCR para a ligação dos adaptadores (*index*) compostos por oito bases. Cada amostra sequenciada recebeu um par de *index* distinto para a identificação posterior de cada uma das sequências obtidas.

2.2.5 Análise das sequências obtidas

Primeiramente, os arquivos *FastQ* foram separados em arquivos *.fasta e *.qual a partir do comando *Fastq.info* realizado no programa Mothur (SCHLOSS et al., 2009). Em seguida, a análise das sequências obtidas foi realizada com o programa *Quantitative Insights Into Microbial Ecology – QIIME* (CAPORASO et al., 2010). Resumidamente, a separação das amostras de acordo com seus adaptadores (*index*) foi feita a partir do comando *split_libraries.py*., no qual foi

verificada a qualidade das sequências adotando o valor *default* de 25. Posteriormente, as sequências foram alocadas em uma matriz de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs), usando uma similaridade de 97% com o algoritmo *uclust*. A classificação taxonômica foi atribuída usando como comparativo o banco de dados Ribosomal Database Project (RDP - http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp). Os gráficos de classificação taxonômica foram obtidos por meio do comando *sumarize_taxa_through_plots.py*. Com a finalidade de avaliar a similaridade entre os grupos bacterianos encontrados, foi conduzida a análise multivariada por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) a partir da matriz de UTOs (Unidades Taxonômicas Operacionais) obtida pelo comando *beta_diversity_through_plots.py*. Além disso, foram feitas análises de rarefação e diversidade (Diversidade Filogenética - *PD_whole_tree*, Chao1, Número de UTOs) por meio dos comandos *alpha_rarefaction.py* e *alpha_diversity.py*, respectivamente. Todas as análises foram realizadas para as amostras de campo e amostras in vitro separadamente.

A identificação dos gêneros dos inóculos artificiais foi realizada empregando o software *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (STAMP) (PARKS; BEIKO, 2010) utilizando-se a tabela com o número total de UTOs como arquivo de entrada.

2.2.6 Análise da estrutura da comunidade bacteriana em campo

Para a análise da estrutura da comunidade foram utilizadas as plantas do genótipo 'IAC87-3396' proveniente do ensaio em campo.

2.2.6.1 Amplificação de gene 16S rRNA e *nifH* de bactérias

Com o objetivo de estimar a estrutura da comunidade bacteriana e fixadora presente nas amostras dos diversos tratamentos foi feita a amplificação do gene bacteriano 16S rRNA e do gene *nifH*. Para o gene 16S rRNA foram utilizados os iniciadores 799F e 1492R utilizando a abordagem de *nested* PCR (Tabela 2.1; CHELIUS; TRIPLETT, 2001; HEUER et al., 1997). O iniciador 799F amplifica a maioria das sequências bacterianas e exclui o DNA do cloroplasto (CHELIUS; TRIPLETT, 2001). A amplificação por PCR com o iniciador 799F e 1492R origina um produto mitocondrial de aproximadamente 1090 pb e um produto bacteriano de aproximadamente 740 pb. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese

em gel de 1,5% agarose e os fragmentos dos tamanhos esperados (aproximadamente 740 pb) foram excisados e purificados utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System* (Promega; Fitchburg, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A segunda reação de PCR foi realizada com os iniciadores 968F-GC (GOMES et al., 2001) e 1401R-1b (Tabela 2.1; BRONS; van ELSAS, 2008) e 1 µL do produto de PCR purificado a partir da primeira reação utilizado como molde. As reações de PCR incluíram 1 µL de cada amostra purificada, tampão da *Taq* 1X (75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,2 µM de cada primer, 0,1% (v/v) Tween 20, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Roche; Almere, Holanda) em volume final de 25 µL. O perfil da reação foi designado iniciando a 95° C por 5 min, seguido de 10 ciclos de 94° C por 1 min, 60° C (*touchdown*, diminuindo a temperatura em 0,5° C a cada ciclo) por 1 min e 72° C por 2 min sucedido de mais 20 ciclos de 94° C por 1 min, 55° C por 1 min e 72° C por 2 min com uma extensão final de 72° C por 10 min. O produto de PCR foi visualizado em gel de 1,5% agarose corado com brometo de etídio.

Para a amplificação do gene *nifH*, o primeiro PCR foi realizado com os iniciadores FPGH19 e POLR (Tabela 2.1; SIMONET et al., 1991; POLY et al., 2001). As reações de PCR incluíram 2 µL de cada amostra de DNA (10 ng µL⁻¹), tampão da *Taq* com MgCl₂ (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl), 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada iniciador, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Roche) em volume final de 25 µL. O perfil da reação foi designado iniciando a 94° C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94° C por 1 min, 56° C por 1 min e 72° C por 2 min com uma extensão final de 72° C por 5 min. A segunda reação foi realizada com os iniciadores POLF-GC e AQER (Tabela 2.1; POLY et al., 2001). As reações de PCR incluíram 1 µL de cada amostra da primeira PCR, tampão da *Taq* com MgCl₂ (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl), 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada *primer*, 1 U de *Taq* DNA polimerase (Roche) em volume final de 25 µL. O perfil da reação foi designado iniciando em 94° C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 94° C por 1 min, 48° C por 1 min e 72° C por 2 min com uma extensão final de 72° C por 5 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, seguido por coloração com brometo de etídio.

Tabela 2.1 - Sequências dos iniciadores utilizados no DGGE (*Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*) para a amplificação das regiões 16S rRNA e *nifH*

PCR-DGGE			
	iniciadores	Sequência	Referência
	(5' - 3')		
16S	799F	AACMGGATTAGATACCCCKG	Chelius & Triplett (2001)
	1492R	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Heuer et al. (1997)
	968F-GC	AACGCGAAGAACCTTAC	Gomes et al. (2001)
<i>nifH</i>	1401R-1b	CGGTGTGTACAAGACCCGGAACG	Brons & Van Elsas (2008)
	FPGH19	TACGGCAARGGTGGNATHG	Simonet et al. (1991)
	POLR	ATSGCCATCATYTCRCCGGA	Poly et al. (2001)
	POLF-GC	TGCGAYCCSAARGCBGACTC	Poly et al. (2001)
	AQER	GACGATGTAGATYTCCTG	Poly et al. (2001)

Y= C ou T; K= G ou T; S= G ou C; M= A ou C; H= A, C ou T; R= A ou G.

2.2.6.2 Análise por *Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis* (DGGE)

As análises por DGGE foram realizadas no equipamento Ingeny phorU 2 x 2 (Ingeny International; Goes, Holanda). Foram preparados géis de 6% (p/v) poliacrilamida com gradiente desnaturante de 50-65% para 16S rRNA e 45-65% para *nifH* (onde 100% de desnaturação corresponde a 7 M de ureia e 40% (v/v) formamida deionizada). Os géis foram submetidos à eletroforese por 16 h a 100 V a uma temperatura de 60° C. Os géis foram corados com SYBR Gold (Invitrogen; Breda, Holanda) na concentração final 0,5 µg L⁻¹; em 0,5 X TAE durante 1 h a temperatura ambiente e visualizados com *Imagemaster VDS* (Amersham Biosciences; Buckinghamshire, Reino Unido).

2.2.6.3 Análise Estatística

Os perfis genéticos obtidos por DGGE foram analisados e comparados pelo programa *GelCompar* (Applied Maths; Sint-Martens Latem, Bélgica; RADEMAKER; De BRUIJN, 1997), no qual eles foram alinhados de acordo com um marcador externo permitindo o alinhamento e a análise conjunta de diferentes géis. As bandas

foram identificadas e as áreas referentes a cada banda foram quantificadas de maneira relativa ao total de área da amostra, permitindo a normalização e posterior comparação entre as amostras. Em seguida, as matrizes de abundância foram transformadas por raiz quadrada. Para comparar a estrutura da comunidade entre os diferentes tratamentos e tecidos vegetais, a Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada no *software* Canoco (Canoco 4.5, Biometris; Wageningen, Holanda) e Análise de Similaridade (ANOSIM) foi realizada no *software* PRIMER (versão 6, PRIMER-E; Plymouth, Reino Unido; CLARKE; GORLEY, 2006) para testar os efeitos de inoculação e fertilização com nitrogênio, utilizando para isso 5.000 permutações. A diversidade total dos membros dominantes de cada tratamento foi estimada a partir dados de DGGE por meio do número de bandas, sendo cada banda utilizado como *proxy* para o número de espécies.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Composição da comunidade bacteriana com base no gene 16S rRNA em cana-de-açúcar cultivada *in vitro*

O sequenciamento de produtos amplificados do gene 16S rRNA específicos de bactérias foi realizado com o objetivo de investigar se havia comunidade bacteriana associada a plantas cultivadas *in vitro* de dois genótipos contrastantes para a capacidade de fixação biológica de N₂ (URQUIAGA et al., 1992) e, posteriormente, analisar se a inoculação artificial com uma bactéria diazotrófica (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) alteraria o perfil das bactérias já existentes nessas plântulas. Para tal, plântulas dos genótipos ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’, foram obtidas pelo cultivo *in vitro* convencional, subcultivadas por pelo menos 12 meses, e utilizadas nos experimentos com inoculação de *G. diazotrophicus*, totalizando três tratamentos para cada genótipo: i) amostras de plantas inteiras não inoculadas; ii) plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* e mantidas em 0,2 mM de N (+N) por 72 h; iii) plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* e mantidas em 0,2 mM de N (+N) por 60 d.

A composição da comunidade bacteriana foi determinada por afiliação taxonômica das sequências 16S rRNA amplificadas de bactérias por meio do sequenciamento em larga escala utilizando a plataforma MiSeqTM System (Illumina).

Foi gerado um total de 3.549.280 sequências que, após o processo de avaliação de qualidade e rarificação resultaram em 1.706.670 sequências de alta qualidade. Por análise contra o banco RDP, com identidade mínima de 97%, foram identificadas 30.764 UTOs.

A análise conjunta da afiliação taxonômica das amostras obtidas dos diversos tratamentos de 'SP70-1143' e 'Chunee' apresentaram como filo dominante o Actinobacteria (média de 49,8%), seguido do Proteobacteria (30,9%) e Firmicutes (13,4%), enquanto 5,8% de sequências não foram classificadas em nenhum filo (bactérias não classificadas) (Figura 2.1). Supõe-se que a micropropagação, que por manter plantas em condições axênicas, eliminaria a diversidade natural de bactérias endofíticas das plantas de cana-de-açúcar (REIS et al, 1999). Porém, por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA, foi observado que plantas de cana-de-açúcar estabelecidas em cultivo *in vitro* não poderiam ser consideradas culturas axênicas, pois abrigavam uma microbiota específica. Para que ocorra o restabelecimento das plântulas cultivadas *in vitro* é necessário um grande número de subcultivos sucessivos na fase de multiplicação (BRONDANI et al., 2012). Este procedimento conduz a multiplicação dos microrganismos endofíticos latentes, que, eventualmente, podem multiplicar-se no meio de cultura. Provavelmente, esse fenômeno pode ser uma resposta ao estresse causado pelas multiplicações excessivas das plantas ou devido a alterações micro-ambientais (THOMAS 2004; THOMAS; KUMARI 2010).

A análise dos genótipos 'SP70-1143' e 'Chunee' não inoculados mostrou que o taxon dominante em ambos foi o filo Actinobacteria (Figura 2.1). Porém, plântulas de 'SP70-1143' não inoculadas apresentaram Proteobacteria como o segundo filo dominante (Figura 2.1), enquanto para o genótipo 'Chunee', esse filo era muito reduzido, e o segundo filo dominante para esse genótipo foi o Firmicutes (Figura 2.1). Estes resultados sugerem haver diferenças na composição de bactérias entre os genótipos.

Quando os mesmos dados são analisados pela Análise de Coordenadas Principais (PCoA) é possível inferir que há uma tendência de diferenciação da composição bacteriana entre os genótipos analisados: as amostras do genótipo 'SP70-1143' encontram-se nos quadrantes superior e inferior direito, sendo explicadas pelo eixo PC1 (57,9%), enquanto as amostras de 'Chunee' se agrupam no superior e inferior esquerdo (Figura 2.2). Essa diferença varietal encontrada para a composição de bactérias endofíticas em relação ao filo dominante e a quantidade

de Proteobacteria poderia explicar as diferenças entre as taxas de FBN desses genótipos. Enquanto 'SP70-1143' apresenta valores médios de contribuição da FBN superiores a 60% do total do N acumulado pela planta, 'Chunee' não obteve 40% do total de N acumulado proveniente da FBN (URQUIAGA et al., 1992). O filo Proteobacteria contém o maior número de representantes de bactérias diazotróficas capazes de fixar nitrogênio atmosférico, e sua associação com gramíneas já foi descrita (ZEHR et al., 2003; RAYMOND et al., 2004). Por outro lado, em um estudo avaliando a ocorrência de bactérias diazotróficas nos mesmos genótipos de cana-de-açúcar ('SP70-1143' e 'Chunee'), mas por meio de métodos de isolamento dependentes de cultivo, Reis e colaboradores (1999) não encontraram diferenças quanto ao número de bactérias diazotróficas presentes em cada um dos genótipos, e, portanto, não foi possível explicar as diferenças encontradas quanto à contribuição da FBN para 'SP70-1143' e 'Chunee'. Esta divergência entre resultados deriva do método de isolamento dependente de cultivo e da quantificação das bactérias pela técnica do Número Mais Provável (NMP) (REIS et al., 1999) que incorpora um viés em relação a real composição de bactérias existentes, enquanto que no presente estudo por basear-se em técnicas independentes de cultivo ocorre o rastreamento de toda a comunidade bacteriana por meio da amplificação do gene 16S rRNA, limitando o viés de amostragem. A profundidade de sequenciamento por pela abordagem NGS permite a identificação de espécies presentes em baixo número, porém a técnica também apresenta restrições devido a variações na sequência de ancoramento dos iniciadores universais, limitação na eficiência de amplificação de genes, entre outros, ou inexistência de sequências de todas as espécies nos bancos de dados, limitando a identificação.

Figura 2.1 – Frequências relativas dos principais filos bacterianos encontrados em amostras cultivadas *in vitro* de cana-de-açúcar dos genótipos 'SP70-1143' e 'Chunee' inoculadas ou não com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* sob diferentes condições de presença de N. Plântulas foram cultivadas *in vitro* sob deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a bactéria ou não inoculadas por 48 h. Após esse período, as plantas passaram por tratamentos de presença de N (+N 0,2 mM de N total) por 72 h e 60 d. Não Inoc: plântulas que não foram inoculadas com *G. diazotrophicus*; Inoc 72 h: plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* submetidas a presença de N por 72 h; Inoc 60 d: plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* submetidas a presença de N por 60 d. Cada tratamento possui duas replicatas biológicas

Figura 2.2 – Análise de coordenadas principais (PCoA) baseada no número total de UTOs obtidas em amostras cultivadas *in vitro* de cana-de-açúcar dos genótipos ‘SP70-1143’ e ‘Chunnee’ inoculadas ou não com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* sob diferentes condições de presença de N. Plântulas foram cultivadas *in vitro* em deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a bactéria ou não inoculadas por 48 h. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de presença de N (+N 0,2 mM de N total) por 72 h e 60 d. Legenda - Não_Inoc: plântulas que não foram inoculadas com *G. diazotrophicus*; Inoc_72 h: plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* submetidas a presença de N por 72 h; Inoc_60 d: plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* submetidas a presença de N por 60 d. Cada tratamento possui duas replicatas biológicas

A inoculação artificial dos genótipos com a bactéria diazotrófica *G. diazotrophicus*, pertencente ao filo Proteobacteria, acarretou mudanças na participação relativa dos filos encontrados em relação às plantas não inoculadas. Após inoculação, as plântulas de ‘SP701143’ mantidas na presença de N por 72 h apresentaram um aumento de UTOs relacionados ao filo Firmicutes, o que causou uma diminuição da frequência relativa do filo Proteobacteria (Figura 2.1). Ao longo do tempo, no período de 60 d sob presença de N, as plântulas inoculadas apresentaram um aumento do filo Proteobacteria, e a redução da presença relativa do filo Actinobacteria (Figura 2.1). Para o genótipo ‘Chunnee’, a inoculação claramente aumentou o filo Proteobacteria após 72 h e 60 d sob presença de N, em detrimento da presença do filo Firmicutes (Figura 2.1). Porém, a análise da

comunidade bacteriana *in vitro* do genótipo ‘Chunee’ apresenta um viés em relação à amostragem, uma vez que foi amostrada a planta inteira e não foi feita a assepsia das raízes coletadas das plântulas *in vitro*, assim bactérias não endofíticas poderiam ter sido levadas para o sequenciamento. Além disso, o genótipo ‘Chunee’ apresenta raízes densas e com a presença de maior viscosidade, fato esse que pode ter influenciado nos resultados, com aumento do número de UTOs do filo Proteobacteria, ao qual pertence o inóculo artificial *G. diazotrophicus* nesse genótipo ao ser inoculado.

Em uma análise conjunta, a afiliação das sequências em nível taxômico de família, revelou como mais abundantes as famílias Microbacteriaceae (média de 49,0%) do filo Actinobacteria; Paenibacillaceae (13,4%) do filo Firmicutes; Methylobacteriaceae (11,9%), Acetobacteraceae (10,4%) e Sphingomonadaceae (6,0%) do filo Proteobacteria (Tabela 2.2). A bactéria *G. diazotrophicus* utilizada para a inoculação artificial dos experimentos pertence à família Acetobacteraceae, e a presença deste grupo foi inconstante entre as diversas condições analisadas. Quando as plântulas não foram inoculadas, esta família apresentou baixa representatividade (0,1% em plantas de ‘SP70-1143’ e 0% em ‘Chunee’), ao passo que as plantas inoculadas após 72 h na presença de N, apresentaram a maior abundância dessa família (14,3% em ‘SP70-1143’ e 38,1% em ‘Chunee’), e após 60 d sob presença de N, a abundância foi menor que o apresentado em 72 h sob presença de N (0,2% em ‘SP70-1143’ e 9,4% em ‘Chunee’) (Tabela 2.2).

Estes resultados demonstram que a permanência do inóculo artificial após 60 d é mínima nas plântulas de ‘SP70-1143’, e para o genótipo ‘Chunee’ também foi reduzida em relação a 72 h, e a maior abundância relativa pode estar relacionada às bactérias que permaneceram aderidas a raiz deste genótipo, não representando, portanto, o número real de bactérias que conseguiram se estabelecer na plântula.

Uma comparação entre os resultados aqui encontrados sobre a comunidade bacteriana que coloniza plântulas de cana-de-açúcar *in vitro* em relação a comunidade bacteriana encontrada em rizosfera de cana-de-açúcar cultivadas em campo mostrou que a afiliação taxonômica dos filos encontrados nas plântulas *in vitro* é composta pelos principais filos encontrados em campo, como Proteobacteria (29,6%), Acidobacteria (23,4%) e Firmicutes (10,2%) e Actinobacteria (5,6%) (PISA et al., 2011). Ao analisar níveis taxonômicos mais baixos, foram encontradas diferenças entre as principais famílias que compõe o perfil bacteriano de plantas

mantidas *in vitro*, sendo elas Microbacteriaceae e Paenibacillaceae, e o perfil daquelas do campo, tendo como principais famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae (MAGNANI et al., 2010; 2013).

Tabela 2.2 – Porcentagem de abundância das principais famílias encontradas em plântulas *in vitro* de cana-de-açúcar dos genótipos ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ inoculadas ou não com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* sob diferentes condições de presença de N. N I: plântulas que não foram inoculadas com *G. diazotrophicus*; I 72 h: plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* submetidas a presença de N por 72 h; I 60 d: plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* submetidas a presença de N por 60 d

	SP70-1143			Chunee			Total (%)
	N I	I 72 h	I 60 d	N I	I 72 h	I 60 d	
Acetobacteraceae	0,1	14,3	0,2	0,0	38,1	9,4	10,4
Methylobacteriaceae	30,2	8,3	20,2	0,8	0,2	11,7	11,9
Microbacteriaceae	53,8	51,3	33,6	52,9	54,2	48,3	49,0
Paenibacillaceae	1,5	11,7	17,4	33,1	4,0	17,6	13,4
Sphingomonadaceae	4,9	5,1	19,6	0,2	0,1	1,3	6,0
Outros	5,1	4,4	3,6	0,5	0,4	5,6	3,2
Não classificados	4,1	4,7	5,2	12,3	2,9	5,9	5,8

Além da afiliação taxonômica, foi conduzida a análise de alfa diversidade (corresponde ao número de diferentes espécies e a proporção em que estas espécies ocorrem em determinado habitat ou comunidade) estimada pelo índice de Chao1. A riqueza de UTOs (índice de Chao1) foi maior nas plântulas do genótipo ‘SP70-1143’ em relação às de ‘Chunee’, exceto quando ‘Chunee’ estava inoculada com a bactéria diazotrófica sob presença de N por 60 d (Tabela 2.3). Dentre os tratamentos de ‘SP70-1143’, o não inoculado apresentou o menor valor (10049,78; Tabela 2.3), enquanto que as plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica sob presença de N por 72 h tiveram o maior valor (13950,49; Tabela 2.3). Possivelmente, o aumento da diversidade mostrado pelo índice de Chao1 em ‘SP70-1143’ se deve a inoculação após 72 h, porém ao longo do tempo (60 d) há novamente um equilíbrio entre as comunidades bacterianas. Para o genótipo ‘Chunee’ o maior valor do índice de Chao1 foi encontrado aos 60 d sob suficiência de N. Porém, isso não significa que a bactéria conseguiu se estabelecer nesse genótipo, uma vez que as raízes eram mais densas e apresentavam viscosidade, e provavelmente amostraram mais

bactérias que podiam nem estar associadas às plantas. Com relação à diversidade filogenética, encontramos o mesmo perfil encontrado para o índice de Chao1, uma vez que as plântulas de ‘SP70-1143’ inoculadas com a bactéria diazotrófica sob presença de N por 72 h e as plântulas de ‘Chunee’ também inoculadas sob presença de N por 60 d, apresentaram maior diversidade filogenética do que as demais plântulas em seus respectivos tratamentos (Tabela 2.3). Portanto, esses resultados sugerem que a inoculação artificial, além de alterar a composição bacteriana, afetou os valores de alfa diversidade em cana-de-açúcar cultivada *in vitro*.

Tabela 2.3 – Valores médios de riqueza de UTOs (Chao1) e diversidade filogenética (*P.D. whole tree*) em plântulas *in vitro* de cana-de-açúcar dos genótipos ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ inoculadas ou não com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* sob diferentes condições de presença de N. N I: plântulas que não foram inoculadas com *G. diazotrophicus*; I 72 h: plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* submetidas a presença de N por 72 h; I 60 d: plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* submetidas a presença de N por 60 d. As letras representam diferenças nas comparações das médias pelo teste de Tukey, a uma significância de 5% ($p < 0,05$)

Tratamentos		Chao 1	Diversidade filogenética
		Média	Média
SP-701143	Não Inoculado	10049,78 ^{bc}	123,04 ^{bc}
	Inoculado 72 h	13950,49 ^a	167,06 ^a
	Inoculado 60 d	11361,75 ^{ab}	148,93 ^{ab}
Chunee	Não Inoculado	6929,45 ^{cd}	90,08 ^c
	Inoculado 72 h	6081,04 ^d	87,29 ^c
	Inoculado 60 d	13634,24 ^a	166,78 ^a

Em resumo, plântulas cultivadas *in vitro* dos genótipos ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ apresentam uma comunidade bacteriana composta pelos filos Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes. Existe diferença varietal na composição da comunidade de bactérias, a qual é afetada pela inoculação artificial com a bactéria *G. diazotrophicus*. Essa diferença varietal na composição da comunidade bacteriana poderia explicar a diferença entre os valores de FBN encontrados para esses genótipos. Plantas de ‘SP70-1143’ são mais responsáveis a FBN (URQUIAGA

et al., 1992) e apresentam maior número do filo Proteobacteria, enquanto ‘Chunee’, o genótipo menos responsável (URQUIAGA et al., 1992), apresenta um número reduzido desse filo.

2.3.2 Estrutura e composição da comunidade bacteriana em cana-de-açúcar cultivada em campo com base em DGGE do gene 16S rRNA

2.3.2.1 Análise da estrutura da comunidade bacteriana em campo

Para avaliar as diferenças na estrutura da comunidade bacteriana presente na variedade ‘IAC86-3396’ cultivada em campo sob diversos tratamentos após a inoculação com a mistura das cinco bactérias diazotróficas, foram conduzidas análises do gene 16S rRNA (Figura 2.3) e do gene *nifH* por DGGE. Perfis reprodutíveis de DGGE foram gerados a partir do gene de 16S rRNA amplificados de amostras de folhas de cana-de-açúcar utilizando iniciadores bacterianos específicos (Figura 2.3), porém os perfis de DGGE para o gene *nifH* tiveram pouca reprodutibilidade entre os géis (dados não mostrados) e foram descartados das análises. Os perfis de DGGE do gene 16S amplificado das cinco bactérias diazotróficas (*G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*) não permitiu identificá-los claramente nas amostras coletadas, o que limitou seu uso como controles positivos.

Os perfis de DGGE de amplificações do gene 16S rRNA das comunidades bacterianas associadas às folhas produziram entre 11 e 17 bandas detectáveis. Os géis foram obtidos a partir de amostras em triplicata biológica, com pelo menos duas replicatas técnicas (Figura 2.3). De maneira geral, não se detectaram diferenças para o padrão de bandas obtidos a partir de amostras de folhas +1 e +3 entre os tratamentos inoculado e não inoculado (Figura 2.3). Porém, ao se comparar o padrão de bandas relacionado ao tratamento com ou sem nitrogênio, é possível notar diferenças no perfil de bandas gerado.

Figura 2.3 - Perfil de análise de produtos de amplificação do gene 16S rRNA de bactérias por DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) obtidas de amostras de plantas de 'IAC87-3396' submetida à inoculação ou não com bactérias diazotróficas sem adubação ou com adubação de N (100 kg N ha^{-1}). Comunidades associadas à folha (+1 e +3); ON Folha +1: folha +1 sem fertilização (0 kg N ha^{-1}); ON Folha +3: folha +3 sem fertilização (0 kg N ha^{-1}); ON + I Folha +1: folha +1 sem fertilização (0 kg N ha^{-1}) com inoculação; ON + I Folha +3: folha +3 sem fertilização (0 kg N ha^{-1}) com inoculação; 100N Folha +1: folha +1 com fertilização (100 kg N ha^{-1}); 100N Folha +3: folha +3 com fertilização (100 kg N ha^{-1}); 100N + I Folha +1: folha +1 com fertilização (100 kg N ha^{-1}) e inoculação; 100N + I Folha +3: folha +3 com fertilização (100 kg N ha^{-1}) e inoculação; M - marcador DGGE

A análise multivariada de componente principais baseada na matriz de abundância foi conduzida usando o *software* Canoco. Quando os resultados foram expostos em gráfico nas duas primeiras dimensões, representando 34 e 12,9% da variação encontrada, é possível distinguir a formação de grupos dos tratamentos das amostras fertilizadas com N no quadrante superior esquerdo, enquanto as não fertilizadas foram localizadas no quadrante superior direito (Figura 2.4). Em relação aos tratamentos inoculados e não inoculados, não é possível separá-los claramente

devido a grande sobreposição dos pontos nas duas dimensões indicadas (Figura 2.4).

Portanto, a análise do perfil de amplificação do gene 16S rRNA derivadas dos perfis de DGGE indicaram efeito da fertilização com N sobre a estrutura das comunidades bacterianas no tecido foliar, particularmente na folha +1 (Figura 2.4). Por outro lado, a análise sobre o efeito da inoculação não foi significativa entre os dois tipos de folhas amostradas (+1 e +3) e sob fertilização (100N) ou não (0N), sugerindo assim que: i) a comunidade bacteriana existente na cana-de-açúcar poderia estar bem estabelecida, tornando a inoculação com novos microrganismos ineficiente no prazo analisado (três anos após o plantio); ii) a associação com o inóculo artificial ocorre, porém, não interfere na estrutura da comunidade já existente no longo prazo. Portanto, o único tratamento que alterou a estrutura da comunidade bacteriana foi a fertilização com N, que formou dois *clusters* distintos para o tecido foliar (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Agrupamento por análise de componentes principais (PCA) dos dados de DGGE do gene 16S rRNA amplificado a partir de amostras de folha da comunidade bacteriana total. Os valores indicam a porcentagem de variância dos dados explicada em cada um dos eixos. Agrupamento das amostras de folha; 0N +1: folha +1 sem fertilização (0 kg N ha^{-1}); 0N +3: folha +3 sem fertilização (0 kg N ha^{-1}); 0N + I +1: folha +1 sem fertilização (0 kg N ha^{-1}) com inoculação; 0N + I +3: folha +3 sem fertilização (0 kg N ha^{-1}) com inoculação; 100N +1: folha +1 com fertilização (100 kg N ha^{-1}); 100N +3: folha +3 com fertilização (100 kg N ha^{-1}); 100N + I +1: folha +1 com fertilização (100 kg N ha^{-1}) e inoculação; 100N + I +3: folha +3 com fertilização (100 kg N ha^{-1}) e inoculação

2.3.2.2 Análise da composição da comunidade bacteriana em campo por sequenciamento em larga escala do gene 16S rRNA

Plantas da variedade 'IAC87-3396' foram inoculadas ou não com as bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) e submetidas a tratamentos sem adubação (0 kg N ha^{-1}) ou com adubação de nitrogênio (100 kg N ha^{-1}). A análise dos principais grupos taxonômicos que compõe a comunidade bacteriana das folhas de cana-de-açúcar 'IAC87-3396' cultivada em campo foi feita para investigar se a inoculação artificial com a mistura das bactérias diazotróficas ou a fertilização com N alteraria o perfil taxonômico qualitativo e quantitativo das bactérias existentes nessas plantas. As bibliotecas resultaram dos

produtos de amplificação do gene 16S rRNA obtidos a partir do *pool* de folhas +1 e +3 de quatro tratamentos [(1) sem adubação e sem inoculação (0N); 2) sem adubação e com inoculação (0N+I); 3) com adubação e sem inoculação (100N); 4) com adubação e com inoculação (100N+I)], coletadas de três plantas, resultando em 12 bibliotecas que foram sequenciadas. Para isso, foi utilizado o sequenciamento em larga escala pela plataforma MiSeq System (Illumina), resultando num total de 2.094.069 sequências, alocadas em 293.134 UTOs determinadas em nível superior de 97% de identidade.

Primeiro, a composição geral da comunidade bacteriana (todos os tratamentos) foi caracterizada pela classificação taxonômica das sequências de cada uma destas UTOs, na qual foram encontradas sequências afiliadas a nove filos bacterianos. A maior proporção da comunidade pertence ao filo Proteobacteria (75,9%) e ao filo Actinobacteria (12,7%). As demais sequências foram atribuídas aos filos Firmicutes (2,2%), Acidobacteria (1,2%), Cyanobacteria (0,5%), Bacterioides (0,4%), Thermi (0,3%), Chlamydiae (0,1%), Chloroflexi (0,1%), enquanto as bactérias não classificadas perfizeram um total de 6,7%. O filo Proteobacteria é reconhecidamente o grupo de bactérias mais associado às plantas (PRAKAMHANG et al., 2009). A avaliação da comunidade bacteriana da rizosfera de cana-de-açúcar por meio de método independente de cultivo (biblioteca de clones do gene 16S rRNA) sob condições distintas de fertilização com nitrogênio (sem adubação ou 120 kg N ha⁻¹) obteve como filos mais abundantes o Proteobacteria (29,6%), Acidobacteria (23,4%), Bacteroidetes (12,1%), Firmicutes (10,2%) e Actinobacteria (5,6%) (PISA et al., 2011). Uma das razões para as diferenças encontradas sobre as proporções entre os principais filos do nosso trabalho e os relatados por Pisa e colaboradores (2011) pode ser devido ao tipo de método independente de cultivo utilizado para acessar a comunidade bacteriana e também devido a diferença varietal.

Além da descrição dos grupos mais abundantes na análise conjunta de todos os tratamentos, a afiliação taxonômica permitiu observar que poucas diferenças em nível de filo foram encontradas entre os tratamentos. O filo Proteobacteria foi o mais abundante em todos os tratamentos, seguido pelo Actinobacteria (Figura 2.5). A exceção foi o filo Acidobacteria, cuja prevalência nas amostras fertilizadas com N (100N e 100N+I) foi aproximadamente de 0,2%, e aumentou para 2,2% nas plantas que não foram fertilizadas (0N e 0N+I) (Figura 2.5), sugerindo que a fertilização

nitrogenada ($100 \text{ kg de N ha}^{-1}$) reduziu a abundância do filo Acidobacteria em cana-de-açúcar. Esses resultados estão de acordo com estudo da comunidade bacteriana da rizosfera de cana-de-açúcar que encontrou o filo Proteobacteria como o mais prevalente nos tratamentos fertilizados ou não com N, enquanto o filo Acidobacteria foi o predominante em amostras de solo não fertilizado (PISA et al., 2011).

Figura 2.5 – Frequências relativas dos principais filos bacterianos encontrados em amostras de plantas de 'IAC87-3396' submetidas à inoculação ou não com bactérias diazotróficas sem adubação ou com adubação de N (100 kg N ha^{-1}). 0N: plantas não inoculadas e não fertilizadas (0 kg N ha^{-1}); 0N+: plantas não fertilizadas (0 kg N ha^{-1}) com inoculação; 100N: plantas com fertilização (100 kg N ha^{-1}); 100N+: plantas com fertilização (100 kg N ha^{-1}) e inoculação. Cada tratamento possui três replicatas biológicas

De modo geral, ao analisar níveis taxonômicos inferiores a Filo, como família, observou-se que 47,2% das sequências pertenciam a Xanthomonadaceae, e as outras famílias mais expressivas foram Microbacteriaceae (6,5%), Cystobacterineae (5,3%), Sphingomonadaceae (4,2%), Moraxellaceae (4,0%), Methylobacteriaceae (3,4%), Pseudomonadaceae (2,0%) e Enterobacteriaceae (1,9%) (Figura 2.6). A maioria das bactérias endofíticas isoladas de colmos e folhas da cana-de-açúcar, determinadas por sequenciamento do gene 16S rRNA, e dependentes de cultivo em meio, pertencem às famílias Enterobacteriaceae (14 isolados) e Pseudomonadaceae

(14 isolados) (MAGNANI et al., 2010; 2013). A discrepância encontrada provavelmente é intrínseca das abordagens utilizadas (dependente de cultivo), como também dependente da variedade estudada e das variações geográficas e ambientais (TAULÉ et al., 2012).

A análise da afiliação taxonômica em nível de família entre os tratamentos revelou uma maior diversidade na comunidade bacteriana associada às plantas que não receberam adubação nitrogenada (0N e 0N+I) em relação às plantas que receberam fertilização de N (100N e 100N+I) (Figura 2.6). Em contraste com esse resultado, foi encontrada uma maior diversidade de famílias de bactérias associada à rizosfera de cana-de-açúcar que recebeu adubação nitrogenada (120 kg ha⁻¹ de N) em relação às plantas que não foram adubadas (0 kg ha⁻¹ de N) (PISA et al., 2011).

Figura 2.6 – Frequências relativas das principais famílias bacterianas encontrados em amostras de plantas de 'IAC87-3396' submetidas à inoculação ou não com bactérias diazotróficas sem adubação ou com adubação de N (100 kg N ha⁻¹). 0N: plantas não inoculadas e não fertilizadas (0 kg N ha⁻¹); 0N+I: plantas não fertilizadas (0 kg N ha⁻¹) com inoculação; 100N: plantas com fertilização (100 kg N ha⁻¹); 100N+I: plantas com fertilização (100 kg N ha⁻¹) e inoculação. Cada tratamento possui três replicatas biológicas

A grande abundância da família Xanthomonadaceae (64,9%) nas amostras de cana-de-açúcar que estavam sob fertilização de N levantou alguns questionamentos. Como se sabe, há patógenos em cana de açúcar pertencentes a família Xanthomonadaceae, como o patógeno *Xanthomonas albilineans* que causa a doença 'escaldadura das folhas' e *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*, agente causal da doença 'gomose' (PIERETTI et al., 2015; MANTOVANI et al., 2006). As plantas de 'IAC87-3396' utilizadas nos experimentos deste trabalho não apresentavam nenhum sintoma, porém há a ocorrência de infecções latentes sem sintomas visíveis (TARDIANI et al., 2014). Entretanto, quando sequências específicas do patógeno foram procuradas, a afiliação taxonômica não revelou nenhuma referente ao gênero *Xanthomonas* nos tratamentos, sendo uma grande parte pertencente ao gênero *Pseudoxanthomonas* (34,2%), próximo filogeneticamente ao gênero *Xanthomonas*. De forma a avaliar se o efeito da fertilização afetando a diversidade da comunidade bacteriana nas plantas de cana-de-açúcar não era devido a esse viés, novas análises da comunidade bacteriana foram conduzidas, excluindo-se o gênero *Pseudoxanthomonas*. As análises não apresentaram resultados distintos dos aqui relatado no que se refere ao efeito da fertilização de N reduzindo a diversidade (dados não mostrados).

A análise dos tratamentos por Análise das Coordenadas Principais corroborou o efeito da fertilização de N sobre a comunidade bacteriana (Figura 2.7). Por outro lado, o tratamento de inoculação não demonstrou afetar a classificação das bactérias associadas à cana-de-açúcar. A análise da estrutura da comunidade bacteriana por meio dos perfis de DGGE demonstrou resultado similar, indicando que o fator fertilização influencia a diferença das comunidades no tecido foliar. Pelos resultados do *PCoA* é possível observar uma tendência na formação de grupos dos tratamentos das amostras fertilizadas com N no quadrante inferior direito, enquanto as não fertilizadas foram localizadas no quadrante superior e inferior esquerdo (Figura 2.7).

Yeoh e colaboradores (2015) investigaram o efeito da aplicação de fertilizantes nitrogenados na comunidade bacteriana, baseado no sequenciamento do gene 16s rRNA no solo e em raízes de cana-de-açúcar submetidas à baixa (40 kg N ha⁻¹) e alta fertilização de N (160-180 kg N ha⁻¹), e ainda, avaliaram se a população das bactérias diazotróficas associadas à raiz seria maior em resposta a

entradas reduzidas de N (40 kg N ha^{-1}). A menor dose de aplicação de fertilizantes nitrogenados apresentou pouco efeito sobre a diversidade da comunidade bacteriana, e não aumentou a abundância relativa das bactérias diazotróficas (YEOH et al., 2015). Os dados deste trabalho mostraram que a fertilização com N afetou a comunidade bacteriana em cana-de-açúcar, reduzindo o número de táxons em relação às plantas que não foram fertilizadas. Houve uma discrepância entre os resultados aqui obtidos que pode ser devido a diferenças entre as variedades de cana-de-açúcar e, também, ao tipo de solo. Além disso, a história da produção de cana-de-açúcar australiana ocorreu diferentemente do processo no Brasil, e é possível que a dependência contínua da aplicação de altas doses de fertilizantes nitrogenados na Austrália tenha condicionado as comunidades microbianas do solo e das raízes para altos teores de nitrogênio (YEOH et al., 2015).

Figura 2.7 – Análise de coordenadas principais (PCoA) baseada no número total de UTOs obtidas em amostras de plantas de 'IAC87-3396' submetidas à inoculação ou não com bactérias diazotróficas sem adubação ou com adubação de N (100 kg N ha^{-1}). 0N: plantas não inoculadas e não fertilizadas (0 kg N ha^{-1}); 0N+I: plantas não fertilizadas (0 kg N ha^{-1}) com inoculação; 100N: plantas com fertilização (100 kg N ha^{-1}); 100N+I: plantas com fertilização (100 kg N ha^{-1}) e inoculação. Cada tratamento possui três replicatas biológicas

Foi conduzida análise de diversidade baseada nas sequências de 16S rRNA obtidas pelo sequenciamento empregando o índice de Chao 1 e diversidade filogenética (Tabela 2.4). Apesar de haver uma tendência clara dos tratamentos que receberam fertilização nitrogenada apresentarem menor diversidade tanto avaliada pela riqueza de UTOs (Chao1), quanto pela diversidade filogenética, não houve diferenças significativas entre os tratamentos. A falta de poder estatístico para detectar significância deve derivar da heterogeneidade entre valores obtidos para as triplicatas de cada tratamento. Mas, os valores médios de riqueza e de diversidade indicam um claro decréscimo para os tratamentos sob fertilização (100 kg N ha^{-1}) em relação ao controle não fertilizado (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 – Valores médios de riqueza de UTOs (Chao1) e diversidade filogenética (*P.D. whole tree*) em plantas de 'IAC87-3396' submetidas à inoculação ou não com bactérias diazotróficas sem adubação ou com adubação de N (100 kg N ha^{-1}). 0N: plantas não inoculadas e não fertilizadas (0 kg N ha^{-1}); 0N+I: plantas não fertilizadas (0 kg N ha^{-1}) com inoculação; 100N: plantas com fertilização (100 kg N ha^{-1}); 100N+I: plantas com fertilização (100 kg N ha^{-1}) e inoculação. As letras representam diferenças nas comparações das médias pelo teste de Tukey, a uma significância de 5% ($p < 0,05$)

Tratamentos		Chao1	Diversidade filogenética
		Média	Média
IAC87-3396	0N	131.858,8 ^a	1131,0 ^a
	0N+I	115.126,8 ^a	983,9 ^a
	100N	65.848,1 ^a	581,6 ^a
	100N+I	37.271,3 ^a	381,5 ^a

De forma a identificar a recuperação de sequências das estirpes das bactérias diazotróficas usadas nos inóculos artificiais foi conduzida análise pelo software STAMP. Sabe-se que a prevalência das bactérias diazotróficas é baixa em relação à comunidade bacteriana (SUMAN et al., 2001). Estudos envolvendo bactérias endofíticas isoladas de várias variedades de cana-de-açúcar, baseado em métodos dependentes de cultivo, mostraram que as frequências relativas das bactérias diazotróficas variaram de 0,02 a 3,86% do total da comunidade bacteriana recuperada, dependendo da cultivar (SUMAN et al., 2001). Por meio da atividade da nitrogenase e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, foi estimado que

bactérias diazotróficas perfazem apenas 10% dos isolados de endofíticas, não tendo sido detectadas espécies diazotróficas endofíticas, como *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp. e *Azospirillum* spp., normalmente associadas a cana-de-açúcar (MAGNANI et al., 2010). No presente estudo, detectou-se a presença dos gêneros *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* nos tratamentos inoculados e não inoculados, com frequências relativas distintas (Figura 2.8), e somente o gênero *Azospirillum* spp. não foi encontrado em nenhum dos tratamentos analisados.

Houve diferença entre os tratamentos de inoculação e fertilização nitrogenada quanto ao número de sequências relativas a cada gênero de diazotrófica. Em relação à fertilização com N, foi resgatado um maior número médio de sequências dos gêneros *Burkholderia* e *Gluconacetobacter* nos tratamentos não fertilizados com N (5.000 e 900 sequências, respectivamente; Figura 2.8). Por outro lado, para o gênero *Herbaspirillum* foi encontrada maior média de sequências quando as plantas estavam sob fertilização de N (1.300 sequências; Figura 2.8). De modo geral, as plantas que foram inoculadas com as cinco espécies de bactérias diazotróficas (*G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*) apresentaram maiores valores médios de identificação dos gêneros. Os gêneros *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* apresentaram as maiores médias de sequências relacionadas quando as plantas foram inoculadas com a mistura das cinco bactérias, independente da fertilização (700 e 1.300 sequências, respectivamente; Figura 2.8). Já para o gênero *Burkholderia*, a maior média foi encontrada para o tratamento não fertilizado (4.000 sequências; Figura 2.8). Portanto, a inoculação artificial foi efetiva para alguns dos gêneros estudados, sendo que houve a recuperação desses inóculos.

O levantamento da ocorrência de bactérias diazotróficas associadas aos genótipos 'Krakatau', 'CB45-3', 'SP70-1143' e 'Chunee' de cana-de-açúcar, mostraram a presença das bactérias *Azospirillum brasilense*, *A. amazonense*, *Herbaspirillum* spp. e *G. diazotrophicus* em raízes, colmos e folhas dos quatro genótipos, com exceção da *A. amazonense* que não foi isolado de folhas (REIS JUNIOR et al., 2000), o que corrobora o nosso estudo onde não se encontrou sequências relacionadas ao gênero *Azospirillum* em folhas de cana-de-açúcar. A comunidade diazotrófica em cana-de-açúcar na variedade 'RB867515' inoculada no plantio com o inoculante comercial da Embrapa (*A. amazonense*; *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *B. tropica*), e com a inoculação repetida a

cada ano após a colheita, detectou por meio de transcritos de 16S rRNA e *nifH*, somente transcritos de *G. diazotrophicus* e *B. tropica* seis meses após a última inoculação (FISCHER et al., 2011). As outras bactérias podem ter colonizado as plantas apenas transitoriamente, mas não foram capazes de manter um nível persistente de colonização, porque teriam sido superadas pelas demais (FISCHER et al., 2011).

Baseado nestes estudos e nos dados aqui relatados, pode-se sugerir que os inoculantes podem ser apenas uma parte muito pequena da comunidade bacteriana no momento da amostragem (FISCHER et al., 2011), além de apresentar diferenças quanto a capacidade competitiva.

Ainda há muitos questionamentos sobre a inoculação artificial em cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas, sua permanência e eficiência durante o ciclo de vida da cultura; aparentemente não há um enriquecimento das espécies inoculadas de diazotróficas levando a hipótese de que essas bactérias não estariam fazendo FBN. Consequentemente, o conhecimento da comunidade bacteriana associada à cana-de-açúcar faz-se necessário para a compreensão de como os microrganismos influenciam a produtividade das culturas.

Figura 2.8 – Número de seqüências dos gêneros relativos ao inoculante comercial da Embrapa que foram encontrados em amostras de plantas de 'IAC87-3396' submetidas à inoculação ou não com bactérias diazotróficas sem adubação ou com adubação de N (100 kg N ha^{-1}). ON: plantas não inoculadas e não fertilizadas (0 kg N ha^{-1}); ON+I: plantas não fertilizadas (0 kg N ha^{-1}) com inoculação; 100N: plantas com fertilização (100 kg N ha^{-1}); 100N+I: plantas com fertilização (100 kg N ha^{-1}) e inoculação

2.4 Conclusões

Há uma comunidade bacteriana associada a plântulas de cana-de-açúcar de 'SP70-1143' e 'Chunee' mantidas em condições *in vitro*. Os genótipos apresentaram diferenças na composição dessa comunidade de bactérias, a qual foi afetada pela inoculação artificial com a bactéria *G. diazotrophicus*. Há diferença varietal poderia explicar a baixa capacidade do genótipo 'Chunee' para a FBN.

Plantas de cana-de-açúcar de 'IAC87-3396' cultivadas em campo sob diferentes regimes de fertilização, sendo inoculadas ou não com uma mistura de bactérias diazotróficas, revelou uma comunidade bacteriana que foi alterada pela fertilização de N. A inoculação com as bactérias diazotróficas mostrou a recuperação dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, indicando que o

sequenciamento massivo do gene 16S rRNA pode ser uma alternativa para o melhor estudo da comunidade bacteriana e dos inoculantes artificiais utilizados em cana-de-açúcar.

Referências

- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 36, p. 86–93, 1986.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of *Pseudomonas rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb nov; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 46, n. 3, p. 802–810, 1996.
- BRONDANI, G.E.; de WIT ONDAS, H.W.; BACCARIN, F.J.B.; GONÇALVES, A.N.; de ALMEIDA, M. Micropropagation of *Eucalyptus benthamii* to form a clonal micro-garden. **In Vitro Cellular Developmental Biology - Plant**, Wallingford, v. 48, p. 478–487, 2012.
- BRONS, J.K.; van ELSAS, J.D. Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 2717–2727, 2008.
- CANUTO, E.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 62–64, 2003.
- CAPORASO JG; KUCZYNSKI J; STOMBAUGH J; BITTINGER K; BUSHMAN FD; COSTELLO EK; FIERER N; PEÑA AG; GOODRICH JK; GORDON JI; HUTTLEY GA; KELLEY ST; KNIGHTS D; KOENIG JE; LEY RE; LOZUPONE CA; MCDONALD D; MUEGGE BD; PIRRUNG M; REEDER J; SEVINSKY JR; TURNBAUGH PJ; WALTERS WA; WIDMANN J; YATSUNENKO T; ZANEVELD J; KNIGHT R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, London, v. 7, n. 5, p. 335–6, 2010.
- CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, p. 23–31. 1988.
- CHELIUS MK, TRIPLETT EW. The diversity of Archaea and Bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, p. 252–263, 2001.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Review in Plant Sciences**, London, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOURADO-NETO, D.; POWLSON, D.; ABU BAKAR, R.; BACCHI, O.O.S.; BASANTA, M.V.; THI CONG, P.; KEERTHISINGHE, G.; ISMAILI, M.; RAHMAN, S.M.; REICHARDT, K.; SAFWAT, M.S.A.; SANGAKKARA, R.; TIMM, L.C.; WANG, J.Y.; ZAGAL, E.; van KESSEL, C. Multiseason recoveries of organic and inorganic nitrogen-15 in tropical cropping systems. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 74, p. 139-152, 2010.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v. 12, p. 13-15, 1990.

EMBRAPA AGROBIOLOGIA. **Estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação em cana-de-açúcar**. Disponível em:

<<https://www.embrapa.br/agrobiologia/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/550/estirpes-de-bacterias-fixadoras-de-nitrogenio-para-inoculacao-em-cana-de-acucar>>. Acesso em: 15 set. 2015.

FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAUJO, J.L.; REIS, V.M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTER, M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum sp.*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 356, p. 83-99, 2011.

FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, E.C.A.; TRIVELIN, P.C.O. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 29-41, 2011.

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

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; NASTARI, P.M.; LUCON, O.; Ethanol learning curve-the Brazilian experience. **Biomass Bioenergy**, Amsterdam, v. 26, p. 301-304, 2004.

GOMES, N.C.M.; HEUER, H.; SCHÖNFELD, J.; COSTA, R.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SMALLA, K. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 232, p. 167-180, 2001.

GRACIOLLI, L.A.; RUSCHEL, A.P. Microorganisms in the phyllosphere and rizosphere of sugarcane. In: VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P. (Ed.). **Associative N2-fixation**. Boca Raton: CRC Press, 1981. v. 2, p. 91-101.

HALLMANN J, QUADT-HALLMANN A, MAHAFFEE WF, KLOEPPER JW. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E.M.H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233–3241, 1997.

HOEFSLOOT G.; TERMORSHUIZEN A.J.; WATT D.A.; CRAMER M.D. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. **Plant and Soil**, The Hague, v. 277, p.85-96, 2005.

LIMA, E.; BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using on ^{15}N aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 165-170, 1987.

MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

MAGNANI, G.S.; CRUZ, L.M.; WEBER, H.; BESPALHOK, J.C.; DAROS, E.; BAURA, V.; YATES, M.G.; MONTEIRO, R.A.; FAORO, H.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Culture-independent analysis of endophytic bacterial communities associated with Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 4549-4558, 2013.

MANTOVANI, E.S.; MARINI, D.C.; GIGLIOTI, E.A. Gramíneas hospedeiras de *Xanthomonas* sp., agente causal da falsa estria vermelha da cana-de-açúcar. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 124-130, 2006.

MEDEIROS, A.F.A.; POLIDORO, J.C.; REIS, V.M. Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum spp.*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 279, p. 141-152, 2006.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; VADIVELU, M. Antagonistic potential of N_2 -fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotricum falcatum* went a causal organism of red-rot of sugarcane. **Current Science**, Bangalore, v. 78, n. 9, p. 193-198, 2000.

MUTHUKUMARASAMY, R.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C.; REVATHI, G. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 137-145, 2002.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N_2 -fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 59-61, 2003.

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

OLIVEIRA, A.L.M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 45, p. 106-113, 2009.

PERSELLO-CARTINEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 26, n. 2, p. 189-199, 2003.

PIERETTI I., PESIC A., PETRAS D., ROYER M., SÜSSMUTH R. D., COCIANCICH S. What makes *Xanthomonas albilineans* unique amongst xanthomonads? **Frontiers Plant Science**, Lausanne, v. 6: 289, 2015.

PRAKAMHANG, J.; MINAMISAW, K.; TEAMTAISON, K.; BOONKERD, N.; TEAUMROONG, N. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 42, p. 141-149, 2009.

PISA, G.; MAGNANI, G.S.; WEBER, H.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J.P.; PEDROSA, F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 12, p. 1215-1221, 2011.

POLY, F.; MONROZIER, L.J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, p. 95–103, 2001.

RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. (eds) **DNA markers: protocols, applications and overviews**. JohnWiley and Sons, NewYork, 1997. p. 151-171.

RAYMOND J, SIEFERT JL, STAPLES CR, BLANKENSHIP RE. The natural history of nitrogen fixation. **Molecular Biology and Evolution**, Cary, v. 21, p. 54154, 2004.

REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS JR, F.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 206, p. 205-211, 1999.

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

REIS, V.M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 6, p. 2155-2162, 2004.

RENNIE, R.J.; FREITAS, J.R.; RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugarcane (*Saccharum* sp.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 28, p. 462–467, 1982.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 4, e. 19045, 2011.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, p. 319-339, 1999.

SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 23, p. 7537-41, 2009.

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

SIMONET P, GROSJEAN M, ARVIND KM, NAZARET S, COURNOYER B, NORMAND P. *Frankia* genus-specific characterization by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 3278-3286, 1991.

SUMAN, A.; SHASANY, A.K.; SINGH, M.; SHAHI, H.N.; GAUR, A.; KHANUJA, S.P.S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, p. 39-45, 2001.

TARDIANI, A.C.; PERECIN, D.; PEIXOTO-JUNIOR, R.F.; SANGUINO, A.; LANDELL, M.M.G.; BERIAM, L.O.; NUNES, D.S.; CAMARGO, L.E.A.; CRESTE, S. Molecular and Pathogenic Diversity Among Brazilian Isolates of *Xanthomonas*

albilineans Assessed with SSR Marker Loci. **Plant Disease**, New York, v. 98, n. 4, p. 540- 546, 2014.

TAULÉ C, MAREQUE C, BARLOCCO C, HACKEMBRUCH F, REIS VM, SICARDI M, BATTISTONI F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, The Hague, v. 356, p. 35-49, 2012.

THOMAS, P. In vitro decline in plant cultures: detection of a legion of covert bacteria as the cause for degeneration of longterm micropropagated triploid watermelon cultures. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, The Hague, v. 77, p. 173–179, 2004.

THOMAS, P.; KUMARI, S. Inconspicuous endophytic bacteria mimicking latex exudates in shoot-tip cultures of papaya. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, p. 469–474, 2010.

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

YEOH, Y.K.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; DENNIS, P.G.; ROBINSON, N.; RAGAN, M.A.; SCHMIDT, S.; HUGENHOLTZ, P. The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application. **Environmental Microbiology**, Oxford, June 2015. doi: 10.1111/1462-2920.12925. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26032777>>. Acesso em: 13 nov. 2015.

ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M.; STEWARD, G.F. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 539–554, 2003.

3 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E MOLECULAR DO PROCESSO DE ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO NA INTERAÇÃO CANA-DE-AÇÚCAR x BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

Resumo

O uso de fertilizantes nitrogenados pela cultura da cana-de-açúcar no Brasil é relativamente baixo quando comparado a outros países produtores. Uma das razões para esse fato poderia ser, em parte, devido ao processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) pela ação de bactérias diazotróficas. Além da FBN, as plantas absorvem fontes de N, como amônio e nitrato, por meio de transportadores de membranas localizados nas raízes das plantas. Existem indícios de que a associação de plantas com microrganismos regula a expressão de genes de transportadores de N. Com isso, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o transporte de amônio e nitrato e avaliar a expressão gênica dos principais transportadores dessas fontes de N em dois genótipos contrastantes para FBN durante a associação com bactérias diazotróficas. Para tal, plântulas micropropagadas de 'SP70-1143' e 'Chunee' foram expostas a distintas condições de N numa série temporal, estando associadas ou não com uma bactéria ou uma mistura de bactérias diazotróficas. O estudo das fontes específicas de N nitrato e amônio, revelou que a interação entre cana-de-açúcar x *Gluconacetobacter diazotrophicus* induziu o acúmulo de transcritos do gene codificador do transportador de nitrato *ScNRT2.1*, o que levou a uma tendência no aumento no influxo de nitrato, e também no acúmulo de transcritos dos genes de transportadores de amônio *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3*, que desencadeou maiores valores de influxo de amônio em plantas de 'SP70-1143'. Outro estudo com a associação cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica* revelou que o transportador *ScAMT1.1* é possivelmente regulado durante a associação com as bactérias diazotróficas, resultando em maiores níveis de absorção de amônio em 'SP70-1143'. Por sua vez, em um ensaio por períodos prolongados (30 d) mostrou que a interação entre cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus* foi benéfica, já que a bactéria possivelmente induziu os genes dos transportadores de nitrato *ScNRT1.1* e *ScNRT2.1*, e do transportador de amônio *ScAMT1.1*, levando ao maior acúmulo de ¹⁵N-nitrato de amônio nas plantas de 'SP70-1143'. De modo geral, os ensaios de absorção de N aliados ao perfil de expressão gênica das proteínas transportadoras de N indicaram que a associação de *G. diazotrophicus* ou de uma mistura de bactérias diazotróficas e cana-de-açúcar desencadeou maiores níveis de expressão dos principais transportadores de N em cana-de-açúcar, o que resultou em maiores níveis de absorção de N em plantas inoculadas com as bactérias diazotróficas.

Palavras-chave: Cinética de absorção de N; Transportadores de membrana; *AMTs*; *NRTs*; Interação planta-microrganismo

Abstract

The use of nitrogen fertilizers by sugarcane cultivation in Brazil is relatively low compared to other producing countries. One reason for this could be partly due to biological nitrogen fixation (BNF) by diazotrophic bacterial. In addition, plants acquire nitrogen sources, such as ammonium and nitrate, by membrane transporters in the

roots. There are indications that the association of plants with microorganisms regulate these transporters. This study was carried out to analyze ammonium and nitrate uptake, and the expression profile of genes encoding for ammonium or nitrate transporters in association with diazotrophic bacteria. Micropropagated plants of 'SP70-1143' and 'Chunee', contrasting to the ability to FBN, were exposed to various conditions of N, at different times, in association or not with a bacterium or mixture of bacteria. The nitrogen sources nitrate and ammonium showed that the interaction between sugarcane x *Gluconacetobacter diazotrophicus* triggered the increase in transcript accumulation of the nitrate transporter gene *ScNRT2.1*, which leads to a trend to increase nitrate influx rate, and an increase in ammonium transporters genes, *ScAMT1.1* and *ScAMT1.3* transcripts, which increased the ammonium uptake rate in 'SP70-1143'. Sugarcane associated with *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* and *Burkholderia tropica* revealed that *ScAMT1.1* is possibly regulated during the association with the diazotrophs, leading to a higher ammonium influx in 'SP70-1143'. Moreover, for longer periods (30 days), the interaction between sugarcane x *G. diazotrophicus* was beneficial, since the bacteria possibly increased the transcription of *ScNRT2.1*, *ScNRT1.1* and *ScAMT1.1*, resulting in a greater accumulation of ¹⁵N-ammonium nitrate in 'SP70-1143' plants. Overall, N uptake assays combined with gene expression profiles indicated that the sugarcane association with *G. diazotrophicus* or a mixture of nitrogen fixing bacteria triggered gene expression of the main N transporter genes in sugarcane, which resulted in larger nitrogen uptake levels in inoculated plants.

Keywords: N uptake; Membrane transporter; *AMTs*; *NRTs*; Plant-microorganism interaction

3.1 Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é um recurso primordial para a produção de biocombustíveis no Brasil por apresentar uma eficiente produção de biomassa (GOLDEMBERG et al., 2004). Com o objetivo de maximizar a produção dessa fonte de combustíveis renováveis, a fertilização com nitrogênio (N) nos plantios é uma prática necessária para atingir níveis satisfatórios de produtividade, a despeito da potencial contaminação do ambiente (SCHRÖDER et al., 2004; VITOUSEK et al., 2009). Nesse cenário, há, portanto, uma extensa preocupação em relação às perdas de nitrogênio (N) que podem causar efeitos deletérios ao ambiente por lixiviação ou emissão de N₂O, um relevante gás causador do efeito estufa (AUSTIN et al., 2013). Com isso, fica evidente a necessidade da obtenção de genótipos de cana-de-açúcar com maior capacidade para produção de biomassa e maior eficiência no aproveitamento de fertilizantes a base de N como uma alternativa importante para alcançar a produção sustentável e competitiva de bioetanol.

No Brasil, há indícios que o sucesso no cultivo de cana-de-açúcar pode se basear, em parte, devido ao processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), que

poderia representar até 60% do N acumulado em cultivares mais responsáveis à FBN pela ação de bactérias endofíticas (BALDANI et al., 2002). Em outras regiões, como África do Sul e Austrália, a importância da FBN não foi confirmada (BIGGS et al., 2002; HOEFSLOOT et al., 2005). As bactérias endofíticas diazotróficas investigadas pelo potencial de FBN em cana-de-açúcar no Brasil tem sido, principalmente *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp. (BALDANI et al., 1986; CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988; SUMAN et al., 2005) e *Azospirillum amazonense* (REIS JÚNIOR et al., 2000). A contribuição do processo de FBN observada em campo apresentou incrementos de até 30% de N total acumulado, quando as plantas foram inoculadas com diazotróficas durante o estágio de micropropagação vegetativa (BODDEY et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003).

Apesar do processo de fixação biológica de N₂ poder contribuir para o N total da planta, fontes inorgânicas de N, como amônio e nitrato são absorvidas pelo sistema radicular (MILLER et al., 2007; MARSCHNER, 2012). A família de genes codificadores de proteínas transportadoras responsáveis pela absorção de amônio, fonte preferencial de N para a maioria das plantas, é denominada de *AMMONIUM TRANSPORTERS* - *AMTs* (GAZZARRINI et al., 1999). O nitrato é a fonte de N inorgânico mais abundante na maioria dos solos cultivados, sendo transportado para dentro das células radiculares principalmente pela ação dos produtos da família de genes chamada *NITRATE TRANSPORTERS* - *NRTs* (CEREZO et al., 2001).

Há indicações do efeito da interação de microrganismos com plantas sobre genes codificadores dos transportadores de amônio. Em soja (*Glycine max*), o transportador de amônio *GmAMT4.1* responde localmente a presença de micorrizas arbusculares indicando o transporte direto de amônio em arbúsculos induzidos por micorrizas (KOBAYASHI et al., 2010). Em não-leguminosas, como o tomateiro, quando em associação com bactérias fixadoras de N₂, apresentam maior número de transcritos do transportador *LeAMT1.2* (BECKER et al., 2002).

Para os transportadores de nitrato, há evidências que estes possivelmente obedecem a sinais dependentes da interação planta x microrganismos. Plantas de tomateiro, quando inoculados com micorrizas arbusculares, apresentam alta expressão do gene codificador do transportador de nitrato *LeNRT2.3* (HILDEBRANDT et al., 2002). A promoção do crescimento dependente de uma sinalização de membros da família *NRT2* foi descrita durante a associação com a

rizobactéria *Phyllobacterium brassicacearum* e plantas de *Arabidopsis thaliana* (KECHID et al., 2013).

Apesar da importância da relação da absorção e transporte de N com a presença de microrganismos durante o desenvolvimento das plantas, informações sobre a possível regulação desses transportadores de membrana em cana-de-açúcar responsáveis pela aquisição de N inorgânico durante a interação com bactérias fixadoras de N₂ permanecem escassas. Sendo assim, o objetivo deste capítulo foi caracterizar o transporte de amônio e nitrato durante a associação de cana-de-açúcar com bactérias endofíticas diazotróficas produzidas comercialmente pela Embrapa, empregando estudos fisiológicos de aquisição de amônio e nitrato pela raiz e por análise quantitativa de transcritos reversos dos genes que codificam os principais transportadores de amônio e nitrato.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material vegetal e micropropagação

Plantas micropropagadas de ‘SP70-1143’, uma cultivar com alto potencial de FBN, e ‘Chunee’, um genótipo com baixo potencial de FBN (URQUIAGA et al., 1992) foram empregadas nos experimentos *in vitro*. As plantas de ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ foram obtidas por meio de cultura *in vitro* de ápices. Inicialmente, minitoletes retirados de plantas mantidas no banco de germoplasma do CENA/USP foram esterilizados em solução 20% de hipoclorito comercial por 40 min, seguido de lavagem em água, e plantados em caixas contendo vermiculita (Terra Mater). Quando as brotações atingiram um tamanho de cerca de 25 cm, o ápice das plantas foi retirado, esterilizado em 70% álcool por 1 min, seguido de lavagem em solução 20% de hipoclorito comercial por 20 min, lavado três vezes em água estéril, dissecado e introduzido *in vitro* (LEE, 1987). Para brotação das plantas foi empregado o meio MP II (sais MS, Tabela 1; 20 g L⁻¹ de sacarose; 100 mg L⁻¹ de mio-inositol; 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl; 0,2 mg L⁻¹ de benzil-aminopurina - BAP; 0,1 mg L⁻¹ de kinetina; 37,25 mg L⁻¹ de Na₂EDTA; 27,85 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O; e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem). Após dois meses de crescimento, com subcultivos a cada 15 dias, as plântulas foram transferidas para o meio de enraizamento MR (sais MS, Tabela 1; 40 g L⁻¹ de sacarose; 37,25 mg L⁻¹ de

Na₂EDTA; 27,85 mg L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O; e pH ajustado para 4,8 antes da autoclavagem) por cerca de quatro semanas. No Anexo A estão descritas a composição de sais e as concentrações utilizadas para o preparo das soluções estoques de sais MS.

3.2.2 Cultivo de bactérias diazotróficas

Foram utilizadas as bactérias diazotróficas *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe BR 11281 (PAL5) isolada, ou a combinação das bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* estirpe BR 11335 (HRC 54), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe BR 11504 (HCC 103), *Azospirillum amazonense* estirpe BR 11115 (CBAmC) e *Burkholderia tropica* estirpe BR 11366 (Ppe8), obtidas da Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ). As bactérias foram crescidas para manutenção em seus respectivos meios (abaixo) a 30° C sob agitação a 120 rpm por 96 h no escuro:

Meio **LGI-P** para *Gluconacetobacter diazotrophicus*: contém 100 g L⁻¹ sacarose; 0,6 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0,2 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0,2 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,02 g L⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 0,01 g L⁻¹ FeCl₃.6H₂O; 0,002 g L⁻¹ Na₂MoO₄.2H₂O; 5,0 mL solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 N KOH); e pH 5,5 (DÖBEREINER et al., 1995).

Meio **JNFb** para *Herbaspirillum*: contém 5 g L⁻¹ ácido málico; 1,8 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0,6 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0,2 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,1 g L⁻¹ NaCl; 0,02 g L⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 4,5 g L⁻¹ KOH; e 2 mL solução de micronutrientes (1,4 g L⁻¹ H₃BO₃; 1,2 g L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O; 1,175 g L⁻¹ MnSO₄.H₂O; 1 g L⁻¹ Na₂MoO₄.2H₂O; 0,04 g L⁻¹ CuSO₄.H₂O); 4 mL solução de Fe-EDTA (solução 1,64%); 2 mL solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 N KOH); 1 mL solução vitaminas, (200 mg L⁻¹ piridoxol-HCL; 100 mg L⁻¹ biotina); e pH 5,8 (DÖBEREINER et al., 1995).

Meio **LGI** para *Azospirillum amazonense*: contém 5 g L⁻¹ sacarose; 0,6 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0,2 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0,2 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,02 g L⁻¹ CaCl₂; 0,002 g L⁻¹ Na₂MoO₄.2H₂O; 5 mL solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 N KOH); 4 mL Fe-EDTA (solução 1,64%); 1 mL solução vitaminas (200 mg L⁻¹ piridoxol-HCL; 100 mg L⁻¹ biotina); e pH 6,0 - 6,2 com H₂SO₄ (DÖBEREINER et al., 1995).

Meio **JMV** para *Burkholderia tropica*: contém 5 g L⁻¹ manitol; 1,8 g L⁻¹ KH₂PO₄; 0,6 g L⁻¹ K₂HPO₄; 0,2 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 0,2 g L⁻¹ CaCl₂.2H₂O; 0,1 g L⁻¹ NaCl; 4 mL Fe-EDTA (solução 1,64%); 2 mL solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 N KOH);

2 mL solução de micronutrientes ($1,4 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$; $1,2 \text{ g L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $1,175 \text{ g L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $1 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); 1 mL solução vitaminas ($200 \text{ mg L}^{-1} \text{ piridoxol-HCl}$; $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ biotina}$); e pH 4,0 – 4,5 (DÖBEREINER et al., 1995).

Para o preparo dos inóculos utilizados, as bactérias foram crescidas separadamente em meio DYGS (2 g L^{-1} extrato de levedura; 2 g L^{-1} glucose; $1,5 \text{ g L}^{-1}$ ácido glutâmico; $1,5 \text{ g L}^{-1}$ peptona bacteriológica; $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; $0,5 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; e pH ajustado para 6,0 antes da autoclavagem) (RODRIGUES-NETO et al., 1986) a 30° C , sob agitação a 120 rpm por 36 h. Para eliminar o excesso de N do meio de cultivo, as células foram centrifugadas 4.000 g por 10 min a 4° C e foram ressuspendidas em meio MR sem nitrogênio para serem usadas nos experimentos de inoculação *in vitro*. No experimento de inoculação com as cinco bactérias, o inóculo foi preparado pela mistura das bactérias após terem sido centrifugadas e quantificadas a uma densidade de 10^8 células bacterianas (determinada em espectrofotômetro a 600 nm).

3.2.3 Ensaios de inoculação *in vitro*

As plantas dos genótipos ‘SP70-1143 e ‘Chunee’ foram crescidas *in vitro* em condição constante de suficiência de N (2 mM de NH_4NO_3). Antes dos experimentos de inoculação, as plantas foram submetidas a um tratamento de deficiência de N (-N) por 24 h, utilizando o meio MR sem fonte de nitrogênio (concentração final de macronutrientes: $1900 \text{ mg L}^{-1} \text{ KCl}$; $440 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $370 \text{ mg L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $170 \text{ mg L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; Micronutrientes: $22,3 \text{ mg L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $8,6 \text{ mg L}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $6,2 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$; $0,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $0,025 \text{ mg L}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $0,025 \text{ mg L}^{-1} \text{ CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $37,25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Na}_2\text{EDTA}$; $27,85 \text{ mg L}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; e pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem) e com sacarose reduzida (2 g L^{-1}), a fim de contribuir para uma rápida associação da bactéria com a planta de cana-de-açúcar. As plantas foram mantidas a 28° C com um fluxo de fótons de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 16 h dia⁻¹.

3.2.3.1 Experimento 1: Inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*

As plântulas enraizadas *in vitro* de ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ submetidas ao tratamento de deficiência de N (-N) por 24 h foram então inoculadas com 0,1 mL de

uma suspensão de *G. diazotrophicus* contendo 10^8 células bacterianas (determinada em espectrofotômetro a 600 nm) (REIS et al., 1999). As plântulas inoculadas e seus respectivos controles não inoculados foram mantidas no mesmo meio desprovido de N por 48 h (Figura 3.1). Na sequência, as plântulas foram transferidas para o mesmo meio MR ou contendo 0,2 mM de N ou contendo 2 mM de N e mantidas por 24 h, 72 h e 240 h (Figura 3.1). Amostras de plântulas foram então empregadas para estimar o influxo de fontes distintas de ^{15}N (^{15}N -amônio, ^{15}N -nitrato, e ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado) no tempo 0 h (após 48 h em -N), e 24 h, 72 h e 240 h após a inoculação (Figura 3.1). Nestes mesmos períodos, tecidos foram amostrados para posterior análise de expressão gênica.

Figura 3.1 - Esquema do experimento de inoculação ou não de raízes de cana-de-açúcar dos genótipos 'SP70-1143' e 'Chunee' com *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou com a mistura das cinco bactérias (*G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*). Plântulas cultivadas *in vitro* em meio contendo N (+N; 2 mM de N) foram submetidas inicialmente, a deficiência de N (-N) por 24h e então foram inoculadas ou não com as bactérias por 48 h. Após esse período, foi feita uma amostragem de plântulas que estavam sob condição de -N inoculadas ou não com a bactéria (tempo amostrado 0 h) para análise de influxo de ^{15}N e expressão gênica. As plântulas foram então submetidas aos tratamentos de presença de N (+N, 0,2 mM de N total) por mais 24, 72 ou 240 h ou na presença de N (+N 2 mM de N total) por 72 h e 240 h quando tiveram suas raízes analisadas quanto ao influxo de ^{15}N nitrato ou amônio no tempo de 10min

3.2.3.2 Experimento 2: Inoculação com a combinação das bactérias *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*,

Plântulas de 'SP70-1143' e 'Chunee' submetidas ao tratamento de deficiência de N (-N) por 24 h foram então inoculadas com 0,1 mL de uma suspensão contendo

uma mistura equivalente das cinco bactérias diazotróficas (*G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*) (REIS et al., 1999). As plântulas inoculadas e seus respectivos controles não inoculados foram mantidas no mesmo meio desprovido de N por 48 h (Figura 1). Na sequência, as plântulas foram transferidas para o mesmo meio MR contendo 0,2 mM de N e mantidas por 24 h, 72 h e 240 h (Figura 1). Amostras de plântulas foram empregadas para estimar o influxo de fontes distintas de ^{15}N (^{15}N -amônio e ^{15}N -nitrato) no tempo 0 h (após 48 h em -N), e 24 h, 72 h e 240 h pós a inoculação (Figura 3.1). Nestes tempos, as plântulas foram submetidas a ensaio de influxo de amônio e nitrato, além de terem as raízes coletadas para posterior análise de expressão gênica.

3.2.3.3 Experimento 3: Inoculação com *Gluconacetobacter diazotrophicus* para biomassa

Plântulas *in vitro* enraizadas de 'SP70-1143' e 'Chunee' foram inoculadas com 0,1 mL de uma suspensão de *G. diazotrophicus* crescidas por 48 h contendo 10^8 células bacterianas (determinada em espectrofotômetro a 600 nm), utilizando meio MR desprovido de fonte de nitrogênio e de carbono. Em seguida, as plântulas foram submetidas a tratamento de presença de N (+N), no qual 0,2 mM de ^{15}N -nitrato de ^{15}N -amônio total foi adicionado ao meio de cultura por 30 d e 60 d. Além disso, um tratamento alternativo de alto N contendo 1 mM de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado também foi preparado, com meio de cultura desprovido de fonte de carbono. As plantas foram mantidas a 28° C com um fluxo de fótons de 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 16 h dia⁻¹. Após o período de 30 e 60 d, as plantas foram pesadas para a obtenção da biomassa fresca e tiveram suas raízes e parte aérea coletadas para estudo de expressão gênica e medição de ^{15}N .

3.2.4 Ensaio de cinética de absorção de N pela raiz de cultivares de cana-de-açúcar

No 1º experimento, plântulas 48 h após a inoculação e nos tempos 24 h, 72 h e 240 h sob baixo N (+N 0,2 mM) foram analisadas para influxo em meio MR líquido contendo 60% atom sulfato de ^{15}N -amônio ou contendo 99,7% atom ^{15}N -nitrato de potássio, ou ainda contendo 99,9% atom ^{15}N -nitrato de ^{15}N -amônio duplamente marcado por um período de 10 min (LOQUÉ et al., 2006). Paralelamente, plântulas

48 h após a inoculação e nos tempos 72 h e 240 h sob alto N (+N 2 mM) foram analisadas para influxo em meio MR líquido contendo 99,9% atom ^{15}N -nitrato de ^{15}N -amônio duplamente marcado por um período de 10 min. Após esses tratamentos, as raízes foram cortadas e congeladas em N_2 líquido e guardadas em freezer -80°C .

No 2º experimento, as plântulas inoculadas com a mistura das cinco bactérias (*G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*) por 48 h de deficiência de N (0 h, -N) ou suficiência de N (+N, 24 h, 72 h e 240 h) foram analisadas para influxo de N. Em cada tempo, as plântulas foram submetidas à análise de exposição rápida ao sulfato de ^{15}N -amônio (60% atom ^{15}N) ou ^{15}N -nitrato de potássio (99,7% atom ^{15}N), por um período de 10 min (LOQUÉ et al., 2006).

Todas as amostras de raízes foram secas a 50°C por 4 dias e analisadas para ^{15}N no espectrômetro de massas modelo 20/20 ANCA/SL (SerCon Ltda., Chesshire, Reino Unido), no laboratório de Isótopos Estáveis no CENA-USP pelo Profs. Drs. José Albertino Bendassolli e Paulo Cesar Ocheuze Trivelin, empregando 6 replicatas biológicas de cada tratamento.

3.2.5 Ensaio de N acumulado em cultivares de cana-de-açúcar

No 3º experimento, as plântulas de 'SP70-1143' e 'Chunee' inoculadas com *G. diazotrophicus*, após permanecerem em contato com a bactéria por 48 h, foram submetidas ao tratamento de presença de N (+N), no qual 0,2 mM ou 1 mM de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado (1% atom ^{15}N) foi adicionado ao meio de cultura por 30 e 60 d. As amostras de raízes foram secas a 50°C por 4 dias e analisadas para ^{15}N no espectrômetro de massas modelo 20/20 ANCA/SL (SerCon Ltda., Chesshire, Reino Unido), no laboratório de Isótopos Estáveis no CENA-USP pelo Profs. Drs. José Albertino Bendassolli e Paulo Cesar Ocheuze Trivelin, empregando 6 replicatas biológicas de cada tratamento.

3.2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a caracterização dos padrões de expressão gênica e identificação dos genes diferencialmente expressos dos transportadores de N durante a associação com bactérias diazotróficas, amostras de raízes de 'SP701143' e 'Chunee' co-cultivados ou não com *G. diazotrophicus* ou com a mistura de cinco bactérias, bem

como raiz do experimento de biomassa, foram coletadas e armazenadas em -80 °C. O RNA total de amostras de raízes (200 mg) foi extraído utilizando-se o método descrito em Leal et al. (2007). Brevemente, as amostras foram maceradas em N líquido e transferidas para um microtubo de 2 mL, ao qual foi adicionado 1 mL de tampão de extração pré-aquecido à 37°C (2% CTAB; 2% PVP; 2 M NaCl; 100 mM Tris; 25 mM EDTA; 2% β -mercaptoethanol). Após a homogeneização em banho-maria a 65°C por cerca de 30 min, as amostras foram colocadas no gelo por 1 min, seguida da adição de 1 mL de CIA (clorofórmio/álcool-isoamílico 24:1 vol) e de uma centrifugação a 9.000 g por 10 min a 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 2 mL, adicionando um volume igual de CIA, que foi emulsionado seguido de uma centrifugação a 9.000 g por 10 min a 4° C. Novamente, o sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL para posterior precipitação do RNA total, com solução de 8 M de LiCl (0,1 vol) e incubação a 4° C por 12 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 9.000 g por 30 min a 4° C, seguido do descarte do sobrenadante. O pellet formado foi lavado duas vezes com 500 μ L de 75% etanol (etanol: H₂O DEPC inativa 3:1) e centrifugado a 9.000 g por 10 min a 4 °C. Por fim, o pellet foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 30 μ L de água 0,01% DEPC inativa. O RNA foi quantificado em NanoDrop e sua integridade confirmada via eletroforese.

Após a quantificação, cerca de 2 μ g do RNA de cada amostra foi tratado empregando 1 U de DNase I (Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA) em tampão apropriado, 2 U de RNaseout (Invitrogen) e água ultrapura DEPC inativa num volume final de 18 μ L, em reação incubada a 25° C por 15 min. A reação foi parada com a adição de 2 μ L EDTA (25 mM), e incubada a 65° C por 10 min. Amostras de 1 μ g de RNA total tratado com DNase I e oligodT (0,5 μ g μ L⁻¹) foram desnaturadas a 65° C por 5 min, sendo incubadas a 4° C por 2 min, seguido da adição de 4 μ L de 5X *First-Strand Buffer*, 1 mM dNTP, 1 μ L de DTT 0,1 M e 20 U da enzima SuperScript III (Invitrogen). A reação foi então incubada a 50 °C por 1 h, seguida de 70° C por 15 min, resfriando a 4 °C.

3.2.7 Identificação de genes das famílias *AMTs* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*) e *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*)

Para identificação dos genes ortólogos aos transportadores de nitrato (família NRT/PRT), sequências de arábida e arroz foram utilizadas na busca de *ESTs* presentes no banco de dados do SUCEST (*Sugarcane Expressed Sequence Tag*), conjuntamente com dados de RNA-seq. Sequências de aminoácidos de genes ortólogos foram obtidas pelo Dr. Joni Esrom Lima (Lab. Melhoramento de Plantas, CENA/USP) e Prof. Dr. Renato Vicentini (Lab. Bioinformática e Biologia de Sistemas, UNICAMP).

3.2.8 Desenho de iniciadores para genes das famílias *AMTs* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*) e *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*)

Os iniciadores específicos para cada gene foram desenhados com base nos *Tentative Consensus* (TCs) do bando de dados do SUCEST relativos a genes que codificam proteínas dos genes ortólogos da família de transportadores de amônio (*AMTs*- *AMMONIUM TRANSPORTERS*) (Tabela 3.1) e nitrato (*NRTs*- *NITRATE TRANSPORTERS*) (Tabela 3.2) de cana-de-açúcar, utilizando-se o programa *Primer3*, designando-se a temperatura de dissociação (T_m) de 61° C, e o tamanho de *amplicons* entre 80 a 250 pb. O par de iniciadores de cada gene foi testado no programa *NetPrimer* para estabilidade, T_m , conteúdo de GC (%) e interações entre iniciadores.

Tabela 3.1 - Sequências de iniciadores relativos aos genes que codificam proteínas transportadoras (*AMTs*- *AMMONIUM TRANSPORTERS*), responsáveis na absorção de amônio em raízes de cana-de-açúcar, e o gene referência empregado (Ubiquitina), com seus respectivos tamanhos esperados de *amplicons*, utilizados para análise quantitativa de transcritos reversos

Nome	Sequência dos iniciadores	Amplicon
ScAMT1.1 For	CGCGCAGATCATCCAGATCC	174 pb
ScAMT1.1 Rev	GGGTCCTCGTCGTGGTAGAC	
ScAMT1.3 For	GAACGTGGTGATGATCCTGGT	172 pb
ScAMT1.3 Rev	CATGTCCTCGTCGTGGTAAGC	
Ubiquitina2 For	CTTCTTCTGTCCCTCCGATG	159 pb
Ubiquitina2 Rev	TCCAACCAAAGTCTGCTC	

Tabela 3.2 - Sequências de iniciadores relativos aos genes que codificam proteínas transportadoras (NRTs-NITRATE TRANSPORTERS), responsáveis na absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar, com seus respectivos tamanhos esperados de amplicons, utilizados para análise quantitativa de transcritos reversos

Nome	Sequência dos iniciadores	Amplicon
<i>ScNRT1.1 For</i>	CCTGGTGACGTACCTGATGG	128 pb
<i>ScNRT1.1 Rev</i>	ACGATGTAGATGGTGTAGGTGGTG	
<i>ScNRT2.1 For</i>	GAGCATCCGTCTCTTCTCCTTC	144 pb
<i>ScNRT2.1 Rev</i>	GCCTTGGTGAGGTTGAGGTT	
<i>ScNAR2.1 For</i>	GCTGGCGGTGCTTCTCTT	174 pb
<i>ScNAR2.1 Rev</i>	GGCTCGGTGGTGTTCAGG	
<i>ScNRT2.5 For</i>	ATCGTGCCGTTCTGTCTCC	131 pb
<i>ScNRT2.5 Rev</i>	ATCCCCGTCTCCGTCTTGT	

3.2.9 Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

As reações continham 1X de KAPA SYBR FAST (2X) (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA), 0,2 µM de cada iniciador, 1 µL do cDNA 3:7 (v/v) e água Milli-Q estéril para um volume final de reação de 10 µL. A análise de RT-qPCR dos genes de *ScAMTs* e *ScNRTs* incluíram nos experimentos um controle negativo (sem cDNA) e foram realizadas no RotorGene-6000 (Qiagen; Hilden, Alemanha). O perfil da reação foi designado com duas temperaturas iniciais: 50° C por 10 min e 95° C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de três passos: 95° C por 20 s, 60/62° C por 25 s e 72° C por 25 s. Após a amplificação, determinou-se a curva de dissociação entre 72 e 95°C. Em todos os experimentos os valores dos C_Q (*quantification cycle*) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica, de acordo com método “Delta Delta” (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001): razão = $2^{-\Delta(\Delta C_Q)}$ sendo $\Delta C_Q = C_Q$ (gene alvo) – C_Q (gene referência) e o $\Delta = \Delta C_Q$ (tratamento) - ΔC_Q (controle). Para todos os experimentos o gene *UBQ* (*Ubiquitina*) foi utilizado como gene de referência.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Caracterização do transporte de amônio e nitrato pela raiz de cana-de-açúcar durante a associação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*

As plantas podem se associar aos microrganismos a fim de obter benefícios dessa interação. As bactérias diazotróficas, por exemplo, são responsáveis pela FBN e podem promover outros efeitos benéficos a planta, como bactérias promotoras de crescimento (*Plant Growth Promoting Bacteria* – PGPB), com efeitos potenciais diretos, como a produção de fitormônios (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003), solubilização de fósforo (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999) e aceleração dos processos de mineralização de nutrientes (PERSELLO-CARTINEAUX; NUSSAUME; ROBAGLIA, 2003), ou efeitos indiretos, como o antagonismo a fitopatógenos (MUTHUKUMARASAMY; REVATHI; VADIVELU, 2000), entre outros. Outro aspecto se refere a ênfase do efeito da interação dos microrganismos com plantas e seu efeito na regulação dos transportadores de N (HILDEBRANDT et al., 2002; GUETHER et al., 2009; KOBAE et al., 2010). A hipótese de que bactérias diazotróficas poderiam exercer um efeito positivo na absorção de formas inorgânicas de nitrogênio em cana-de-açúcar, por meio de alteração da regulação dos genes codificadores de transportadores de nitrato (*NRT*) e/ou amônio (*AMT*) resultaria na maior eficiência do aproveitamento dos fertilizantes nitrogenados, diminuindo assim os custos da produção e os impactos no ambiente.

Há poucas informações sobre a possível regulação dos transportadores de membrana em cana-de-açúcar responsáveis pela aquisição de N inorgânico durante a interação com bactérias fixadoras de N_2 . Com o objetivo de caracterizar a cinética de absorção de fontes inorgânicas de N (amônio e nitrato) em cana-de-açúcar durante a associação com endofíticos, plântulas dos genótipos ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’, os quais são contrastantes para o processo de fixação biológica de N_2 (URQUIAGA et al., 1992), foram obtidas pelo cultivo *in vitro* e utilizadas em experimentos com inoculação de *G. diazotrophicus*.

Inicialmente, foi feita a caracterização da absorção de nitrato de amônio pelas raízes das plântulas de ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ inoculadas ou não com a bactéria na presença de N (0,2 mM). Para verificar a influência do efeito associativo da bactéria em tempos prolongados de exposição à suficiência de N, realizou-se um

experimento de série temporal (0 h, 24 h, 72 h e 240 h). Após serem submetidas à inoculação ou não com *G. diazotrophicus*, as plântulas foram submetidas ao tratamento de presença de N (+N), no qual 0,2 mM de N total (nitrato de amônio) não marcado foi adicionado ao meio de cultura, sendo este tratamento considerado de baixo N. Neste ponto de transferência para o tratamento de suficiência de N, foram amostradas plantas em condição de deficiência de N (-N) (tempo 0 h), inoculadas ou não inoculadas, para o processo de absorção de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado. Paralelamente, as plantas permaneceram por 24 h, 72 h e 240 h nos tratamentos com N, quando foram submetidas a ensaios de influxo rápido (10 min) de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado (LOQUÉ et al., 2006) nas raízes dos dois genótipos de cana-de-açúcar.

A análise da absorção de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado pelas plântulas de 'SP70-1143' não inoculadas com a bactéria diazotrófica sob tratamento de presença (+N 0,2 mM) ou deficiência de N (-N) apresentou regulação temporal do status de N (Figura 3.2A). No início, durante a deficiência de N (-N, 0 h), não houve diferença na absorção de N entre plântulas inoculadas ou não com a bactéria diazotrófica (inoculação ocorreu 48 h antes). Houve um aumento crescente e temporal da absorção ^{15}N -nitrato de amônio nas plântulas não inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.2A), atingindo o máximo de influxo com 240 h após a submissão a presença de N (+N 0,2 mM). Por outro lado, as plantas inoculadas com a bactéria diazotrófica quando na presença de N (+N 0,2 mM), reduziram significativamente a absorção de ^{15}N após 72 h de tratamento em relação ao controle não inoculado, indicando que a interação diazotrófica-planta não é benéfica ao longo do tempo na presença de nitrato de amônio nas plantas de 'SP70-1143' (Figura 3.2A).

Diferentemente do que foi encontrado para 'SP70-1143', as plântulas de 'Chunee' não inoculadas não apresentaram um aumento de absorção de N ao longo do tempo, indicando uma resposta fisiológica adaptativa distinta para aquisição entre os genótipos de cana-de-açúcar (Figura 3.2B). A resposta negativa da inoculação com a bactéria diazotrófica utilizando o genótipo 'Chunee' (Figura 3.2B) apresentou diferenças significativas entre os tratamentos inoculado e não-inoculado, sendo, portanto, mais acentuada do que a encontrada em 'SP70-1143' (Figura 3.2A). Durante o período de ausência de N (-N, tempo 0 h) as plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* tiveram absorção de N diminuída em relação às plantas não

inoculadas e essa menor absorção também ocorreu quando as plantas inoculadas foram transferidas para a condição de suficiência de N, exceto no tempo 72 h após a adição de N (Figura 3.2B). Resumidamente, a inoculação dos genótipos 'SP70-1143' e 'Chunee' com *G. diazotrophicus* não exerceu um efeito positivo na absorção de nitrato de amônio como fonte de N.

Com base nesses resultados é possível inferir que existem diferenças no processo de aquisição de N entre os genótipos 'SP70-1143' e 'Chunee'. Além disso, uma regulação temporal no processo de aquisição de nitrato de amônio foi identificada, sendo que, apenas o genótipo 'SP70-1143' apresenta indução da absorção de ^{15}N nas raízes, mas não para o genótipo 'Chunee' (Figura 3.2A e 3.2B). No entanto, essa indução na absorção de N para 'SP70-1143' após a adição exógena de N foi observada apenas em plantas não inoculadas, enquanto que plantas com *G. diazotrophicus* houve significativa redução na aquisição de ^{15}N , o que sugere uma regulação negativa no processo de absorção de nitrato de amônio na presença de bactérias diazotróficas. Com isso, é possível sugerir que: i) a presença de N, nesse caso a fonte exógena sendo nitrato de amônio, afeta o processo de associação de cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas regulando negativamente a aquisição de N ou ii) existe um efeito regulatório negativo de fontes específicas de N, ou seja nitrato ou amônio, na interação de cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus*.

Estudos prévios demonstram que uma menor população de diazotróficas foi encontrada em tecidos de cana-de-açúcar quando plantas foram fertilizadas com alta concentração de N (FUENTES-RAMIREZ et al., 1999; MUTHUKUMARASAMY et al., 2002; MEDEIROS et al., 2006). Suman et al. (2008) estudaram o estabelecimento da população de diazotróficas em cana-de-açúcar submetida a níveis crescentes de nitrogênio e encontraram que a população de *G. diazotrophicus* foi maior com a fertilização de 75 kg ha^{-1} (N_{75}), comparada ao solo não fertilizado (N_0) e ao solo fertilizado com 150 kg ha^{-1} (N_{150}), enquanto que a população de *Herbaspirillum* aumentou de N_0 ao N_{150} .

Figura 3.2 - Influxo de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chunee' durante a interação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Plântulas foram cultivadas *in vitro* em deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou não inoculadas por 48 h. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de presença de N (+N 0,2 mM de N total) por mais 24 h, 72 h e 240 h e posteriormente tiveram suas raízes analisadas quanto ao influxo de ^{15}N . As plântulas que estavam sob condição de -N inoculadas ou não com a bactéria (tempo amostrado 0 h) também foram analisadas para influxo de N. **A-** Influxo de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143'. **B-** Influxo de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'Chunee'. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre plântulas não inoculadas e inoculadas com a bactéria diazotrófica dentro de cada tempo amostrado pelo teste de Tukey a 5%, $n=6$ plantas

Para elucidar se a presença de nitrato de amônio ou fonte de N específica estão influenciando de forma negativa a absorção de N durante a interação cana-de-açúcar-bactérias diazotróficas, foram conduzidos experimentos para a absorção de fontes inorgânicas distintas de N separadamente (^{15}N -amônio ou ^{15}N -nitrato) a fim de compreender a regulação da sinalização planta-endofítico.

De modo geral, a absorção da fonte ^{15}N -nitrato por plântulas 'SP70-1143' mostrou valores de absorção absolutos similares em raízes de plantas não inoculadas na presença de N, enquanto as plântulas que foram inoculadas com *G. diazotrophicus* apresentaram um aumento transiente do influxo (72 h) de ^{15}N -nitrato pelas raízes de cana-de-açúcar (Figura 3.3A). Sob deficiência de N (-N) (tempo 0 h), plântulas de 'SP70-1143' não inoculadas ou inoculadas com a bactéria diazotrófica apresentaram diferenças significativas do influxo de ^{15}N nas raízes, apresentando maior influxo de ^{15}N -nitrato (cerca de 1,8 vezes) nas plântulas que não foram inoculadas com *G. diazotrophicus*, o que sugere um efeito negativo do processo de inoculação na absorção de ^{15}N -nitrato, logo no início quando N é limitante (tempo 0 h) (Figura 3.3A).

A análise de influxo de ^{15}N -nitrato de plântulas de 'SP70-1143' inoculadas submetidas ao tratamento de presença de N (+N 0,2 mM) mostrou que as raízes de cana-de-açúcar reduziram a absorção de ^{15}N no tempo 24 h em relação às plantas não inoculadas com bactérias diazotróficas, mas logo as plântulas recuperaram essa absorção no tempo de 72 h, ultrapassando em valores a absorção de ^{15}N obtida pelas plantas não inoculadas (Figura 3.3A). Sob o tratamento de +N prolongado (240 h), novamente observa-se uma redução da absorção da fonte de ^{15}N -nitrato (Figura 3.3A) pelas plantas inoculadas, o que pode sugerir um efeito transiente na indução do processo de aquisição de nitrato durante a associação entre a bactéria diazotrófica e cana-de-açúcar. Diferentemente, os dados anteriores relativos à absorção de nitrato de amônio duplamente marcado (Figura 3.2A) mostraram que na suficiência de N, a absorção de nitrato de amônio pelas plantas de 'SP70-1143' inoculadas com bactérias diazotróficas foi sempre menor em relação às plantas não inoculadas, o que pode caracterizar um efeito negativo da inoculação na absorção de nitrato quando amônio está presente (Figura 3.2A), visto que, a inoculação com *G. diazotrophicus* levou a indução do processo de aquisição nitrato de forma transiente.

As plântulas de 'Chunee' mostraram maiores valores absolutos de influxo de ^{15}N nitrato em suas raízes (Figura 3.3A e 3.3B). No entanto, o genótipo 'Chunee' apresentou um perfil diferente de aquisição de ^{15}N -nitrato ao da cultivar 'SP70-1143' quando inoculado com bactérias diazotróficas, pois as plantas que foram inoculadas com a bactéria diazotrófica não mostraram aumento na absorção de ^{15}N -nitrato (Figura 3.3B) em relação às plantas controle (não inoculadas). As plântulas do genótipo 'Chunee' sob deficiência de N (-N) (tempo 0 h), inoculadas ou não inoculadas com a bactéria diazotrófica, não apresentaram diferenças em relação ao influxo de ^{15}N nas raízes (Figura 3.3B). Contrariamente a esse resultado, o influxo na presença de N (+N 0,2 mM), mostrou ao longo do tempo que as plântulas não inoculadas com a bactéria diazotrófica aumentaram significativamente o influxo de ^{15}N -nitrato, exceto no tempo de 72 h. Já as plântulas inoculadas apresentaram uma menor absorção de nitrato em relação às plantas não inoculadas, exceto no momento 72 h, o que sugere que a inoculação com a bactéria apresentou um efeito negativo na aquisição de N pelas raízes das plântulas (Figura 3.3B). Portanto, a interação 'Chunee' com *G. diazotrophicus* não leva ao aumento de influxo de nitrato nas raízes. Considerando que esse genótipo apresenta menor taxa de FBN

(URQUIAGA et al., 1992) é possível sugerir que existe uma baixa capacidade de associação entre bactérias diazotróficas e ‘Chunee’, indicando que a ausência de indução do processo de aquisição de nitrato em suas raízes é devido a menor interação planta-endofíticos. Esses dados corroboram a caracterização feita no experimento de nitrato de amônio, uma vez que as plantas de ‘Chunee’ inoculadas, de modo geral, tiveram menor influxo de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado em relação às plantas não inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.2B).

Figura 3.3 - Influxo de ^{15}N -nitrato de potássio em raízes de cana-de-açúcar do genótipo ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ durante a interação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Plântulas foram cultivadas *in vitro* em deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou não inoculadas por 48 h. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de presença de N (+N 0,2 mM de N total) por mais 24 h, 72 h e 240 h e posteriormente tiveram suas raízes analisadas quanto ao influxo de ^{15}N . As plântulas que estavam sob condição de -N inoculadas ou não com a bactéria (tempo amostrado 0 h) também foram analisadas para influxo de N. **A-** Influxo de ^{15}N -nitrato de potássio em raízes de cana-de-açúcar do genótipo ‘SP70-1143’. **B-** Influxo de ^{15}N -nitrato de potássio em raízes de cana-de-açúcar do genótipo ‘Chunee’. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre plântulas não inoculadas com a bactéria e plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica dentro de cada tempo amostrado pelo teste de Tukey a 5%, $n=6$ plantas

Em valores absolutos, a absorção de amônio pelas raízes de plântulas de cana-de-açúcar é até 6,4 vezes maior para ‘SP70-1143’ e 5,4 vezes para ‘Chunee’ (Figura 3.3 e 3.4), do que a absorção de nitrato, sendo esta a fonte preferencial de N para plantas de cana-de-açúcar. Este dado corrobora experimentos em cana-de-açúcar que relataram uma menor eficiência na absorção de nitrato pelas raízes, quando comparada com a aquisição de amônio, em condições suficientes de disponibilidade de N (ROBINSON et al., 2011), o que difere de outras importantes culturas, como o sorgo e milho, que possuem maior preferência pela aquisição de nitrato em detrimento do amônio (ROBINSON et al., 2011). Gramíneas mais

próximas da cana-de-açúcar, como *Andropogon gayanus* e ainda mais distantes, como *Brachiaria* também adquirem preferencialmente amônio comparado a nitrato (ROSSITER-RACHOR et al., 2009; SUBBARAO et al., 2009).

Plântulas de 'SP70-1143' sob deficiência de N (-N) (tempo 0 h) não apresentaram diferença significativa do influxo de ^{15}N -amônio nas raízes entre os tratamentos inoculado ou não inoculado com a bactéria diazotrófica. Na presença de N (+N), as plântulas inoculadas ou não inoculadas com a bactéria diazotrófica apresentaram um influxo de amônio constante para todos os tempos estudados, exceto no período mais tardio de estudo (240 h), no qual as plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* aumentaram significativamente a absorção de ^{15}N -amônio em relação às plantas não inoculadas (Figura 3.4A). Esses resultados indicam que a interação 'SP70-1143' com *G. diazotrophicus* leva a indução do processo de aquisição de amônio de forma tardia.

Para 'Chunee' foi observado que no tempo 0 h, as plântulas inoculadas ou não inoculadas não apresentaram diferenças na absorção de ^{15}N -amônio (Figura 3.4B), corroborando as observações prévias empregando nitrato como fonte de N (Figura 3.3B e 4B). Sob o tratamento de presença de N (+N), plântulas de 'Chunee' que foram inoculadas não mostraram aumento na absorção de ^{15}N em relação às plântulas não inoculadas (Figura 3.4B). Para esse genótipo, o influxo de ^{15}N -amônio reduziu ao longo do tempo tanto para o tratamento inoculado quanto não inoculado (Figura 3.4B). Portanto, nesse genótipo a associação da bactéria diazotrófica não levou a indução do processo de aquisição de amônio de forma tardia.

Figura 3.4 - Influxo de ^{15}N -sulfato de amônio em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chunee' durante a interação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Plântulas foram cultivadas *in vitro* em deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou não inoculadas por 48 h. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de presença de N (+N 0,2 mM de N total) por mais 24 h, 72 h e 240 h e posteriormente tiveram suas raízes analisadas quanto ao influxo de ^{15}N . As plântulas que estavam sob condição de -N inoculadas ou não com a bactéria (tempo amostrado 0 h) também foram analisadas para influxo de N. **A-** Influxo de ^{15}N -sulfato de amônio em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143'. **B-** Influxo de ^{15}N -sulfato de amônio em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'Chunee'. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre plântulas não inoculadas com a bactéria e plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica dentro de cada tempo amostrado pelo teste de Tukey a 5%, $n=6$ plantas

A comparação direta entre os genótipos de cana-de-açúcar contrastantes para FBN indicam que o genótipo 'SP70-1143' possui a habilidade de induzir, de forma transiente, a aquisição de nitrato e amônio em suas raízes durante a interação *G. diazotrophicus* e cana-de-açúcar. O fato que tal regulação no processo de absorção de ^{15}N -nitrato de amônio não foi observada em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas sugere que a sinalização dessa fonte inorgânica de N sobrepõe a sinalização de bactérias *G. diazotrophicus* no processo de absorção de N. Evidências da sinalização de fontes inorgânicas de N na regulação no processo de absorção de outra fonte de N vêm de estudos em plantas de cana-de-açúcar, sendo que plantas cultivadas em condições de suficiência de N apresentam reduzida aquisição de nitrato (ROBINSON et al., 2011). Além disso, amônio também exerce um *feedback* negativo na absorção de nitrato. Estudos de influxo rápido em raízes de cana-de-açúcar cultivadas sob nutrição de amônio como fonte única de N levaram a redução na absorção de ^{15}N -nitrato (SEREZINO, 2015), demonstrando que amônio regula a aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar. Este efeito já foi também demonstrado em outras espécies, como cevada (KRONZUCKER et al., 1999). Por meio de estudos de influxo com ^{15}N -nitrato, observou-se que a adição de

1 mM de amônio reduz significativamente o influxo de nitrato, principalmente em plantas cultivadas sob baixas concentrações de nitrato, enquanto que o efeito inibitório do amônio em plantas cultivadas sob altas concentrações externas de nitrato é mínimo e não significativo (KRONZUCKER et al., 1999). Esses resultados demonstram que amônio exerce um efeito negativo no transporte de HATS para nitrato, mas não em LATS (KRONZUCKER et al., 1999). Ainda, com base em estudos prévios sobre o estabelecimento da população de diazotróficas em cana-de-açúcar, no qual foi demonstrado que em condições de alta concentração de N (solo fertilizado com 150 kg ha⁻¹) uma menor população de *G. diazotrophicus* foi encontrada (SUMAN et al., 2008), aliado aos resultados apresentados aqui, é possível sugerir, portanto, que a presença amônio ou nitrato altera a sinalização de bactérias *G. diazotrophicus* para regular de forma transiente a aquisição de amônio e nitrato em raízes de cana-de-açúcar (Figuras 3.3 e 3.4).

Para melhor compreensão do efeito de N durante a interação cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas, uma caracterização da absorção de nitrato de amônio pelas raízes das plântulas de 'SP70-1143' e 'Chunee', inoculadas ou não com a bactéria cultivadas sob alto N (2 mM) foi realizada. Para isso, plântulas de cana-de-açúcar inoculadas ou não com *G. diazotrophicus* foram submetidas, após inoculação, ao tratamento de presença de N (+N) que consistia de 2 mM de N total (nitrato de amônio) adicionado ao meio de cultura, por 72 h e 240 h. Após esse período foram realizados ensaios de influxo rápido (10 min) com ¹⁵N-nitrato de amônio duplamente marcado.

A análise da absorção de ¹⁵N-nitrato de ¹⁵N amônio pelas plântulas de 'SP70-1143' em tratamentos de presença de alto N (+N 2 mM) apresentou perfis distintos entre plantas inoculadas e não inoculadas com a bactéria diazotrófica nos tempos analisados. No tempo 72 h, sob presença de N, as plantas de 'SP70-1143' não inoculadas tiveram maior influxo de ¹⁵N-nitrato de amônio do que as plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* (Figura 3.5A). Este perfil foi similar ao encontrado na análise de influxo de nitrato de amônio em condições de baixo N (0,2 mM) (Figura 3.2A), o que sugere que a disponibilidade de diferentes quantidades da fonte exógena de N (0,2 mM ou 2 mM) não favoreceu o processo de absorção de N em plantas inoculadas com a bactéria diazotrófica. Por outro lado, a análise do influxo de ¹⁵N no tempo 240 h mostrou maior aquisição de N em plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* em relação às plantas não inoculadas (Figura 5A). Este resultado

diverge daquele encontrado para baixo N (0,2 mM), no qual não foi observado um efeito promotor na absorção de ^{15}N em plantas inoculadas com diazotróficas (Figura 3.2A), o que sugere que ao longo do tempo, a inoculação com a bactéria diazotrófica favoreceu o influxo de N apenas quando a fonte nitrato de amônio estava presente em alta concentração.

As plântulas de 'Chunee' na presença de N (+N 2 mM) inoculadas ou não inoculadas com a bactéria diazotrófica no tempo de 72 h de exposição a +N, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 3.5B). No tempo mais prolongado de estudo (240 h) as plântulas não inoculadas apresentaram maior influxo de N do que as plântulas que foram inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.5B), sugerindo que sob alta concentração de N (2 mM) a associação com *G. diazotrophicus* não favorece o influxo da fonte nitrato de amônio em 'Chunee'. Os resultados encontrados para 'Chunee' nos tempos estudados (72 h e 240 h) para a fonte nitrato de amônio em alta concentração (2 mM) corroboram com aqueles encontrados para a mesma fonte, porém em baixa concentração (0,2 mM), no qual as plântulas de 'Chunee' tiveram fluxo constante de ^{15}N -nitrato de amônio no tempo 72 h, e em 240 h as plântulas não inoculadas tiveram maior influxo do que as plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.2B), sugerindo novamente que existe uma baixa capacidade de associação entre bactérias diazotróficas e 'Chunee', tanto sob baixo N quanto sob alto N.

Figura 3.5 - Influxo de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chune' durante a interação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Plântulas foram cultivadas *in vitro* em deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou não inoculadas por 48 h. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de presença de N (+N 2 mM de N total) por mais 72 h e 240 h e posteriormente tiveram suas raízes analisadas quanto ao influxo de ^{15}N . **A-** Influxo de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143'. **B-** Influxo de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'Chune'. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre plântulas não inoculadas com a bactéria e plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica dentro de cada tempo amostrado pelo teste de Tukey a 5%, $n=6$ plantas

Com isso, pode-se sugerir que plântulas dos genótipos 'SP70-1143' e 'Chune' crescidas em alta concentração de nitrato de amônio apresentam diferenças no processo de aquisição dessa fonte de N mediante a associação com diazotróficos. Enquanto plântulas de 'SP70-1143' inoculadas com a bactéria apresentam uma indução da absorção de ^{15}N nas raízes após 240 h sob suficiência de N, as plântulas do genótipo 'Chune' não respondem a inoculação com *G. diazotrophicus* com aumento de influxo (Figura 3.5A e 3.5B), sugerindo, assim, uma regulação positiva no processo de aquisição de nitrato de amônio na presença da bactéria diazotrófica somente em plântulas de 'SP70-1143' tardiamente. Contrastando com os dados anteriores encontrados sob baixo N (+N 0,2 mM), no qual não foram encontrados taxas maiores de influxo de N nas plântulas inoculadas, sugere-se que o aumento da concentração da fonte de N (nitrato de amônio) favoreceu a associação de *G. diazotrophicus* x cana-de-açúcar regulando positivamente a aquisição de N. Baseado em estudos prévios, sabe-se que uma menor população de diazotróficas estava relacionada com uma alta fertilização de N em tecidos de cana-de-açúcar (FUENTES-RAMIREZ et al., 1999; MUTHUKUMARASAMY et al., 2002; MEDEIROS et al., 2006). Porém, novos estudos relacionaram uma maior diversidade de taxons às plantas que receberam

adubação nitrogenada, sendo encontrados gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio e/ou promotoras do crescimento, como *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Burkholderia* (PISA et al., 2011), corroborando com os nossos dados aqui encontrados de que sob alto N (+N 2 mM) é possível a presença de bactérias diazotróficas favorecendo o aumento na taxa de influxo de N. Em solos de cultivo de cana-de-açúcar, a concentração de N no solo é altamente variável, porém, a concentração de 2 mM de N total utilizada nos experimentos *in vitro* apresentados aqui reflete a dinâmica de N no solo (ROBINSON et al., 2011), o que sugere que a sinalização mediada por bactérias diazotróficas em raízes de cana-de-açúcar ocorre em condições normais de cultivo.

Recentes estudos demonstram que reduzidas concentrações de N no solo não levam a maior associação com bactérias diazotróficas, sendo que, a população de endofíticos é pouco alterada em raízes de cana-de-açúcar de cultivares australianas (YEOH et al., 2015). Com base nas diferenças na aquisição de nitrato de amônio em raízes de plantas inoculadas com a bactéria diazotrófica sob 0,2 mM e 2 mM de N (Figuras 3.2 e 3.5) é possível sugerir que a sinalização do status de N (condição de baixo N - 0,2 mM) sobrepõe a sinalização da bactéria inoculada *G. diazotrophicus* na regulação do transporte de N em raízes de cana-de-açúcar. Considerando que o transporte de N é mediado por proteínas de membrana, a identificação de quais transportadores seriam regulados durante a interação cana-de-açúcar-endofíticos é essencial para revelar as bases moleculares desse processo.

3.3.1.1 Expressão dos transportadores de nitrato nas raízes de cana-de-açúcar durante a associação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Nitrato é um nutriente essencial, assim como uma molécula sinalizadora, que apresenta grande impacto no metabolismo e desenvolvimento das plantas (KROUK et al., 2010). A compreensão da complexa regulação dos transportadores responsáveis pela absorção de nitrato do solo, de acordo com as variações desse nutriente no ambiente, é fundamental na busca de uma agricultura sustentável (KROUK et al., 2010).

A aquisição de nitrato pelas raízes das plantas é mediada por transportadores de membrana da família *NITRATE TRANSPORTERS* (NRTs). Estes transportadores

são divididos em duas subfamílias de acordo com a afinidade ao substrato (baixa ou alta-afinidade) e foram identificados em várias espécies (SIDDIQI et al., 1990; LIU; TSAY, 2003; VIDMAR et al., 2000; QUAGGIOTTI et al., 2003; PLETT et al., 2010; FENG et al., 2011; BAI et al., 2013; von WITTGENSTEIN et al., 2014). Na subfamília NRT1, a maioria dos transportadores é de baixa-afinidade ao nitrato (faixa de mM) e esses atuam principalmente no transporte de LATS (TSAY et al., 1993; HATZFELD; SAITO, 1999; HUANG et al., 1999; FORDE, 2000; GLASS et al., 2001). O membro importante dessa família gênica em arabidopsis é o *AtNRT1.1*, que pode atuar como sensor e transportador de nitrato (HO et al., 2009). A outra subfamília possui transportadores de alta afinidade (atuando na faixa de μM), denominada NRT2. Mutantes de arabidopsis para *AtNRT2.1* e *AtNRT2.2* apresentam 80% do transporte de alta-afinidade reduzido quando comparado a plantas selvagens, e possuem menor acúmulo de biomassa quando N está em baixas concentrações, evidenciando a importância destes dois transportadores na absorção de nitrato pelas raízes (FILLEUR et al., 2001). No entanto, a principal contribuição para o sistema de transporte de alta afinidade a nitrato compreende a proteína de membrana NRT2.1. Análise do mutante *nrt2.1* em arabidopsis demonstrou redução de 72% no influxo de nitrato na faixa de concentração de HATS, enquanto que no mutante *nrt2.2* decresce em apenas 19% a atividade de HATS (LI et al., 2007). Ainda, a análise de expressão dos genes *AtNRT2.1* aliada a estudos de influxo com nitrato marcado, demonstram que a expressão desse gene em arabidopsis é coordenada perfeitamente com a absorção de nitrato na faixa HATS, sendo induzidos sob deficiência de N (FILLEUR; VEDELE, 1999; LEJAY et al., 1999; CERESO et al., 2001; ORSEL et al., 2006), o que demonstra que esse é o principal transportador de HATS durante a aquisição dessa fonte inorgânica de N (FILLEUR et al., 2001). A maioria dos transportadores de alta-afinidade NRT2 é ativa na membrana plasmática quando transportadores NAR2 são coexpressos (TONG et al., 2005; OKAMOTO et al., 2006), formando o modelo de transporte de alta afinidade de dois componentes. Mutantes de arabidopsis para a proteína acessória NAR2 apresentaram diminuição drástica na atividade do transporte de alta afinidade (diminuição de 80% no influxo de nitrato), e na expressão de transportadores NRT2, principalmente *AtNRT2.1*, que apresenta sua expressão diminuída em 90% (ORSEL et al., 2006).

Com o objetivo de identificar os transportadores de nitrato regulados nas raízes e correlacioná-los com os resultados de influxo de nitrato obtidos, raízes dos

genótipos 'SP70-1143' e 'Chunee' cultivados *in vitro* durante associação ou não com a bactéria *G. diazotrophicus*, foram avaliadas para expressão de genes de *NRTs* sob as mesmas condições dos experimentos de cinética de N.

A expressão do ortólogo do principal transportador e sensor de nitrato *NRT1.1* (HO et al., 2009) em raízes de cana-de-açúcar foi alterada mediante a associação com bactérias diazotróficas. *ScNRT1.1* foi induzido no período de 240 h após o tratamento de suficiência de N (+N 0,2 mM), em plantas de 'SP70-1143' inoculadas com *G. diazotrophicus* (Figura 3.6A). Para o genótipo 'Chunee', a indução desse transportador também ocorreu em plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica no tempo de 72 h (Figura 3.6B). Contudo, esses dados não refletem nas diferenças na absorção de nitrato pelas raízes de plântulas de cana-de-açúcar analisadas dessas variedades (Figura 3.3A e 3.3B).

O ortólogo do principal transportador de alta-afinidade em arabis *AtNRT2.1* (CEREZO et al., 2001) em cana-de-açúcar apresentou alteração dos níveis de transcritos durante a associação com bactérias diazotróficas, sendo que a expressão desse gene em plantas da cultivar 'SP70-1143' foi induzida de forma transiente logo após 24 h de tratamento de suficiência de N (+N), apresentando o máximo de nove vezes mais expressão em relação às plantas não inoculadas no tempo de 72 h (Figura 3.6C). A expressão do gene *ScNRT2.1* coincide com a tendência do aumento do influxo de ^{15}N -nitrato observado no tempo de 72 h nas plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.3A), sugerindo que esse transportador seria o responsável pelo aumento de influxo de nitrato nas raízes das plântulas de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143'. Já as plantas no tempo 0 h apresentaram maior acúmulo de transcritos do gene *ScNRT2.1* na ausência da interação com endofíticos (Figura 3.6C), o que corrobora com os menores valores de influxo de ^{15}N -nitrato no início da associação com bactérias diazotróficas (Figura 3.3A), levando a repressão de *ScNRT2.1* logo após a inoculação (tempo 0 h). Portanto, esses dados indicam que *ScNRT2.1* está envolvido na sinalização entre *G. diazotrophicus* e raízes de cana-de-açúcar durante a aquisição de nitrato.

Outra evidência deriva da regulação da expressão desse gene no genótipo de menor FBN, 'Chunee', onde a expressão do transportador *ScNRT2.1* apresentou comportamento distinto do encontrado na cultivar 'SP70-1143'. A indução na expressão desse transportador ocorreu somente no tratamento não inoculado com a bactéria diazotrófica (Figura 3.6D), assim como para o gene *ScNAR2.1* (Figura

3.6F), mostrando que a inoculação com essa bactéria não causa efeito benéfico para este genótipo. A expressão gênica de *ScNRT2.1/ScNAR2.1* se correlaciona com a absorção de ^{15}N -nitrato (Figura 3.3B), no qual encontramos aumento de influxo somente para as plântulas de 'Chunee' que não foram inoculadas com a bactéria diazotrófica.

Figura 3.6 - Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*) em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chuneé'. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chuneé' sob diversos tratamentos. **A, C, E e G**- Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* no genótipo 'SP70-1143'; **B, D, F e H**- Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* no genótipo 'Chuneé'. Barras indicam $\pm$ SE, $n=3$ réplicas biológicas.

O gene *AtNRT2.5* foi identificado como sendo um importante transportador de nitrato em raízes e folhas de *Arabidopsis* (LEZHNEVA et al., 2014). O ortólogo desse transportador *ScNRT2.5* em raízes de cana-de-açúcar de ‘SP70-1143’ apresentou menor expressão global quando comparado com o principal transportador da família NRT2, o *ScNRT2.1*. Porém, esse transportador apresentou maior acúmulo de transcritos no tempo de 72 h, sob suficiência de N, em plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica em relação as não inoculadas (Figura 3.6G), corroborando assim, mesmo que em menor proporção (cerca de 2,8 vezes), com a tendência de aumento do influxo de nitrato às 72 h (Figura 3.3A). Diferentemente, para o genótipo ‘Chunee’, o gene *ScNRT2.5* apresentou maior número de transcritos em plantas não inoculadas com a bactéria diazotrófica apenas no tempo de 240 h (Figura 3.6H), e esse aumento de nove vezes, pode estar relacionado com o maior influxo obtido por plantas desse genótipo quando não estavam inoculadas (Figura 3.3B).

Em resumo, os resultados de expressão de genes de transportadores de nitrato indicam que na presença de N (+N 0,2 mM), a inoculação com a bactéria *G. diazotrophicus* aumenta a expressão de forma transiente do principal transportador de alta-afinidade de nitrato, *ScNRT2.1*, em raízes do genótipo ‘SP70-1143’, além do transportador da mesma família *ScNRT2.5*, e do transportador de baixa-afinidade *ScNRT1.1*, presumivelmente levando a maior aquisição dessa fonte de N. Em ‘Chunee’, a expressão desses mesmos genes (*ScNRT1.1*, *ScNRT2.1* e *ScNRT2.5*) correlacionou com o influxo de nitrato em plantas não inoculadas.

Com o objetivo de identificar o envolvimento dos transportadores de nitrato regulados durante o cultivo em alto N (2 mM), raízes dos genótipos ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ cultivados *in vitro* durante associação ou não com a bactéria *G. diazotrophicus*, foram avaliadas nas mesmas condições que os experimentos de cinética (72 h e 240 h).

Primeiramente, ao analisar a expressão do gene *ScNRT1.1* em raízes de cana-de-açúcar, perceberam-se comportamentos distintos entre os dois genótipos analisados. Plântulas de ‘SP70-1143’ não apresentaram alteração na expressão de *ScNRT1.1* durante a associação com bactérias diazotróficas nos tempos analisados (Figura 3.7A), enquanto que no genótipo ‘Chunee’, a indução desse transportador ocorreu em plântulas não inoculadas com a bactéria diazotrófica no tempo de 240 h (Figura 3.7B). Para o genótipo ‘Chunee’, esse dado corrobora a diferença

encontrada no influxo de ^{15}N -nitrato de amônio pelas plântulas não inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.5B).

Para o gene *ScNRT2.1*, foi encontrada alteração dos níveis de transcritos durante a associação com bactérias diazotróficas em plantas da cultivar 'SP70-1143', sendo que a expressão desse gene foi induzida no período tardio (240 h) do tratamento de suficiência de N (+N 2 mM), apresentando três vezes mais expressão em relação às plantas não inoculadas (Figura 3.7C). Esse aumento de expressão foi também encontrado para o gene *ScNAR2.1* (Figura 3.7E). Portanto, o perfil de expressão encontrado para o gene *ScNRT2.1* coincide com os dados de influxo de ^{15}N -nitrato de amônio, no qual observou-se um aumento da absorção de N nas plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica em 240 h (Figura 3.5A). Para o genótipo 'Chunee', foi também observado um aumento dos níveis de transcritos tanto do gene *ScNRT2.1* quanto do *ScNAR2.1* (Figura 3.7D e 3.7F), porém esse aumento de expressão ocorreu em plantas não inoculadas com a bactéria diazotrófica em relação às plantas inoculadas com a bactéria, o que novamente correlaciona com o influxo de nitrato de amônio observado para essas plântulas (Figura 3.5B).

Finalmente, a análise do gene *ScNRT2.5* apresentou menor valor de expressão global entre os transportadores de nitrato analisados. No genótipo 'SP70-1143', esse gene apresentou maior expressão em plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* em relação às plântulas não inoculadas nos tempos 72 h e 240h (Figura 3.7G). Porém, houve correlação com os dados de influxo de ^{15}N -nitrato de amônio apenas para o tempo 240 h (Figura 3.5A), no qual as plântulas inoculadas tiveram maior influxo de N do que as não inoculadas com a bactéria diazotrófica; no tempo de 72 h, foi observado aumento de influxo de N em plantas não inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.5A). Diferentemente, em plântulas de 'Chunee' houve maior expressão do gene *ScNRT2.5* em plântulas não inoculadas com a bactéria no tempo de 240 h (Figura 3.7H), corroborando a taxa de influxo de nitrato de amônio observado nas plântulas de 'Chunee' (Figura 3.5B).

Figura 3.7 - Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*) em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chunee'. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chunee' sob diversos tratamentos. **A, C, E e G**- Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* no genótipo 'SP70-1143'; **B, D, F e H**- Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* no genótipo 'Chunee'. Barras indicam $\pm$ SE, n= 3 réplicas biológicas.

A análise dos resultados de transportadores de nitrato sugerem que na presença de alto N (+N 2 mM), há um aumento na expressão do principal transportador de alta-afinidade de nitrato, *ScNRT2.1*, e do transportador *ScNRT2.5*, o que leva a uma maior aquisição de nitrato em raízes do genótipo 'SP70-1143'. Esses transportadores são representantes da subfamília denominada NRT2, que atua no transporte de nitrato na faixa de alta afinidade (faixa de μM). Mutantes de *Arabidopsis* para *AtNRT2.1* e *AtNRT2.2* apresentam redução de 80% no transporte de alta-afinidade quando comparados a plantas selvagens, e possuem menor acúmulo de biomassa quando N está em baixas concentrações, evidenciando a importância destes dois transportadores na absorção de nitrato pelas raízes (FILLEUR et al., 2001). No entanto, a principal contribuição para o sistema de transporte de alta afinidade a nitrato compreende a proteína de membrana NRT2.1. Mutantes de *Arabidopsis* no gene *nrt2.1* tiveram redução de 72% no influxo de nitrato na faixa de concentração de HATS, enquanto o mutante *nrt2.2* diminuiu a atividade de HATS em apenas 19% (LI et al., 2007). Além disso, a análise de expressão dos genes *AtNRT2.1* aliada a estudos de influxo com nitrato marcado, demonstraram que a expressão desse gene em *Arabidopsis* é coordenada perfeitamente com a absorção de nitrato na faixa HATS, sendo induzidos sob deficiência de N (FILLEUR; VEDELE, 1999; LEJAY et al., 1999; CEREZO et al., 2001; ORSEL et al., 2006), o que demonstra que esse é o principal transportador de HATS durante a aquisição de fonte inorgânica de N (FILLEUR et al., 2001). O transportador *AtNRT2.5* foi também identificado como sendo um importante transportador de nitrato em raízes e folhas (LEZHNEVA et al., 2014). Em condições de longo períodos de deficiência de N, *AtNRT2.5* é expresso em células da epiderme e pelos radiculares realizando o transporte constitutivo de tipo HATS (LEZHNEVA et al., 2014; KOTUR; GLASS, 2014). Semelhante ao perfil encontrado em *Arabidopsis*, a análise da expressão do ortólogo em cana-de-açúcar *ScNRT2.5* indica a função desse transportador na aquisição de nitrato na faixa de concentração de alta-afinidade em raízes de cana-de-açúcar sob deficiência de N (SEREZINO, 2015).

Além da regulação dos transportadores de nitrato mediante as flutuações na concentração de N inorgânico no solo (CEREZO et al., 2001; ORSEL et al., 2006; HO et al., 2009; LEZHNEVA et al., 2014; KOTUR; GLASS, 2014), há evidências que os transportadores de nitrato possivelmente também obedecem a sinais dependentes da interação planta-microrganismos. Em *A. thaliana* foram identificados

dois genes transportadores de NO_3^- da família *NRT2* (*NRT2.5* e *NRT2.6*) na parte aérea como sendo fortemente regulados em resposta à inoculação com estirpe STM196 de *Phyllobacterium brassicacearum*. Ambos os genes são necessários para a promoção do crescimento de plantas induzido por *P. brassicacearum* STM196, identificando assim, dois novos genes que codificam produtos benéficos em interações bióticas (MANTELIN et al., 2006; KECHID et al., 2013). Por outro lado, a inoculação de *Arabidopsis* com *Phyllobacterium* sp. diminuiu o acúmulo de transcritos dos principais genes responsáveis pelo transporte de nitrato *AtNRT1.1* e *AtNRT2.1*. Embora modestas, estas reduções aparentam possuir importância biológica, uma vez que os transcritos de *AtNRT1.1* e *AtNRT2.1* representam cerca de 15% e 80% de transcritos totais da família *NRT* em raízes, respectivamente (MANTELIN et al., 2006). Nos resultados aqui apresentados, a interação entre cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus* desencadeia uma sinalização na regulação dos transportadores de nitrato, sendo que na presença de 0,2 mM de N, a inoculação aumentou a expressão de forma transiente do principal transportador de alta-afinidade de nitrato, *ScNRT2.1*, além do transportador *ScNRT2.5*, e do transportador de baixa-afinidade *ScNRT1.1*, enquanto sob alto N (+N 2 mM) a sinalização regulou apenas os transportadores alta-afinidade *ScNRT2.1* e *ScNRT2.5*. Como o transportador de nitrato *NRT1;1* foi caracterizado como sendo o sensor para o status de nitrato na raiz (HO et al., 2009) uma possível explicação para esse gene não ter sido regulado durante a exposição a alto N pode ser devido a sinalização da bactéria diazotrófica que se sobrepôs a regulação pelo status de N. Portanto, nossos resultados indicam que a bactéria *G. diazotrophicus* em associação com cana-de-açúcar desencadeia uma sinalização na regulação do transporte HATS para nitrato.

3.3.1.2 Expressão dos transportadores de amônio nas raízes de cana-de-açúcar durante a associação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*

O transporte de amônio, que é a fonte preferencial de N para a maioria das plantas cultivadas, inclusive para cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011), é mediado pela família de genes denominada *AMTs* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*), que são responsáveis pela absorção deste nutriente (GAZZARRINI et al., 1999; LOQUÉ; von WIREN, 2004). Estudos de absorção de ^{15}N -amônio em mutantes duplos de *Arabidopsis* demonstraram que os transportadores *AMT1.1* e *AMT1.3*

apresentam maior capacidade de absorção de amônio, sendo responsáveis por 70% do amônio total absorvido (LOQUÉ et al., 2006; YUAN et al., 2007). A análise dos genes ortólogos desses transportadores em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' apresentou um perfil similar de expressão para o transportador *ScAMT1.1* entre todos os tratamentos (+N 0,2 mM), inoculados e não inoculados, exceto no período mais tardio de estudo (240 h), no qual houve um aumento no acúmulo significativo de transcritos desse gene nas plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica em relação ao não inoculado (Figura 3.8A). O transportador *ScAMT1.3*, por sua vez apresentou acúmulo significativo de transcritos sob a condição de inoculação nos tempos 72 e 240 h em relação ao controle não inoculado (Figura 3.8C). Este aumento de expressão dos transportadores *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* refletiu o aumento do influxo de ^{15}N -amônio no tempo de 240 h (período tardio) para as plântulas que foram inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.4A). Para o genótipo 'SP70-1143, a análise de expressão do gene *ScAMT1.3* no período inicial (tempo 0 h) indicou que a inoculação com a bactéria diazotrófica reduziu a expressão do gene; porém, ao longo do tempo e na presença de N (+N), a inoculação aumentou significativamente o acúmulo de transcritos do gene em relação ao controle (Figura 3.8C).

Figura 3.8 - Análise quantitativa de transcritos de *AMTs* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*) em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143'. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' sob diversos tratamentos. Plântulas foram cultivadas *in vitro* sob deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou não inoculadas por 48 h. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de suficiência de N (+N 0,2 mM de N total) por mais 24 h, 72 h e 240 h. **A e C**- Análise quantitativa de transcritos de *AMTs* no genótipo 'SP70-1143'; **B e D**- Análise quantitativa de transcritos de *AMTs* no genótipo 'Chunee'. Barras indicam $\pm$ SE, $n=3$ réplicas biológicas.

Por outro lado, para o genótipo 'Chunee', a análise de expressão dos transportadores *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* foi similar entre os tratamentos com e sem inoculação da bactéria diazotrófica (Figura 3.8B e 3.8D). Esses resultados de análise de expressão corroboram com os dados de influxo de ^{15}N -amônio, que se mostraram uniformes durante todos os tempos, não diferindo a absorção entre plantas inoculadas e não inoculadas (Figura 3.4B).

Com base nos resultados é possível sugerir que os transportadores *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* apresentam sua expressão aumentada em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' quando associadas com a bactéria diazotrófica na presença de N (+N 0,2 mM). Considerando que esses transportadores são essenciais no processo de aquisição de amônio em raízes de outras espécies, é

possível inferir que o aumento nos níveis de absorção de ^{15}N -amônio obtidos nos experimentos de cinética de absorção (Figura 3.4A) estaria relacionado à expressão desses transportadores de membrana. Com isso, *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* possivelmente participam na via de sinalização entre bactérias *G. diazotrophicus* x cana-de-açúcar levando a maiores níveis de absorção de amônio nessa gramínea.

A análise de estudos de influxo de fontes de N específica somada ao perfil de expressão de genes responsáveis pela aquisição de fontes inorgânicas de N revelou que a interação entre cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus* desencadeia uma sinalização na regulação do transportador de nitrato *ScNRT2.1*, o que levou a uma tendência no aumento no influxo de nitrato, e dos transportadores de amônio *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3*, que desencadeou maiores valores de influxo de amônio, nas raízes dessa gramínea. Esses resultados indicam um efeito promotor no processo de aquisição de N em cana-de-açúcar mediado por *G. diazotrophicus*.

Foram também analisados os perfis de expressão dos genes de transportadores de amônio durante o cultivo sob alto N (2 mM). O gene *ScAMT1.1* em plântulas do genótipo 'SP70-1143' não apresentou alteração de expressão nos tempos analisados (72 h e 240 h) (Figura 3.9A). Já no genótipo 'Chunee', houve maior expressão desse gene em plântulas não inoculadas com a bactéria diazotrófica no tempo 240 h (Figura 3.9B), o que correlaciona com o maior influxo da fonte nitrato de amônio em plantas não inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus*.

O genótipo 'SP70-1143' apresentou acúmulo de transcritos do gene *ScAMT1.3* quando inoculado com *G. diazotrophicus* no tempo de 240 h (Figura 3.9C), e no genótipo 'Chunee', a indução na expressão desse gene estava relacionado às plântulas não inoculadas com a bactéria diazotrófica, em ambos os tempos analisados 72 h e 240 h (Figura 3.9D). Com base nesses resultados pode-se sugerir que na presença de alto N (+N 2 mM), o aumento na expressão do transportador de amônio *ScAMT1.3* em plântulas do genótipo 'SP70-1143' inoculadas com *G. diazotrophicus* levou a uma maior aquisição de amônio pelas raízes desse genótipo.

Em resumo, para plantas de cana-de-açúcar cultivadas em presença de nitrato de amônio (+N 2 mM), a análise do influxo de ^{15}N -nitrato de amônio somada ao perfil de expressão dos genes transportadores de nitrato e amônio mostrou que a associação entre cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus* pode ser benéfica em plantas de 'SP70-1143'. A sinalização desencadeada pela bactéria influencia na regulação

transcricional dos genes codificadores de transportadores de nitrato *ScNRT2.1* e *ScNRT2.5*, e do transportador de amônio *ScAMT1.3*, o que acarreta no aumento da taxa de influxo de ^{15}N -nitrato de amônio nas raízes de cana-de-açúcar, visto que a menor associação de *G. diazotrophicus* com o genótipo ‘Chunee’ não levou alteração na taxa de aquisição dessas fontes inorgânicas de N.

Plantas de tomateiro, quando em associação com as bactérias fixadoras de N_2 *Azospirillum brasilense* ou *Azoarcus* sp. apresentaram maior número de transcritos do transportador *LeAMT1.2* em relação a plantas não inoculadas, ou inoculadas com outras espécies de diazotróficas, como *Azotobacter vinelandii* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BECKER et al., 2002). Nessa interação com tomateiro, *Azospirillum brasilense* poderia secretar amônio, o que representaria um sinal regulatório para expressão gênica de *LeAMT1.2*, ou seja, essa resposta de *LeAMT1.2* parece ser regulada diretamente pelo status de N no local da colonização, sendo que a indução na expressão desse transportador também ocorre pela aplicação tópica de amônio (BECKER et al., 2002). Em espécies como arábida e arroz, a expressão de *AMT1.1* e *AMT1.3* responde rapidamente ao status de N na raiz, com aumento do número de transcritos desse gene quando as raízes são cultivadas em condições limitantes de N (GAZZARINI et al., 1999; LOQUÉ et al., 2006; YUAN et al., 2007). A adição exógena de N inorgânico exerce um *feedback* regulatório diferente em ortólogos desses genes, de acordo com a espécie. Enquanto a expressão de *AtAMT1.1* de arábida e *OsAMT1.3* de arroz são reprimidos pelo aumento na concentração de glutamina na raiz, devido a assimilação de amônio, *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* são induzido nessa condição (RAWAT et al., 2002; SONODA et al., 2003), indicando uma regulação local do processo de absorção de amônio. Portanto, a indução dos transportadores *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* em raízes de cana-de-açúcar do genótipo ‘SP70-1143’ quando associadas com a bactéria diazotrófica na presença de baixo N (+N 0,2 mM) demonstrou que possivelmente há uma sinalização desencadeada por *G. diazotrophicus* que se sobrepõe ao status de N imposto às plântulas ao longo do experimento. Consistente com essa conclusão, plantas de arábida cultivadas em condições de baixo N apresentam indução da expressão de *AMT1.1* e *AMT1.3* somente em poucas horas (LOQUÉ; von WIRÉN, 2004). Já na presença de alto N (2 mM), somente o gene *ScAMT1.3* foi induzido quando em associação com *G. diazotrophicus*, enquanto que o gene *ScAMT1.1* apresentou um comportamento

homogêneo, não apresentando alterações quando inoculado com a bactéria diazotrófica, provavelmente porque a regulação pelo status de N foi maior do que a sinalização exercida pela bactéria. Portanto, a maior aquisição de ^{15}N em raízes de ‘SP70-1143’ em condições de alto N (+N 2 mM) é devido a atividade da proteína de membrana *ScAMT1.3*.

Figura 3.9 - Análise quantitativa de transcritos de *AMTs* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*) em raízes de cana-de-açúcar do genótipo ‘SP70-1143’. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar do genótipo ‘SP70-1143’ sob diversos tratamentos. Plântulas foram cultivadas *in vitro* sob deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou não inoculadas por 48 h. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de suficiência de N (+N 2 mM de N total) por mais 72 h e 240 h. **A e C**- Análise quantitativa de transcritos de *AMTs* no genótipo ‘SP70-1143’; **B e D**- Análise quantitativa de transcritos de *AMTs* no genótipo ‘Chunee’. Barras indicam $\pm$ SE, $n=3$ réplicas biológicas

Apesar desses resultados, a sinalização de *G. diazotrophicus* na regulação do processo de aquisição de N em raízes de cana-de-açúcar não se demonstrou estável, sendo regulada de forma transiente (Figuras 3.3, 3.4 e 3.5). Isso pode indicar que: i) a associação de *G. diazotrophicus* x cana-de-açúcar também ocorre de forma transiente, devido à dificuldade de estabelecimento perante as populações

endógenas de outros endofíticos (Capítulo 2 - Tabela 2.2; MAGNANI et al., 2010, 2013; PISA et al., 2001); ou ii) a sinalização desencadeada apenas por *G. diazotrophicus* não é suficiente para manter de forma estável e constante a maior absorção de N em raízes de cana-de-açúcar.

3.3.2 Caracterização do transporte de amônio e nitrato pela raiz de cana-de-açúcar durante a associação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*

Estudos conduzidos sobre a inoculação de cana-de-açúcar com a mistura destas cinco estirpes específicas de bactérias diazotróficas demonstraram aumentos na matéria seca de colmos e raiz, produtividade de colmos e FBN (OLIVEIRA et al., 2002, 2003, 2006; CANUTO et al., 2003; SCHULTZ et al., 2012). Portanto, a combinação de bactérias diazotróficas como *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica* podem ser utilizada para investigar a sinalização de endofíticos no processo de absorção de N em raízes de cana-de-açúcar. Para isso, foi investigada a regulação do processo de absorção de N em plântulas de 'SP70-1143' e 'Chunee' durante a associação com uma mistura de bactérias diazotróficas: *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*. Plântulas de 'SP70-1143' e 'Chunee' foram inoculadas ou não com as bactérias por 48 h na ausência de N. Após a inoculação, foram conduzidos ensaios de absorção de ^{15}N -nitrato ou ^{15}N -amônio ao longo do tempo (0 h, 24 h, 72 h e 240 h).

As plântulas que estavam sob deficiência de N (-N) foram submetidas à inoculação ou não com as cinco bactérias, e após 48 h as plântulas foram amostradas em condição de deficiência de N (-N), inoculadas ou não inoculadas, para a análise da absorção de ^{15}N -sulfato de amônio e ^{15}N -nitrato de potássio (tempo 0 h). Na sequência, plântulas foram colocadas no tratamento de presença de N (+N, 0,2 mM de N total) e permaneceram por 24 h, 72 h e 240 h, quando foram submetidas a análise de absorção rápida de ^{15}N -sulfato de amônio e ^{15}N -nitrato de potássio.

De modo geral, a análise de plântulas de 'SP70-1143' sob suficiência de N (+N) (24 h, 72 h e 240 h) mostrou uma diminuição na taxa de aquisição de ^{15}N -

nitrito pelas raízes quando inoculadas com as bactérias diazotróficas em relação às raízes das plântulas não inoculadas (Figura 3.10A). Porém, na deficiência de N (-N) (tempo 0 h), houve uma maior absorção (cerca de 1,5 vezes) de nitrito quando as plantas estavam inoculadas com as bactérias diazotróficas, o que pode indicar um efeito positivo do processo de inoculação na absorção de ^{15}N -nitrito quando N é limitante (tempo 0 h) (Figura 3.10A). A análise de absorção de ^{15}N -nitrito de plântulas de 'SP70-1143' inoculadas submetidas ao tratamento de presença de N (+N 0,2 mM) mostrou que as raízes reduziram a absorção de ^{15}N nas plântulas inoculadas em relação ao tempo 0 h (-N), o que sugere que a inoculação com as diversas bactérias diazotróficas ao longo do tempo reduziu a aquisição de N pelas raízes das plântulas (Figura 3.10A). Esses dados diferem daqueles obtidos com a mesma cultivar em associação apenas com *G. diazotrophicus*, no qual encontramos uma tendência de aumento no influxo de ^{15}N -nitrito quando em suficiência de N no tempo 72 h (Figura 3.3A). Portanto, a interação de 'SP70-1143' com a combinação de bactérias diazotróficas é benéfica apenas quando N está ausente, pois ao longo do tempo, não houve aumento significativo de influxo de nitrito nas raízes, sugerindo um efeito negativo entre a associação cana-de-açúcar com as diversas bactérias diazotróficas.

As plântulas do genótipo 'Chunee' mostraram maiores valores absolutos de influxo de ^{15}N nitrito em suas raízes do que os encontrados para 'SP70-1143' (Figura 3.10A e 10B). Apesar disso, esse genótipo apresentou um perfil semelhante de aquisição de ^{15}N -nitrito ao da cultivar 'SP70-1143' quando inoculado com as bactérias diazotróficas, pois as plantas que foram inoculadas não mostraram aumento na absorção de ^{15}N -nitrito (Figura 3.10B) em relação às plantas não inoculadas, exceto no tempo 0 h. As plântulas do genótipo 'Chunee' sob deficiência de N (-N, tempo 0 h), apresentaram diferença significativa na taxa de influxo de ^{15}N -nitrito entre as raízes inoculadas ou não inoculadas com a bactéria diazotrófica, sendo que houve maior influxo de nitrito em plantas que estavam em associação com as bactérias diazotróficas (Figura 3.10B). Já a análise do influxo na presença de N (+N 0,2 mM), mostrou que as plântulas inoculadas com as bactérias diazotróficas tiveram menor influxo de ^{15}N -nitrito em todos os tempos amostrados em relação às plantas que não foram inoculadas (Figura 3.10B).

Em resumo, a inoculação com as bactérias teve um efeito negativo na aquisição de N pelas raízes das plântulas de 'Chunee', exceto no tempo 0 h (Figura

3.10B). Esse resultado corrobora os dados obtidos de influxo de ^{15}N -nitrato pelas plântulas de ‘Chunee’ inoculadas somente com *G. diazotrophicus* apenas (Figura 3.3B). Portanto, a interação ‘Chunee’ com *G. diazotrophicus* ou com a mistura de bactérias diazotróficas não leva ao aumento de influxo da fonte nitrato nas raízes.

Figura 3.10 - Influxo de ^{15}N -nitrato de potássio em raízes de cana-de-açúcar do genótipo ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ durante a interação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*. Plântulas foram cultivadas in vitro em deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a mistura das cinco bactérias ou não inoculadas por 48 h. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de presença de N (+N 0,2 mM de N total) por mais 24 h, 72 h e 240 h e posteriormente tiveram suas raízes analisadas quanto ao influxo de ^{15}N no tempo de 10min, juntamente com as plântulas que estavam sob condição de -N inoculadas ou não com a bactéria (tempo amostrado 0 h). **A-** Influxo de ^{15}N -nitrato de potássio em raízes de cana-de-açúcar do genótipo ‘SP70-1143’. **B-** Influxo de ^{15}N -nitrato de potássio em raízes de cana-de-açúcar do genótipo ‘Chunee’. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre plântulas não inoculadas com a bactéria e plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica dentro de cada tempo amostrado pelo teste de Tukey a 5%, $n=6$ plantas

A absorção de amônio em valores absolutos pelas raízes de plântulas de cana-de-açúcar foi novamente bem superior a absorção de nitrato, sendo até 4 vezes maior para ‘SP70-1143’ e 2,4 vezes para ‘Chunee’ (Figura 3.10 e 3.11), o que corrobora com a preferência dessa fonte inorgânica de N em cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011).

Para as plântulas de ‘SP70-1143’ sob deficiência de N (-N, tempo 0 h), plântulas inoculadas ou não, apresentaram diferenças significativas na taxa de influxo de ^{15}N nas raízes de cana-de-açúcar (Figura 3.11A). Houve um maior influxo de ^{15}N -amônio (cerca de 1,1 vezes) nas plântulas que não foram inoculadas (controle), o que indica um efeito negativo do processo de inoculação da combinação de bactérias diazotróficas na absorção de ^{15}N -amônio, quando N é

limitante (tempo 0 h) (Figura 3.11A). De modo geral, a absorção de amônio ($^{15}\text{NH}_4$) por plântulas de 'SP70-1143' apresentou um aumento do influxo de N pelas raízes nos tratamentos de suficiência de nitrogênio (+N), quando inoculadas com as bactérias diazotróficas em relação às plântulas não inoculadas com as bactérias (Figura 3.11A). No tempo 24 h e no período mais tardio (240 h), houve uma maior absorção quando as plântulas foram inoculadas com as bactérias diazotróficas em relação às plântulas não inoculadas (Figura 3.11A), sugerindo que a interação endofítico-planta poderia ter se tornado favorável a absorção de amônio ao longo do tempo, desencadeando a sinalização para regulação do processo de absorção em raízes de cana-de-açúcar. Considerando os dados de influxo de amônio em que plantas de 'SP70-1143' foram inoculadas apenas com *G. diazotrophicus*, temos um perfil de influxo de amônio semelhante ao encontrado com a inoculação da mistura das bactérias diazotróficas, no qual a maior taxa de influxo foi relacionada a plantas que estavam inoculadas (Figuras 3.11A e 3.11B). Portanto, as plantas inoculadas com bactérias diazotróficas favoreceram o influxo de ^{15}N -amônio, sugerindo assim, uma associação benéfica cana-de-açúcar x bactérias diazotróficas, quando a fonte disponível para as plantas é amônio.

No genótipo 'Chunee' foi observado que no tempo 0 h, as plântulas inoculadas apresentaram diferenças na absorção de ^{15}N -amônio em relação às plantas não inoculadas (Figura 3.11B), indicando que quando N é limitado as bactérias diazotróficas exercem um efeito positivo na absorção dessa fonte de N inorgânico. Esse efeito positivo é mantido durante o tratamento na presença de N (+N 0,2 mM), no tempo 24 h, onde maiores valores de influxo foram obtidos por plântulas inoculadas. Porém, no tempo 72 h as plântulas de 'Chunee' não apresentaram diferenças no influxo entre os tratamentos, enquanto que no período mais tardio (240 h), houve uma queda na absorção de ^{15}N das plântulas inoculadas em relação às plântulas não inoculadas (Figura 3.11B), o que indica novamente que a sinalização da presença de N sobrepõe a sinalização dessas bactérias diazotróficas na regulação do processo de aquisição de N em raízes de cana-de-açúcar. Deste modo, pode-se sugerir que a inoculação de 'Chunee' com a mistura das bactérias diazotróficas favoreceu a absorção de amônio apenas nos períodos iniciais analisados, e ao longo do tempo sob presença de N, as plântulas não se beneficiam mais da interação planta x endofíticos, possivelmente devido à baixa

capacidade de FBN (URQUIAGA et. al., 1992) que pode ser resultado de uma baixa associação com bactérias diazotróficas neste genótipo.

Figura 3.11 - Influxo de ^{15}N -sulfato de amônio em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chunee' durante a interação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*. Plântulas foram cultivadas in vitro em deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a mistura das cinco bactérias ou não inoculadas por 48 h. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de presença de N (+N 0,2 mM de N total) por mais 24 h, 72 h e 240 h e posteriormente tiveram suas raízes analisadas quanto ao influxo de ^{15}N no tempo de 10min, juntamente com as plântulas que estavam sob condição de -N inoculadas ou não com a bactéria (tempo amostrado 0 h). **A-** Influxo de ^{15}N -sulfato de amônio em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143'. **B-** Influxo de ^{15}N -sulfato de amônio em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'Chunee'. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre plântulas não inoculadas com a bactéria e plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica dentro de cada tempo amostrado pelo teste de Tukey a 5%, $n=6$ plantas

Em suma, plantas dos genótipos 'SP70-1143' e 'Chunee' inoculadas com as cinco bactérias diazotróficas não apresentaram maior absorção de nitrato. Por outro lado, para amônio, que é a fonte preferencial de N para cana-de-açúcar, foi identificado maiores valores de influxo quando as plântulas de 'SP70-1143' estavam inoculadas com as bactérias diazotróficas no período de 24 h e no mais tardio de 240 h na presença de N (0,2 mM). Para o genótipo 'Chunee', a absorção de amônio foi aumentada em plântulas inoculadas apenas nos períodos iniciais dos tratamentos (0h e 24 h), no entanto este efeito benéfico é perdido ao longo do tempo (72 e 240 h). Consequentemente, pode-se sugerir que há uma sinalização dependente de *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica* no processo de absorção de amônio, mantendo níveis mais estáveis e constantes na indução do processo de aquisição dessa fonte de N durante a interação bactérias diazotróficas e cana-de-açúcar.

3.3.2.1 Expressão dos transportadores de nitrato nas raízes de cana-de-açúcar durante a associação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*

Para identificar os transportadores de nitrato regulados nas raízes e correlacioná-los com os resultados de influxo de nitrato obtidos, realizadas análises do perfil transcricional dos transportadores de nitrato nas raízes dos genótipos 'SP70-1143' e 'Chunee' durante associação com a combinação das bactérias diazotróficas *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*. As plantas foram cultivadas *in vitro* e submetidas aos mesmos tratamentos descritos no item anterior para a caracterização do influxo de amônio e nitrato.

Para o gene *ScNRT1.1*, não foi encontrada diferença de acúmulo de transcritos entre os tratamentos inoculados e não inoculados com a mistura das bactérias diazotróficas, exceto no momento 240 h após a exposição a +N, e as plântulas que não foram inoculadas apresentaram maior acúmulo de transcritos do que as inoculadas (Figura 3.12A). Já o perfil de expressão de *ScNRT1.1* no genótipo 'Chunee' foi distinto daquele encontrado em 'SP70-1143' uma vez que plântulas inoculadas apresentaram maior acúmulo de transcritos desse gene nos tempo 0 h e 240 h (Figura 3.12B). O perfil de expressão desse gene corroborou com os dados de influxo de nitrato obtidos apenas para o tempo 0 h neste genótipo (Figura 3.10B), pois ao longo do tempo com a inoculação das bactérias, houve uma redução na aquisição de N pelas raízes das plântulas de 'Chunee'.

Em cana-de-açúcar, o perfil de expressão do gene *ScNRT2.1*, sendo esse o principal transportador de alta-afinidade para o transporte de nitrato, exibiu alteração dos níveis de transcritos durante a associação de 'SP70-1143' com as bactérias diazotróficas apenas no tempo 0 h, no qual plântulas inoculadas apresentaram menor acúmulo de transcritos do que as plântulas não inoculadas (Figura 3.12C). Esse resultado difere do aumento de influxo de ¹⁵N-nitrato nas plântulas de 'SP70-1143' inoculadas com as bactérias diazotróficas nesse tempo inicial (Figura 3.10A), indicando que não seria esse o transportador responsável por esse fenótipo. Nos demais tempos (24 h, 72 h e 240 h) não houve diferença na expressão entre os tratamentos inoculados ou não inoculados com as bactérias (Figura 3.11C). Para o

gene *ScNAR2.1*, que é uma proteína acessória do gene *ScNRT2.1*, o perfil de expressão não sofreu nenhuma alteração em relação aos tratamentos de inoculação ou não com as bactérias diazotróficas (Figura 3.12E). Por outro lado, as plântulas de ‘Chunee’ tiveram maior expressão do gene *ScNRT2.1* no tempo 0 h quando inoculadas com as bactérias e no tempo 24 h quando não inoculadas com as bactérias (Figura 3.12F). Isso corrobora com o padrão de absorção de nitrato pelas plantas de ‘Chunee’ demonstrando que inicialmente (tempo 0 h) há um efeito benéfico em plântulas associadas com a bactéria, que é perdido ao longo do tempo (Figura 3.10B).

Figura 3.12 - Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*) em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chunee'. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chunee' sob diversos tratamentos. **A, C, E e G**- Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* no genótipo 'SP70-1143'; **B, D, F e H**- Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* no genótipo 'Chunee'. Barras indicam $\pm$ SE, n = 3 réplicas biológicas.

Em geral, o gene *ScNRT2.5* apresentou expressão alterada entre os tratamentos propostos na cultivar 'SP70-1143'. Sob deficiência de N (-N, 0 h) houve maior acúmulo de transcritos de *ScNRT2.5* quando as plântulas estavam em associação com as bactérias diazotróficas (Figura 3.12G). Quando as plântulas foram submetidas à suficiência de N (+N 0,2 mM), a expressão do gene foi maior em plântulas não inoculadas com bactérias diazotróficas no tempo 72 h (Figura 3.12G). Esse comportamento de expressão do gene *ScNRT2.5* em 'SP70-1143' correlaciona com os valores de influxo da fonte nitrato, no qual há um aumento do influxo de N no tempo 0 h em plantas inoculadas que é superado ao longo do tempo pelas plantas não inoculadas, que tiveram maior influxo de nitrato (Figura 3.10A). Portanto, esses dados indicam que o gene *ScNRT2.5* pode estar envolvido na regulação da absorção de nitrato em plantas do genótipo 'SP70-1143' somente no início do tratamento, quando N é limitante. A expressão de *ScNRT2.5* no genótipo 'Chunee' não apresentou diferenças entre os tratamentos, exceto no tempo 24 h, no qual houve um maior acúmulo de transcritos nas plântulas que não foram inoculadas com as bactérias diazotróficas (Figura 3.12H); isso refletiu em um maior influxo de amônio nas plantas não inoculadas desse genótipo no tempo 24 h (Figura 3.10B).

Os resultados de expressão de genes que codificam para proteínas transportadoras de nitrato relacionadas à aquisição dessa fonte inorgânica de N sugerem que enquanto *ScNRT2.1* é regulado em raízes de cana-de-açúcar pela sinalização dependente de *G. diazotrophicus*, o mesmo não ocorre na presença de *G. diazotrophicus* associada a outras diazotróficas como: *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*, o que indica que a inoculação com as cinco bactérias diazotróficas não é capaz de potencializar a regulação desse principal transportador de alta afinidade. Ainda, é possível que, o estabelecimento da interação cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus* seja menor na presença de outras bactérias.

3.3.2.2 Expressão dos transportadores de amônio nas raízes de cana-de-açúcar durante a associação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*

Foram realizadas análises do perfil transcricional dos principais transportadores de amônio em plântulas de 'SP70-1143' e 'Chunee' quando em associação com a combinação das bactérias diazotróficas *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica* a fim de correlacionar com os resultados de influxo de amônio obtidos. A análise da expressão do gene *ScAMT1.1* nas plântulas de 'SP70-1143' no tempo 0 h, sob deficiência de N (-N), mostrou aumento de expressão em plântulas inoculadas com as bactérias diazotróficas em comparação com as plântulas não inoculadas (Figura 3.13A). Porém, esse resultado não correlaciona com o influxo de amônio (Figura 3.11A), pois houve maior absorção de amônio em plântulas não inoculadas. Por outro lado, sob suficiência de N (+N) após 72 h e 240 h de adição exógena de N, a expressão de *ScAMT1.1* diferiu entre as plântulas inoculadas e não inoculadas com o conjunto de bactérias diazotróficas. Nesses tempos, a expressão de *ScAMT1.1* quando 'SP70-1143' estava inoculada com as bactérias diazotróficas foi maior em relação às plantas não inoculadas (Figura 3.13A). Considerando que 'SP70-1143' apresentaram maior influxo de amônio quando elas estavam inoculadas com a mistura das bactérias diazotróficas no tempo de 240 h (Figura 3.11A), pode-se inferir que o gene *ScAMT1.1* estaria sendo regulado pelas bactérias para maior aquisição dessa fonte de N de forma tardia. Para 'Chunee', houve um aumento da expressão do gene *ScAMT1.1* nos tempos 0 h, 72 h e 240 h quando as plântulas estavam inoculadas com as bactérias (Figura 3.13B), porém esse aumento de expressão corroborou apenas o aumento de influxo nas plântulas de 'Chunee' quando inoculadas com as bactérias somente no tempo 0 h (Figura 3.11B).

Figura 3.13 - Análise quantitativa de transcritos de *AMTs* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*) em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143'. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143'. Plântulas foram cultivadas *in vitro* sob deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com as bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica* ou não inoculadas por 48 h (tempo 0 h). Após esse período as plantas passaram por tratamentos de suficiência de N (+N 0,2 mM de N total) por mais 24 h, 72 h e 240 h. **A e C**- Análise quantitativa de transcritos de *AMTs* no genótipo 'SP70-1143'; **B e D**- Análise quantitativa de transcritos de *AMTs* no genótipo 'Chunee'. Barras indicam $\pm$ SE, n= 3 réplicas biológicas

A análise de expressão de outro importante transportador da família AMT envolvido na aquisição de amônio demonstrou que a expressão do gene *ScAMT1.3* em plântulas de 'SP70-1143' apresentou diferença entre os tratamentos de plântulas inoculadas e não inoculadas com as bactérias em todos os tempos, exceto 24 h (Figura 3.13C). As plântulas que não estavam em associação com as bactérias diazotróficas apresentaram maior acúmulo de transcritos do gene *ScAMT1.3* nos tempos 0 h, 72 h e 240 h (Figura 3.13C). Porém, a expressão do gene seguiu apenas no tempo 0 h o maior influxo de amônio observado em plântulas não inoculadas de 'SP70-1143' (Figura 3.11A). Em relação ao genótipo 'Chunee', não

foram observadas diferenças na regulação transcricional do transportador de amônio *ScAMT1.3* em ambos os tratamentos analisados (Figura 3.13D).

Com base nos resultados de caracterização de influxo de fontes de N específica, somada ao perfil de expressão de genes da família *AMT* responsáveis pela aquisição de amônio na faixa de alta-afinidade, é possível sugerir que o transportador *ScAMT1.1* possivelmente é regulado em plantas de 'SP70-1143' durante a associação com bactérias diazotróficas, levando a maiores níveis de absorção de amônio nessa gramínea tardiamente. Esses resultados indicam um efeito promotor no processo de aquisição de N em cana-de-açúcar mediado pela mistura das cinco bactérias diazotróficas *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*, levando a intensificação da sinalização dependente de diazotrófica para indução da absorção de amônio via *ScAMT1.1*.

O efeito da interação das plantas com microrganismos sob a regulação dos transportadores de amônio é conhecido. Em soja (*Glycine max*), o transportador de amônio *GmAMT4.1* responde localmente a presença da micorriza arbuscular (MA), indicando o transporte direto de amônio em arbúsculos induzidos por micorrizas (KOBAYASHI et al., 2010). Os transportadores de alta afinidade da família gênica *AMT* de *L. japonicus* são regulados transcionalmente por micorrizas. Amônio secretado pelas micorrizas se liga a proteína *LjAMT2.2*, localizada em células arbusculares da raiz, facilitando assim o influxo de amônio para o citosol da célula (GUETHER et al., 2009). Além do estudo com micorrizas, transportadores de amônio também respondem a sinalização por bactérias diazotróficas. A associação tomateiro x bactérias fixadoras de N₂ (*Azospirillum brasilense* ou *Azoarcus* sp.) levou a um maior número de transcritos do transportador *LeAMT1.2* em relação a plantas não inoculadas (BECKER et al., 2002). Os resultados de expressão dos genes transportadores de amônio aqui apresentados sugerem que a interação com as cinco bactérias diazotróficas (*G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica*) levou a um maior número de transcritos do gene *ScAMT1.1*. Entretanto, este resultado diverge daquele encontrado para a associação cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus*, na qual a sinalização da bactéria presumivelmente regulou os dois principais transportadores de amônio - *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3*. Isso pode indicar que a sinalização desencadeada somente por *G. diazotrophicus* regula os principais transportadores de amônio, enquanto que a

mistura de *G. diazotrophicus* com outras estirpes de bactérias diazotróficas reduzem esse tipo de sinalização, não levando ao aumento de transcritos do gene *ScAMT1.3*. Outro resultado aqui descrito que corrobora esta forte sinalização de *G. diazotrophicus* com o gene *ScAMT1.3* é que este foi induzido sob alto N (2 mM) quando em associação com *G. diazotrophicus*, demonstrando que a regulação do transportador de amônio por meio da sinalização exercida pela bactéria se sobrepõe a regulação baseada no status de N da planta. Com isso, é possível inferir que o efeito da interação das plantas de cana-de-açúcar com *G. diazotrophicus* na regulação dos transportadores de N pode estar mitigando a regulação baseada na demanda de N disponível e até a regulação oriunda da mistura de várias bactérias diazotróficas.

3.3.3 Efeito da associação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* por períodos longos no processo de aquisição de N em pela raiz de genótipos de cana-de-açúcar

Com o objetivo de verificar se a associação com a bactéria diazotrófica se mantém em períodos mais longos e se a sinalização por ela desencadeada aumentaria os níveis de absorção de N, além de promover o crescimento de cana-de-açúcar, foram realizados experimentos de ^{15}N -nitrato de amônio cumulativo em plantas de cana-de-açúcar, inoculadas ou não com *G. diazotrophicus*. Para isso, as plântulas *in vitro* de ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ foram co-cultivadas ou não com a bactéria por 48 h em condições de deficiência de N (-N), e então foram submetidas ao tratamento de presença de N (+N), no qual 0,2 mM de N total (^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado) foi adicionado ao meio de cultura, por 30 e 60 d. Além disso, um tratamento considerado de alto N (1 mM de ^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado) também foi adicionado a fim de verificar se o efeito positivo da associação com a bactéria diazotrófica também ocorre em altas concentrações de N. Esses cultivos foram desprovidos de fonte de carboidrato.

Inicialmente, foi avaliado a biomassa fresca de plântulas de ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ inoculadas ou não com *G. diazotrophicus* após 30 e 60 d. Não houve diferença para biomassa total (raiz e parte-aérea) tanto no tratamento com baixo N (+N 0,2 mM de N) quanto com alto N (1 mM de N), aos 30 d e aos 60 d entre os

tratamentos inoculado e não-inoculado com *G. diazotrophicus* para o genótipo ‘SP70-1143’ (Figura 3.14A e 3.14B).

Figura 3.14 - Biomassa fresca de plântulas de cana-de-açúcar do genótipo ‘SP70-1143’ durante a interação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Plântulas foram cultivadas *in vitro* em deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou não inoculadas por 48 h. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de baixo N (0,2 mM de N total) ou alto N (1 mM de N total) marcado (¹⁵N-nitrato de amônio duplamente marcado 1% atom ¹⁵N) por 30 e 60 dias e posteriormente tiveram sua massa pesada. **A-** biomassa fresca das plântulas submetidas ao tratamento de baixo N (0,2 mM de ¹⁵N-nitrato de amônio duplamente marcado); **B-** biomassa fresca plântulas submetidas ao tratamento alto N (1 mM de ¹⁵N-nitrato de amônio duplamente marcado). Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre plântulas não inoculadas com a bactéria e plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica dentro de cada tempo amostrado pelo teste de Tukey a 5%, *n*=10 plantas

Similar ao relatado para o genótipo ‘SP70-1143’, o genótipo ‘Chunee’, não apresentou diferenças no acúmulo de biomassa fresca total das plantas inoculadas ou não inoculadas com a bactéria diazotrófica nos tratamentos com baixo N (+N 0,2 mM de N) e alto N (1 mM de N), em ambos os períodos analisados (30 e 60 d) (Figura 3.15A e 3.15B).

Figura 3.15 - Biomassa fresca de plântulas de cana-de-açúcar do genótipo 'Chunee' durante a interação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Plântulas foram cultivadas *in vitro* em deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou não inoculadas por 48 h. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de baixo N (0,2 mM de N total) ou alto N (1 mM de N total) marcado (^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado 1% átomo ^{15}N) por 30 e 60 dias e posteriormente tiveram sua massa pesada. **A-** biomassa fresca das plântulas submetidas ao tratamento de baixo N (0,2 mM de N total); **B-** biomassa fresca plântulas submetidas ao tratamento alto N (1 mM de N total). Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre plântulas não inoculadas com a bactéria e plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica dentro de cada tempo amostrado pelo teste de Tukey a 5%, $n=10$ plantas

Os resultados do experimento de acúmulo de biomassa fresca não foram conclusivos para a avaliação do efeito promotor de crescimento durante a associação com a bactéria diazotrófica *G. diazotrophicus* e cana-de-açúcar. Isso pode ser devido à associação entre *G. diazotrophicus* e cana-de-açúcar ocorrer de forma transiente e instável, o que pode refletir num aumento temporário no processo de aquisição de N em raízes de cana-de-açúcar, como demonstrados nos experimentos já apresentados (Figuras 3.3A, 3.4A e 3.11A). Além disso, as plântulas foram crescidas em meio desprovido de fonte de carboidrato, por isso podem não ter tido o ganho de biomassa como o esperado.

A análise dos resultados de absorção de ^{15}N cumulativo realizados por longo período (30 e 60 d) revelou diferenças entre as plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica em relação às plantas não inoculadas para plântulas de 'SP70-1143' (Figura 3.16).

A análise de acúmulo de ^{15}N -nitrato de amônio durante 30 d das plântulas de 'SP70-1143' e 'Chunee' cultivadas sob baixo N (+N 0,2 mM) não mostrou diferenças entre plântulas inoculadas e não inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.16A). Diferentemente, no tratamento de alto N, o acúmulo de ^{15}N -nitrato de amônio

em plântulas de 'SP70-1143' inoculadas com *G. diazotrophicus* foi maior do que aquele encontrado em plântulas não inoculadas com a bactéria diazotrófica aos 30 d (Figura 3.16B). Plântulas do genótipo 'Chunee' não apresentaram diferenças entre plantas inoculadas ou não com a bactéria diazotrófica (Figura 3.16B). No tempo de 60 d de tratamento, não foram encontradas diferenças de ^{15}N -nitrato de amônio acumulado entre plântulas inoculadas e não inoculadas, tanto de 'SP70-1143' quanto de 'Chunee', em ambos os tratamentos de baixo N (Figura 3.16C) e alto N (Figura 3.16D). Em resumo, houve diferença no ^{15}N cumulativo entre as plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica em relação às plantas não inoculadas somente para o genótipo 'SP70-1143' sob alto N (+N 1 mM) aos 30 d.

Figura 3.16 – ^{15}N acumulado em raízes e parte aérea de cana-de-açúcar do genótipo ‘SP70-1143’ e ‘Chuneé’ durante a interação com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Plântulas foram cultivadas *in vitro* em deficiência de N por 24 h e então foram inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou não inoculadas por 48 h. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de baixo N (0,2 mM de N total) ou alto N (1 mM de N total) marcado (^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado 1% atom ^{15}N) por 30 e 60 dias e posteriormente tiveram suas raízes analisadas quanto ao acúmulo de ^{15}N . **A-** acúmulo de ^{15}N em raízes e parte-aérea de plântulas de ‘SP70-1143’ e ‘Chuneé’ submetidas ao tratamento de baixo N (0,2 mM de N total) por 30 dias; **B-** acúmulo de ^{15}N em raízes e parte-aérea de plântulas de ‘SP70-1143’ e ‘Chuneé’ submetidas ao tratamento alto N (1 mM de N total) por 30 dias; **C-** acúmulo de ^{15}N em raízes e parte-aérea de plântulas de ‘SP70-1143’ e ‘Chuneé’ submetidas ao tratamento de baixo N (0,2 mM de N total) por 60 dias; **D-** acúmulo de ^{15}N em raízes e parte-aérea de plântulas de ‘SP70-1143’ e ‘Chuneé’ submetidas ao tratamento alto N (1 mM de N total) por 60 dias. Barras indicam $\pm \text{SE}$, $n=6$ plantas

Como relatado nos resultados aqui descritos dos experimentos de período curto (0 h, 24 h, 72 h e 240 h) sob baixo N (0,2 mM), a inoculação dos genótipos ‘SP70-1143 e ‘Chuneé’ com *G. diazotrophicus* não exerceu um efeito positivo na absorção de nitrato de amônio como fonte de N. Após a adição exógena dessa fonte de N, houve uma indução na absorção de N para ‘SP70-1143’ apenas em plantas não inoculadas, enquanto que plantas com *G. diazotrophicus* tiveram significativa redução na aquisição de ^{15}N , o que sugeriu uma regulação negativa no processo de

absorção de nitrato de amônio na presença de bactérias diazotróficas em períodos curtos (0 h, 24 h, 72 h e 240 h). A exposição dos genótipos a um longo período de cultivo (30 d e 60 d) sob baixo N (0,2 mM) também não mostrou alterações no acúmulo de N entre as plantas inoculadas e não inoculadas com a bactéria diazotrófica. Com isso, é possível sugerir que a presença de nitrato de amônio em baixa concentração (0,2 mM) afeta o processo de associação de cana-de-açúcar x bactérias diazotróficas.

Já os experimentos envolvendo plântulas dos genótipos 'SP70-1143' e 'Chunee' crescidas cultivadas sob alta concentração de nitrato de amônio (2 mM) por períodos curtos (72 h e 240 h) indicaram diferenças no processo de aquisição dessa fonte de N. As plântulas de 'SP70-1143' inoculadas com a bactéria apresentaram uma indução na absorção de ^{15}N nas raízes, enquanto as plântulas do genótipo 'Chunee' não responderam a inoculação com *G. diazotrophicus*, sugerindo, assim, uma regulação positiva no processo de aquisição de nitrato de amônio na presença da bactéria diazotrófica somente em plântulas de 'SP70-1143'. Nos experimentos mantidos por períodos longos (30 d e 60 d), foi encontrada diferença no acúmulo de ^{15}N entre as plântulas de 'SP70-1143' inoculadas com a bactéria diazotrófica em relação às plantas não inoculadas sob alto N (+N 1 mM) aos 30 d, sugerindo que o aumento da concentração de nitrato de amônio favoreceu a associação de *G. diazotrophicus* x cana-de-açúcar regulando positivamente o acúmulo de N. Estudos sobre a comunidade bacteriana da rizosfera de cana-de-açúcar sob condições distintas de fertilização com nitrogênio (sem adubação ou 120 kg ha⁻¹ de N), relacionaram uma maior diversidade de táxons às plantas que receberam adubação nitrogenada em relação às plantas que não foram fertilizadas com N, sendo encontrados gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio e/ou promotoras do crescimento, como *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Burkholderia* (PISA et al., 2011). Em contraste, no estudo aqui descrito anteriormente, a análise de táxons em nível de família revelou uma maior diversidade da comunidade bacteriana associada às plantas que não receberam adubação nitrogenada (0 kg de N ha⁻¹) em relação às plantas que receberam fertilização de N (100 kg de N ha⁻¹) (Capítulo 2 - Figura 2.6).

Com isso, é possível sugerir que a maior disponibilidade de N favorece a associação *G. diazotrophicus* x cana-de-açúcar. Porém, no período mais longo de estudo (60 d), os resultados mostraram que não houve um aumento no acúmulo de

^{15}N de plantas de 'SP70-1143' inoculadas com a bactéria diazotrófica em relação às plântulas não inoculadas, o que indica que ao longo do tempo a associação positiva entre bactéria diazotrófica x cana-de-açúcar é apenas transiente, não persistindo no período mais longo do estudo.

3.3.3.1 Expressão dos transportadores de nitrato nas raízes de cana-de-açúcar durante a associação com *Gluconacetobacter diazotrophicus* por períodos longos

Para correlacionar os resultados de ^{15}N -nitrato de amônio cumulativo com as diversas proteínas transportadoras de N foram realizadas análises do perfil transcricional dos transportadores de nitrato nas raízes dos genótipos 'SP70-1143' e 'Chunee' durante associação com *G. diazotrophicus* por períodos longos (30 d e 60 d) sob baixo N (+N 0,2 mM) ou alto N (+N 1 mM).

Ao analisar o perfil transcricional dos genes do genótipo 'SP70-1143' aos 30 d sob baixo N (+N 0,2 mM), observou-se que apenas o gene *ScNRT1.1* apresentou diferenças entre os tratamentos inoculados e não inoculados com a bactéria diazotrófica (Figura 3.17A), sendo que as plântulas inoculadas apresentaram maior acúmulo de transcritos desse gene. Essa diferença na expressão refletiu no aumento de acúmulo de ^{15}N nas plântulas que estavam inoculadas com *G. diazotrophicus* (Figura 3.16A). Para os genes *ScNRT2.1*, *ScNAR2.1* e *ScNRT2.5* não houve diferenças significativas no perfil de expressão em relação aos tratamentos de inoculação ou não com as bactérias diazotróficas (Figuras 3.17C, 3.17E e 3.17G).

Para o genótipo 'Chunee' não foram encontradas diferenças significativas nos perfis de expressão dos genes codificadores de transportadores de nitrato das plântulas inoculadas ou não com a bactéria diazotrófica, Esse resultado corrobora os níveis constantes de ^{15}N acumulado entre plântulas inoculadas e não inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.16A).

Figura 3.17 - Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*) em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chunee' sob diferentes condições de N em 30 d. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chunee' sob diversos tratamentos. **A, C, E e G**- Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* no genótipo 'SP70-1143'; **B, D, F e H**- Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* no genótipo 'Chunee'. Barras indicam $\pm$ SE, $n=3$ réplicas biológicas.

A análise da expressão dos genes que transportam nitrato aos 30 d sob presença de alto N (+N 1 mM) apresentou para o genótipo 'SP70-1143' um maior acúmulo dos principais transportadores de nitrato - *ScNRT1.1* e *ScNRT2.1* - em plantas inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figuras 3.17B e 3.17D), indicando que após 30 d esses genes ainda respondem a sinalização da bactéria diazotrófica, e como consequência há um aumento do conteúdo de ^{15}N -nitrato de amônio acumulado pelas plântulas de 'SP70-1143' inoculada com *G. diazotrophicus* sob alto N (Figura 3.16B). Para os genes *ScNAR2.1* e *ScNRT2.5* não houve diferenças expressivas no perfil de expressão em relação aos tratamentos de inoculação ou não com as bactérias diazotróficas (Figuras 3.17F e 3.17G). Nos experimentos em que plântulas de 'SP70-1143' estavam expostas a períodos curtos (72 h e 240 h) sob alto N (+N 2 mM), a sinalização desencadeada pela bactéria regulou positivamente os transportadores de alta-afinidade *ScNRT2.1* e *ScNRT2.5*. Com isso, a resposta desencadeada em curto período de tempo sob alto N se manteve até o período de 30 d, levando a um maior acúmulo de ^{15}N -nitrato de amônio em plântulas que estavam em associação com *G. diazotrophicus*.

Por outro lado, no genótipo 'Chunee', a expressão do transportador *ScNRT1.1* foi maior em plântulas não inoculadas em relação às plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.17B). Perfil transcricional semelhante foi encontrado para os genes *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* (Figura 3.17D e 3.17F); porém, esses dados não refletem em diferenças entre o ^{15}N -nitrato de amônio acumulado durante 30 d pelas plântulas inoculadas ou não com a bactéria diazotrófica sob alto N (Figura 3.16B). O gene *ScNRT2.5* não apresentou diferenças no perfil transcricional em relação aos tratamentos de inoculação ou não com as bactérias diazotróficas em 'Chunee' (Figura 3.17H).

No período mais prolongado de estudo (60 d), sob baixo N (0,2 mM) e, de modo geral a análise dos principais genes responsáveis pelo transporte de nitrato (*ScNRT1.1*, *ScNRT2.1*, *ScNAR2.1*, *ScNRT2.5*) em cana-de-açúcar no genótipo 'SP70-1143' não demonstrou diferenças entre os tratamentos inoculados ou não inoculados com a bactéria diazotrófica (Figuras 3.18A, 3.18C, 3.18E e 3.18G). Este resultado sugere que a inoculação com *G. diazotrophicus* não favoreceu o acúmulo de transcritos desses transportadores de nitrato por um período prolongado (60 d) sob alto N, e consequentemente isso não refletiu em um aumento do ^{15}N acumulado no período de 60 d (Figura 3.16C). Diferentemente, nos experimentos de curto

período (0 h, 24 h, 72 h e 240 h) estudados com o genótipo 'SP70-1143', os resultados da expressão dos transportadores de nitrato sob baixo N (+N 0,2 mM) indicaram que a inoculação com a bactéria *G. diazotrophicus* aumentava a expressão de dos transportadores de alta-afinidade, *ScNRT2.1* e *ScNRT2.5*, e do transportador de baixa-afinidade *ScNRT1.1*.

Baseado nesses resultados é possível sugerir que a sinalização desencadeada por *G. diazotrophicus* atua de forma transiente no aumento da expressão dos transportadores de nitrato, sendo essa maior expressão encontrada em curtos períodos, enquanto ao longo do tempo (60 d), a bactéria diazotrófica provavelmente não se estabeleceu nas plântulas de cana-de-açúcar (Capítulo 2 – Tabela 2.2), não sinalizando para os transportadores responsáveis pelo transporte de nitrato.

Para o genótipo 'Chunee' não foram encontradas diferenças nos perfis de expressão dos transportadores de nitrato das plântulas inoculadas ou não com a bactéria diazotrófica, o que reflete os níveis constantes de ^{15}N acumulado entre plântulas inoculadas e não inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.16C).

Figura 3.18 - Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*) em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chuneé' sob diferentes condições de N em 60 d. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chuneé' sob diversos tratamentos. **A, C, E e G-** Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* no genótipo 'SP70-1143'; **B, D, F e H-** Análise quantitativa de transcritos de *NRTs* no genótipo 'Chuneé'. Barras indicam $\pm$ SE, $n= 3$ réplicas biológicas.

As análises da expressão dos transportadores de nitrato sob alto N (+N 1 mM) no período mais prolongado de estudo (60 d), mostraram que para o genótipo 'SP70-1143' não houve diferenças significativas na expressão nos genes *ScNRT1.1*, *ScNRT2.1*, *ScNAR2.1* e *ScNRT2.5* entre os tratamentos inoculados ou não inoculados com a bactéria diazotrófica (Figuras 3.18B, 3.18D, 3.18F e 3.18H), assim como ocorreu no mesmo tempo amostrado porém sob baixo N (+N 0,2 mM). A resposta positiva da inoculação encontrada em plântulas de 'SP70-1143' que estavam a 30 d sob alto N (+N 1 mM), não se manteve até o período mais longo do estudo (60 d), sugerindo que a associação cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus* não persiste ao longo do tempo.

Para o genótipo 'Chunee', a expressão de *ScNRT1.1* e *ScNRT2.1* mostrou que plântulas não inoculadas tiveram maior expressão desses genes em relação às plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica, sob alto N (+N 1 mM) (Figuras 3.18B e 3.18D). Esses dados, entretanto, não corroboram os dados obtidos pela análise de ¹⁵N-nitrato de amônio cumulativo, no qual não foram encontradas diferenças para o acúmulo de N entre plântulas inoculadas ou não com a bactéria diazotrófica (Figura 3.16D). Os genes *ScNAR2.1* e *ScNRT2.5* não apresentaram diferenças no perfil transcricional em relação aos tratamentos de inoculação ou não com as bactérias diazotróficas (Figuras 3.18F e 3.18H). Considerando que o genótipo 'Chunee', pode-se sugerir que a inoculação com a bactéria diazotrófica não é benéfica uma vez que os resultados dos perfis transcricionais dos genes de nitrato mostram menor acúmulo de transcritos nas plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus*.

Portanto, os resultados obtidos para a expressão de genes relacionados ao transporte de nitrato, associados aos resultados de acúmulo de ¹⁵N-nitrato de amônio por períodos longos, sugerem que *ScNRT1.1* e *ScNRT2.1* são regulados em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' por meio de sinalização desencadeada por *G. diazotrophicus*, quando as plantas estão em alta concentração de N (+N 1 mM) no período até 30 d, o que indica que a inoculação com essa bactéria pode ser benéfica para determinados genótipos em certos períodos de tempo.

3.3.3.2 Expressão dos transportadores de amônio nas raízes de cana-de-açúcar durante a associação com *Gluconacetobacter diazotrophicus* por períodos longos

A expressão de membros da família gênica *AMTs* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*) foi também avaliada nos períodos longos a fim de se observar se os genes transportadores de amônio são afetados pela associação com a bactéria diazotrófica ao longo de períodos de cultivo de 30 d e 60 d. A análise dos transportadores de amônio em raízes de cana-de-açúcar dos genótipos ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ aos 30 d sob baixo N (+N 0,2 mM) não apresentou diferenças entre os tratamentos inoculados ou não inoculados com a bactéria diazotrófica (Figuras 3.19A e 3.19 C).

Por outro lado, sob concentração de N de 1 mM, houve um aumento na expressão do gene *ScAMT1.1* nas plântulas inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.19B). Já o gene do transportador *ScAMT1.3* apresentou perfil de expressão similar entre os tratamentos analisados em relação à inoculação (Figura 3.19D). Pode-se sugerir que o acúmulo de transcritos do transportador *ScAMT1.1* refletiu o aumento do ¹⁵N-amônio acumulado no tempo de 30 d para as plântulas de ‘SP70-1143’ que foram inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.16B). Para o genótipo ‘Chunee’, o perfil de expressão dos genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* foi similar para todos os tratamentos e concentrações de N estudadas no tempo 30 d (Figura 3.19).

Figura 3.19 - Análise quantitativa de transcritos de *AMTs* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*) em raízes de cana-de-açúcar do genótipo 'SP70-1143' e 'Chuneé' sob diferentes condições de N em 30 d. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar dos genótipos 'SP70-1143' e 'Chuneé' após 30 dias. Plântulas foram cultivadas *in vitro* sob deficiência de N por 1 dia e então foram inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou não inoculadas por 2 dias. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de baixo N (0,2 mM de N total) ou alto N (1 mM de N total) marcado (^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado 1% atom ^{15}N) por 30 dias. Barras indicam $\pm$ SE, $n=3$ réplicas biológicas

A análise dos transportadores de amônio no tempo de 60 d revelou para o genótipo 'SP70-1143' que os genes *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* tiveram maior acúmulo de transcritos desses genes em plântulas inoculadas com *G. diazotrophicus* sob condição de 0,2 mM de N (Figura 3.20A e 3.20C). Entretanto, a maior expressão encontrada para os genes transportadores de amônio em 'SP70-1143' não refletiu em acúmulo de ^{15}N -amônio (Figura 3.16D). Já aos 60 d, sob alto N (1 mM) as plântulas de 'SP70-1143' inoculadas com a bactéria diazotrófica somente apresentaram acúmulo de transcritos do gene *ScAMT1.3* (Figura 3.18D), porém, novamente, esse aumento de expressão não refletiu em acúmulo de N para as plantas inoculadas com a bactéria diazotrófica (Figura 3.16D). Para o genótipo

‘Chunee’, o perfil de expressão de *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3* foi similar aos 60 d para ambas as condições de N (Figura 3.20).

Figura 3.20 - Análise quantitativa de transcritos de *AMTs* (AMMONIUM TRANSPORTERS) em raízes de cana-de-açúcar do genótipo ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ sob diferentes condições de N em 60 d. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar dos genótipos ‘SP70-1143’ e ‘Chunee’ após 60 dias. Plântulas foram cultivadas *in vitro* sob deficiência de N por 1 dia e então foram inoculadas com a bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* ou não inoculadas por 2 dias. Após esse período as plantas passaram por tratamentos de baixo N (0,2 mM de N total) ou alto N (1 mM de N total) marcado (^{15}N -nitrato de amônio duplamente marcado 1% atom ^{15}N) por 60 dias. Barras indicam $\pm\text{SE}$, $n=3$ réplicas biológicas

Em resumo, para plantas de cana-de-açúcar cultivadas em presença de nitrato de amônio por períodos longos, a análise ^{15}N -nitrato de amônio cumulativo aliada a análise do perfil de expressão dos genes transportadores de nitrato e amônio mostrou que a associação entre cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus* pode ser benéfica em plantas de ‘SP70-1143’ aos 30 d. A sinalização desencadeada pela interação com a bactéria na regulação dos transportadores de nitrato *ScNRT1.1* e *ScNRT2.1*, e no transportador de amônio *ScAMT1.1*, levou a um maior acúmulo de ^{15}N -nitrato de amônio nas plantas de cana-de-açúcar. No período mais tardio de estudo (60 d), a sinalização para o processo de aquisição de N em raízes de cana-

de-açúcar não permaneceu ativa mediante a associação com *G. diazotrophicus*. Com isso, pode-se concluir que a associação de *G. diazotrophicus* x cana-de-açúcar foi estável no período de 30 d, regulando a absorção de N, porém ao longo do tempo (60 d) a sinalização feita por *G. diazotrophicus* não consegue manter a maior absorção de N em raízes de cana-de-açúcar.

3.4 Conclusões

A caracterização do transporte de N aliada ao perfil de expressão gênica das proteínas transportadoras de N em genótipos contrastantes de cana-de-açúcar inoculados ou não com bactérias diazotróficas, de modo geral, indicaram que a associação de *G. diazotrophicus* ou de uma mistura de bactérias diazotróficas e cana-de-açúcar foi estável em alguns dos tempos estudados e sua sinalização desencadeou maiores níveis de expressão dos principais transportadores de N em cana-de-açúcar, o que resultou em maiores níveis de absorção de N em plantas inoculadas com as bactérias diazotróficas.

O estudo de fontes específicas de N, como nitrato e amônio, revelou que a interação entre cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus* desencadeou a regulação positiva do gene codificador do transportador de nitrato *ScNRT2.1*, o que levou a uma tendência no aumento no influxo de nitrato, e dos genes de transportadores de amônio *ScAMT1.1* e *ScAMT1.3*, que desencadeou maiores valores de influxo de amônio.

Já os estudos com a associação cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica* revelaram que o transportador *ScAMT1.1* possivelmente é regulado durante a associação com as bactérias diazotróficas levando a maiores níveis de absorção de amônio.

Por sua vez, a interação entre cana-de-açúcar x *G. diazotrophicus* por períodos prolongados mostrou-se benéfica, uma vez que a sinalização desencadeada pela bactéria possivelmente regulou os transportadores de nitrato *ScNRT1.1* e *ScNRT2.1*, e o transportador de amônio *ScAMT1.1*, levando ao maior acúmulo de ¹⁵N-nitrato de amônio nas plantas de cana-de-açúcar.

Referências

- AUSTIN, A.T.; BUSTAMANTE, M.C.; NARDOTO G.B.; MITRE S.K., PÉREZ T.; OMETTO J.P.H.B.; ASCARRUNZ N.L.; FORTI M.C.; LONGO K.; GAVITO M.E.; ENRICH-PRAST A.; MARTINELLI L.A. Latin America' s nitrogen challenge. **Science**, Washington, v. 340, n. 6129, p. 149, 2013.
- BAI, H.; EURING, D.; VOLMER, K.; JANZ, D.; POLLE, A. The nitrate transporter (NRT) gene family in poplar. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 8, e.72126, 2013.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 36, p. 86–93, 1986.
- BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.; DÖBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane: reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 29, n. 4, p. 417-423, 2002.
- BECKER, D.; STANKE, R.; FENDRIK, I.; FROMMER, W.B.; VANDERLEYDEN, J.; KAISER, W.M.; HEDRICH, R. Expression of the NH₄⁺ - transporter gene LeAMT1;2 is induced in tomato roots upon association with N₂-fixing bacteria. **Planta**, Berlin, v. 215, p. 424-429, 2002.
- BIGGS, I.M.; STEWART, G.R.; WILSON, J.R.; CRITCHLEY, C. N-15 natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 238, p. 21-20, 2002.
- BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of the 15N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, Sidney, v. 28, p. 889-895, 2001.
- CANUTO, E.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 62-64, 2003.
- CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, p. 23–31. 1988.
- CEREZO, M.; TILLARD, P.; FILLEUR, S.; MUÑOS, S.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 1, p. 262–271, 2001.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Itaguaí: EMBRAPA, CNPAB, 1995. 60 p.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Review in Plant Sciences**, London, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

FENG, H.; YAN, M.; FAN, X.; LI, B.; SHEN, Q.; MILLER, A.J.; XU, G. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 7, p. 2319–2332, 2011.

FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, E. Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. **Planta**, Berlin, v. 207, n. 3, p. 1999.

FILLEUR, S.; DORBE, M.F.; CEREZO, M.; ORSEL, M.; GRANIER, F.; GOJON, A.; DANIEL-VEDELE, F. An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 489, n. 2/3, p. 220–224, 2001.

FORDE, B.G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1465, n. 1/2, p. 219–235, 2000.

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

GAZZARRINI, S.; LEJAY, L.; GOJON, A.; NINNEMANN, O.; FROMMER, W.B.; VON WIREN, N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 3, p. 937–947, 1999.

GLASS, A.D.M.; BRITO, D.T.; KAISER, B.N.; KRONZUCKER, H.J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.R.; SIDDIQI, M.Y.; SILIM, S.M.; VIDMAR, J.J.; ZHUO, D. Nitrogen transport in plants, with an emphasis on the regulation of fluxes to match plant demand. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Hoboken, v. 164, p. 199–207, 2001.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; NASTARI, P.M.; LUCON, O. Ethanol learning curve-the Brazilian experience. **Biomass Bioenergy**, Amsterdam, v. 26, p. 301-304, 2004.

GUETHER, M.; NEUHÄUSER, B.; BALESTRINI, R.; DYNOWSKI, M.; LUDEWIG, U.; BONFANTE, P.A. Mycorrhizal specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Physiology**, Rockville, v. 150, p. 73-83, 2009.

HATZFELD, Y.; SAITO, K. Identification of two putative nitrate transporters highly homologous to *CHL1* from *Arabidopsis thaliana* (Accession Nos. AJ011604 and AJ131464) (PGR 99–018). **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 805, 1999.

HILDEBRANDT, U.; SCHMELZER, E.; BOTHE, H. Expression of nitrate transporter genes in tomato colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 115, p. 125–136, 2002.

HO, C.H.; LIN, S.H.; HU, H.C.; TSAY, Y.F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, Cambridge, v. 138, n. 6, p. 1184–1194, 2009.

HOEFSLOOT, G.; TERMORSHUIZEN, A.J.; WATT, D.A.; CRAMER, M.D. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. **Plant and Soil**, The Hague, v. 277, p. 85–96, 2005.

HUANG, N.C.; LIU, K.H.; LO, H.J.; TSAY, Y.F. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1381–1392, 1999.

KECHID, M.; DESBROSSES, G.; ROKHSI, W.; VAROQUAUX, F.; DJEKOUN, A.; TOURAINE, B. The NRT2.5 and NRT2.6 genes are involved in growth promotion of Arabidopsis by the plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. **New Phytologist**, London, v. 198, p. 514–524, 2013.

KOBAE, Y.; TAMURA, Y.; TAKAI, S.; BANBA, M.; HATA, S.; Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 51, p. 1411–1415, 2010.

KOTUR, Z.; GLASS, A.D. A 150 kDa Plasma membrane complex of AtNRT2.5 and AtNAR2.1 is the major contributor to constitutive high-affinity nitrate influx in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 38, n. 8, p. 1490–1502, 2014.

KRONZUCKER, H.J.; GLASS, A.D.M.; SIDDIQI, M.Y. Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. analysis of component fluxes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 283–291, 1999.

KROUK, G.; LACOMBE, B.; BIELACH, A.; PERRINE-WALKER, F.; MALINSKA, K.; MOUNIER, E.; HOYEROVA, K.; TILLARD, P.; LEON, S.; LJUNG, K.; ZAZIMALOVA, E.; BENKOVA, E.; NACRY, P.; GOJON, A. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 18, n. 6, p. 927–937, 2010.

LEAL, G.A.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; FIGUEIRA, A. Genes differentially expressed in *Theobroma cacao* associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis perniciosa*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 279–292, 2007.

LEE, T.S.G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 10, p. 47–55, 1987.

LEJAY, L.; TILLARD, P.; LEPETIT, M.; OLIVE, F.D.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Molecular and functional regulation of two NO₃⁻ uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 509–519, 1999.

LEZHNEVA, L.; KIBA, T.; FERIA-BOURRELLIER, A.B.; LAFOUGE, F.; BOUTET-MERCEY, S.; ZOUFAN, P.; SAKAKIBARA, H.; DANIEL-VEDELE, F.; KRAPP, A. The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 80, n. 2, p. 230–241, 2014.

LI, W.; WANG, Y.; OKAMOTO, M.; CRAWFORD, N.M.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D. Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n. 1, p. 425–433, 2007.

LIU, K.-H.; TSAY, Y.-F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 1005–1013, 2003.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, San Diego, v. 4, p. 402-408, 2001.

LOQUÉ, D.; von WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1293–1305, 2004.

LOQUÉ, D.; YUAN, L.; KOJIMA, S.; GOJON, A.; WIRTH, J.; GAZZARRINI, S.; ISHIYAMA, K.; TAKAHASHI, H. Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. **Plant Journal**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 522–534, 2006.

MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

MAGNANI, G.S.; CRUZ, L.M.; WEBER, H.; BESPALHOK, J.C.; DAROS, E.; BAURA, V.; YATES, M.G.; MONTEIRO, R.A.; FAORO, H.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Culture-independent analysis of endophytic bacterial communities associated with Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 4549-4558, 2013.

MANTELIN, S.; DESBROSSES, L.E.; LARCHER, M.; TRANBARGER, T. J.; CLEYET-MAREL, J.; TOURAIN, B. Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. **Planta**, Berlin, v. 223, p. 591–603, 2006.

MARSCHNER, H.; MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. New York: Academic Press, 2012. 651 p.

MEDEIROS, A.F.A.; POLIDORO, J.C.; REIS, V.M. Nitrogen source effect on *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonization of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 279, p. 141-152, 2006.

MILLER, A.J.; FAN, X.; ORSEL, M.; STITH, S.J.; WELLS, D.M. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2297–2306, 2007.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; VADIVELU, M. Antagonistic potential of N₂-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotricum falcatum* went a causal organism of red-rot of sugarcane. **Current Science**, Bangalore, v.78, n. 9, p. 193-198, 2000.

MUTHUKUMARASAMY, R.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C.; REVATHI, G. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, Bangalore, v. 83, p. 137-145, 2002.

OKAMOTO, M.; KUMAR, A.; LI, W.; WANG, Y.; SIDDIQI, M.Y.; CRAWFORD, N.M.; GLASS A.D. High-affinity nitrate transport in roots of *Arabidopsis* depends on expression of the NAR2-Like gene *AtNRT3.1*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 1036–1046, 2006.

OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E.L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 59-61, 2003.

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

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

ORSEL, M.; CHOPIN, F.; LELEU, O.; SMITH, S.J.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F.; MILLER, A.J. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis*: physiology and protein-protein interaction. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, n. 3, p. 1304–1317, 2006.

PERSELLO-CARTINEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant rhizobacteria interactions. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 26, n. 2, p. 189-199, 2003.

PISA, G.; MAGNANI, G.S.; WEBER, H.; SOUZA, E.M.; FAORO, H.; MONTEIRO, R.A.; DAROS, E.; BAURA, V.; BESPALHOK, J.P.; PEDROSA, F.O.; CRUZ, L.M. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 12, p. 1215-1221, 2011.

PLETT, D.; TOUBIA, J.; GARNETT, T.; TESTER, M.; KAISER, B.N.; BAUMANN, U. Dichotomy in the NRT Gene families of dicots and grass species. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, e. 15289, 2010.

QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; BORSA, P.; DESTRO, T.; MALAGOLI, M. Expression of a putative high-affinity NO₃⁻ transporter and of an H⁺-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 1023–1031, 2003.

REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; OLIVEIRA, A.L.M.; REIS JR, F.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 206, p. 205–211, 1999.

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

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 4, e. 19045, 2011.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. 12, n. 1/2, p. 16, 1986.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, p. 319–339, 1999.

ROSSITER-RACHOR N.A., SETTERFIELD S.A., DOUGLAS M.M., HUTLEY L.B., COOK G.D., SCHMIDT S. Invasive *Andropogon gayanus* (gamba grass) is an ecosystem transformer of nitrogen relations in Australian savanna. **Ecological Applications**, v. 19, p. 1546–60, 2009.

SCHRÖDER, J.; SCHOLEFIELD, D.; CABRAL, F. The effects of nutrient losses from agriculture on ground and surface water quality: the position of science in development indicator for regulation. **Environmental Science and Policy**, Amsterdam, v. 7, p. 15–23, 2004.

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

SEREZINO, L.H.D. **Caracterização fisiológica e transcricional dos processos de aquisição e remobilização de nitrato em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.).**

2015. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.; RUTH, T.J.; RUFTY, T.W. Studies of the uptake of nitrate in barley (I. Kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx). **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, p. 1426–1432, 1990.

SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 44, p. 1396–1402, 2003.

SUBBARAO, G.V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M.P.; ONO, H.; MORETA, D.E.; SALCEDO, A.F.; YOSHIHASHI, A.T.; ISHIKAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I.M.; LASCANO, C.E.; BERRY W.L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in Brachiaria pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 106, n. 41, p. 17302–17307, 2009.

SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A.K.; YADAV, R.L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 47, p.155-162, 2005.

SUMAN, A.; SHRIVASTAVA, A.K.; GAUR, A.; SINGH, P.; SINGH, J.; YADAV, R.L. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 54, p.1-11, 2008.

TONG, Y.; ZHOU, J.J.; LI, Z.; MILLER, A.J. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. **Plant Journal**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 442–450, 2005.

TSAY, Y.F.; SCHROEDER, J.I.; FELDMANN, K.A.; CRAWFORD, N.M. The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. **Cell**, Cambridge, v. 72, n. 5, p. 705–713, 1993.

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

VIDMAR, J.J.; ZHUO, D.; SIDDIQI, M.Y.; SCHJOERRING, J.K.; TOURAINE, B.; GLASS, A.D. Regulation of HvNRT2 expression and high- affinity nitrate influx in roots of *Hordeum vulgare* by ammonium and amino acids. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 307-318, 2000.

VITOUSEK, P.M.; NAYLOR, R.; CREWS, T.; DAVID, M.B.; DRINKWATER, L.E.; HOLLAND, E.;JOHNES, P.J.; KATZENBERGER, J.; MARTINELLI, L.A.; MATSON, P.A.; NZIGUHEBA, G.; OJIMA, D.; PALM C.A.;ROBERTSON, G.P.; SANCHEZ, P.A.; TOWNSEND, A.R.; ZHANG, F.S. Agriculture nutrient imbalances in agricultural development. **Science**, Washington, v. 324, p. 1519-1520, 2009.

von WITTGENSTEIN, N.J.J.B.; LE, C.H.; HAWKINS, B.J.; EHLTING, J. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n. 3, p. 11, 2014.

YUAN, L.; LOQUE, D.; KOJIMA, S.; RAUCH, S.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; TAKAHASHI, H.; von WIRÉN, N. The organization of high-affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 8, p. 2636–2652, 2007.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A principal hipótese deste trabalho era que a interação de bactérias diazotróficas com cana-de-açúcar poderia favorecer a aquisição de formas inorgânicas de N pela regulação diferencial dos genes codificadores dos transportadores de amônio e/ou nitrato. Pelos diversos experimentos conduzidos, foi possível detectar um efeito da inoculação com bactérias diazotróficas, em particular *G. diazotrophicus* na regulação da expressão dos principais genes de transportadores de nitrato e amônio, o que levou a um maior influxo dessas fontes de N em plantas de 'SP70-1143', um genótipo com maiores taxas de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Em contraponto esse efeito benéfico não foi evidenciado para o genótipo considerado por apresentar menores taxas de FBN, 'Chunee'. A caracterização da aquisição de ^{15}N somada ao perfil de expressão dos principais genes de transportadores de amônio e nitrato dos genótipos contrastantes para a FBN estão resumidos na Figura 1, sendo apresentados o resumo dos resultados de plântulas inoculadas em relação àquelas não inoculadas.

De modo geral, a associação de 'SP70-1143' com *G. diazotrophicus* desencadeou uma regulação positiva de genes que codificam transportadores de nitrato e dos principais genes de transportadores de amônio, o que levou a uma tendência no aumento no influxo de nitrato, junto com maiores valores de influxo de amônio (Figura 1C). Por outro lado, a inoculação de 'SP70-1143' com a mistura das cinco bactérias (*G. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*) aumentou o número de transcritos de um transportador de amônio, levando a maiores níveis de absorção dessa fonte de N (Figura 1D). Além disso, a interação entre 'SP70-1143' x *G. diazotrophicus* mostrou-se benéfica, possivelmente regulando transportadores de nitrato e amônio, levando ao maior acúmulo de ^{15}N -nitrato de amônio no ensaio por períodos mais longos (Figura 1E). Por outro lado, o genótipo 'Chunee', na maioria dos casos estudados, não apresentou aumento no influxo das fontes e nos genes transportadores de N.

Embora alguns dados não sejam totalmente conclusivos, a resposta desencadeada pela bactéria gerou diferenças nos perfis de absorção e expressão

dos genes relacionados ao N entre as plântulas inoculadas e não inoculadas, particularmente para 'SP70-1143'.

Figura 1 - Resumo da caracterização fisiológica e molecular da interação cana-de-açúcar x bactérias diazotróficas nos genótipos 'SP70-1143' e 'Chunee'. Legenda – Cor verde indica aumento de influxo e expressão; Cor vermelha indica diminuição de influxo e expressão; Cor cinza não indica diferença entre os tratamentos inoculados ou não inoculados

Um dos grandes desafios para elucidação de forma conclusiva sobre o papel das bactérias diazotróficas reside no sistema experimental disponível. Foram encontradas dificuldades quanto ao controle utilizado (plântulas não inoculadas), visto que as plântulas cultivadas *in vitro* possuem uma comunidade microbiana intrínseca, e que pode diferir entre genótipos. A inoculação artificial alterou a comunidade bacteriana, porém a permanência desse inóculo não foi estável, o que pode ser devido a competição com as bactérias já existentes. Uma alternativa para esse viés seria a tentativa de métodos para a eliminação de microrganismos endofíticos em plântulas microprogagadas *in vitro*, com o uso de antibióticos, por exemplo, mas que poderiam afetar a viabilidade e a manutenção das plântulas. A necessidade de cultivo das plântulas *in vitro* com fonte de carbono também limita a duração do cultivo devido ao crescimento excessivo do inóculo, enquanto que a ausência de fonte de carboidrato requer o estabelecimento de culturas fotoautotróficas.

A alternativa de realização de experimentos *in vivo* não seria favorável uma vez que o inóculo artificial pode apresentar diferenças quanto à capacidade competitiva frente aos endofíticos encontrados naturalmente em cana-de-açúcar e/ou no substrato de crescimento das plantas. A própria escolha do substrato representa uma limitação, assim como o acompanhamento e quantificação do estabelecimento do inóculo, considerando que iniciadores espécie específicas não se mostraram viáveis para analisar a comunidade bacteriana empregando técnicas de amplificação. Os próprios genes de sinalização de etileno propostos como marcadores da associação diazotróficas x cana-de-açúcar não foram eficientes sob as nossas condições de experimentação.

Portanto, o presente estudo permitiu ampliar o conhecimento sobre a absorção de N e os genes relacionados ao seu transporte na associação de bactérias com cana-de-açúcar, podendo, assim, direcionar novos estudos fisiológicos e moleculares relacionados ao N (nutriente derivado do solo quantitativamente mais importante) para o melhor entendimento de como a associação microrganismo x planta pode ser benéfica para as culturas.

ANEXOS

Anexo A – Sais utilizados, com suas respectivas concentrações para o preparo das soluções estoques de sais MS (Murashige e Skoog, 1962) e a quantidade utilizada para preparar o meio de cultivo

Soluções Estoques	Sais	Concentração (g/L)	Uso (mL/L)
Macronutrientes Estoque 16 X	KNO ₃	30,4	63
	NH ₄ NO ₃	26,4	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	7,04	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	5,92	
	KH ₂ PO ₄	2,72	
Micronutrientes 200 X	MnSO ₄ .H ₂ O	3,38	5
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,72	
	H ₃ BO ₃	1,24	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,05	
	NiSO ₄ .5H ₂ O	0,0104	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,005	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,005	
Fe-EDTA 100 X	Na ₂ EDTA	3,72	10
	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78	