LINA ROCÍO DEL PILAR RADA MARTÍNEZ

Efeito da inoculação da bactéria endofítica fixadora de nitrogênio *Rhizobium* sp. ICB503 no desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

LINA ROCÍO DEL PILAR RADA MARTÍNEZ

Efeito da inoculação da bactéria endofítica fixadora de nitrogênio *Rhizobium* sp. ICB503 no desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Heloiza Ramos Barbosa

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rada-Martinez, Lina Rocío del Pilar.
Efeito da inoculação da bactéria endofítica fixadora de nitrogênio *Rhizobium sp*. ICB503 no desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*.) / Lina Rocío del Pilar Rada Martinez. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Heloiza Ramos Barbosa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio.

Versão do título para o inglês: Effect of the endophytic diazotrophic bacterium *Rhizobium sp*. ICB503 in the growth of sugarcane *(Saccharum sp*.).

1. Cana-de-açúcar 2. *Rhizobium* 3. Bactéria fixadora de nitrogênio
I. Barbosa, Profa. Dra. Heloiza Ramos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0117/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lina Rocío del Pilar Rada Martinez.

Título da Dissertação: Efeito da inoculação da bactéria endofítica fixadora de nitrogênio *Rhizobium sp.* ICB503 no desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*.).

Orientador(a): Profa. Dra. Heloiza Ramos Barbosa.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../.....,

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8406
e-mail: cep@ich.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **373/10** referente ao projeto intitulado: ***"Estudo do metabolismo de nitrogênio em plântulas de cana-de-açúcar (Saccharum sp.) inoculadas com a bactéria fixadora de nitrogênio Rhizobium sp. ICB 118"*** sob a responsabilidade de **Lina Rocio Del Pilar Rada Martinez,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 20 de abril de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

RESUMO

RADA-MARTINEZ, L. **Efeito da inoculação da bactéria endofítica fixadora de nitrogênio *Rhizobium* sp.ICB503 no desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.)**. 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Rhizobium sp. ICB503 é uma bactéria endofítica diazotrófica isolada de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) da variedade SP801816. Esta bactéria expressa o gene *nifH*, implicado na fixação biológica de nitrogênio (FBN), produz a enzima nitrato redutase assimilatória, apresenta capacidade para solubilizar fosfatos e excreta ácido indolacético (AIA) e as enzimas endoglicanase e pectinase *in vitro*. Devido à inexistência de trabalhos que avaliem a resposta de plantas de cana-de-açúcar à inoculação com *Rhizobium* sp. e à capacidade do microrganismo para produzir substancias promotoras do crescimento vegetal , o presente trabalho teve como objetivo analisar o efeito da linhagem ICB503 no desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar da mesma variedade de onde foi isolada. Todos os experimentos foram realizados com plantas de um mês de idade propagadas por tolete. Inicialmente foi testada, qual era a forma de nitrogênio mais apropriada para assimilação de N pela planta. As plantas receberam NH_4^+ ou NO_3^- ou NH_4^++ NO_3^-. Os resultados obtidos mostraram que o NO_3^- é a forma melhor assimilada por plantas da variedade utilizada, sob as condições avaliadas. Os dois experimentos seguintes para se determinar os efeitos da inoculação bacteriana em estações climáticas diferentes, outono e verão. As plantas foram submetidas aos tratamentos: **controle (C)**, não inoculadas e adicionadas de solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio; **bactéria (B)**, inoculadas e adicionadas de solução nutritiva sem nitrogênio; **bactéria + nitrato (BN)**, inoculadas e adicionadas de solução nutritiva contendo nitrato; **nitrato (N)**, não inoculadas e adicionadas de solução nutritiva contendo nitrato. As plantas foram mantidas em estufa durante dois meses. Foram realizadas coletas mensais de material vegetal analisando altura, número de folhas, área foliar, comprimento radicular, produção de biomassa, assimilação máxima de CO_2, porcentagem de nitrogênio (%N) nas folhas e raízes, composição de aminoácidos na seiva e estimativa da população endofítica de *Rhizobium* sp. ICB503. Os resultados mostraram maior crescimento das plantas no verão e maiores diferenças entre os tratamentos no segundo mês de experimentos. Em ambos experimentos a presença da bactéria aumentou significativamente a biomassa total, área foliar, assimilação máxima de CO_2 e %N nas folhas. O comprimento das raízes e a composição de

aminoácidos no fluido xilemático não foram influenciados pelo microrganismo. *Rhizobium* sp. ICB503 conseguiu se estabelecer apenas nas raízes das plantas, tendo sido encontrada uma menor população nas plantas do tratamento BN. As plantas do tratamento BN apresentaram os maiores valores de crescimento. Este resultado sugere que a aplicação de adubos nitrogenados juntamente com bactérias poderia acarretar em maior produtividade dos cultivos de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Rhizobium* sp., cana-de-açúcar, endófito, fixação biológica de nitrogênio, promoção de crescimento vegetal.

ABSTRACT

RADA-MARTÍNEZ, L. **Effect of the endophytic diazotrophic bacterium *Rhizobium* sp. ICB503 in the growth of sugarcane (*Saccharum* sp.)**. 2012. 98 p. Master Thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Rhizobium sp. ICB503 is an endophytic diazotrophic bacteria isolated from sugarcane plants (*Saccharum* sp.), variety SP801816. This bacterium expresses several potential plant growth promoting traits in vitro: presence of the *nifH* gene, involved in biologic nitrogen fixation (BNF); produces assimilatory nitrate reductase; solubilizes phosphate; and excretes indole acetic acid (IAA), endoglucanase and pectinase. Studies evaluating the response of sugarcane plants to the inoculation with *Rhizobium* sp. are scarce. Considering that ICB503 has the ability to produce plant growth promoting substances, this study aimed to analyze the effect of the inoculation of this strain on the growth of sugarcane plants. The plants used in this study belonged to the same variety of the plants from which the strain ICB503 was isolated. All experiments were performed with one month old plants propagated from stalks. Initially, the most appropriate form of nitrogen for the N assimilation by the plant was evaluated. Tests were performed applying NH_4^+, NO_3^-, or NH_4^++ NO_3^- to the plants. The results showed that NO_3^- is the best nitrogen source assimilated by plants of the variety used in this study and under the conditions evaluated. Two experiments were conducted to determinate the effect of bacterial inoculation in plants on different seasons, autumn and summer. The treatments applied to the plants were: **control (C)**, uninoculated and treated with Hoagland solution without nitrogen; **bacteria (B)**, inoculated and treated with Hoagland solution without nitrogen; **nitrate + bacteria (BN)**, inoculated and treated with Hoagland solution containing nitrate; **nitrate (N)**, uninoculated and treated with Hoagland solution containing nitrate. Plants were maintained for two months in greenhouse conditions. Monthly, plant material was collected and the following parameters were analyzed: height, number of leaves, leaf area, root length, biomass production, maximum CO_2 assimilation, percentage of nitrogen in leaves and roots, amino acid sap composition and estimation of the endophytic *Rhizobium* sp. ICB503 population. The results showed greater plant growth in summer and larger differences between treatments in the second month of experiments. In both experiments, the presence of the bacteria significantly increased the total plant biomass, leaf area, maximum CO_2 assimilation and %N in leaves. The root length and composition of amino acids in xylem fluid

were not influenced by the microorganism. *Rhizobium* sp. ICB503 was able to colonize only the roots, having been found in a smaller population in BN treatment. Plants treated with BN showed the highest growth rates. This fact shows that the application nitrogen fertilizer along with *Rhizobium* sp. ICB503 could increase the productivity in sugarcane fields.

Key-words: *Rhizobium sp*., sugarcane, endophyte, nitrogen fixation, plant growth-promotion.

A mi mamá:

Todo en la vida lo hago de forma tal,

que nunca dejes de sentirte orgullosa de mi.

Eres y siempre serás mi más grande inspiración.

AGRADECIMENTOS

- Ao Brasil e ao povo brasileiro por ter me acolhido tão bem neste país e ter me ensinado um novo idioma e uma nova cultura.

- À Dra. Heloiza Ramos Barbosa por ter me brindado a oportunidade de trabalhar no laboratório de Fisiologia de Microrganismos e desenvolver este projeto, agradeço a orientação constante, ensinamentos e amizade.

- Ao Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar por me permitir o uso de espaço e equipamentos do laboratório de Fisiologia e Química de plantas do Instituto de Botânica. Pela ajuda, incentivo e orientação constantes no desenvolvimento deste projeto. Especialmente por me ajudar a entender melhor as plantas.

- A BIOEN/FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa e a CAPES pela bolsa de estudos outorgada.

- Ao Centro de Tecnologia Canaviera e a pesquisadora Sabrina Moutinho Chabregas, pelo fornecimento das plantas utilizadas neste projeto.

- Ao programa Pós- Graduação em Microbiologia e aos secretários Alice, Elizabeth e Bruno.

- A Rosana Duarte Prisco pela ajuda com as análises estatísticas.

- Aos alunos do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos: Adriana, Carolina, Felipe, Mariana, Roberta, Simone e Tânia pela amizade, ajuda, companhia e apoio constantes. Agradeço enormemente a todos, pelos ensinamentos em diferentes áreas: desde português básico até biologia molecular.

- A Iris Takako por ser sempre tão atenciosa e disposta a ajudar. Por ser tão mãe para todos no laboratório.

- A Mariana Irino pela enorme ajuda prestada no transporte de materiais, montagem dos experimentos e manutenção e coleta das plantas.

- Aos alunos do laboratório e funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica: Ivan Munhoz Araújo, Fernanda Cassemiro, Marjorie Tocchini, Diana

Hernandes, Janaina Gomes da Silva, pela imensa ajuda na montagem dos experimentos, manutenção, coleta das plantas e ajuda nas metodologias.

- A meu pai Gildardo Rada Rodríguez pelo amor, apoio incondicional, incentivo constante e ensinamentos em todos os aspectos da vida. Por ter me brindado esta grande oportunidade de alcançar uma grade mais na minha formação profissional.

- A Diego pelo amor, apoio, companhia e incentivo cada dia. Especialmente por ter sido a pessoa que me impulsou para a realização deste Mestrado.

- A minha família pelo carinho e preocupação constantes, especialmente a Nataly Cruz Martínez por não ter me abandonado em nenhum momento, mesmo estando tão longe.

-Em fim a todos os que fizeram possível a realização deste sonho.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Efeito dos diferentes tratamentos nos parâmetros de crescimento avaliados nas plantas 47

Quadro 2 - Contagem de UFC $g^{-1}ml^{-1}$ de *Rhizobium* sp. ICB503 nas raízes das plantas do experimento 2 57

Quadro 3 - Contagem de UFC $g^{-1}ml^{-1}$ de *Rhizobium* sp. ICB503 nas raízes das plantas do experimento 3 68

Quadro 4 - Resumo dos parâmetros medidos em plantas submetidas aos diferentes tratamentos durante os meses abril-junho 71

Quadro 5 - Resumo dos parâmetros medidos em plantas submetidas aos diferentes tratamentos durante os meses novembro-janeiro 72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da enzima nitrogenase, responsável pela redução de N_2 a amônia 24

Figura 2 - Esquema representativo das principais enzimas que atuam na assimilação de nitrogênio nas folhas 28

Figura 3 - a) Cultura de *Rhizobium* sp. ICB 503 em meio seletivo 79R .b) Formação de nódulos ativos pela associação simbiótica entre *Rhizobium* sp. e plantas leguminosas 32

Figura 4 - Sistema radicular de plantas de cana-de-açúcar antes (a) (b) e depois (c) da retirada do tolete 37

Figura 5 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) no número de folhas e (b) na área foliar 43

Figura 6 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) na altura e (b) no comprimento das raízes 44

Figura 7 - Efeito dos diferentes tratamentos na biomassa total 45

Figura 8 - Efeito dos diferentes tratamentos nas biomassas radicular e aérea 46

Figura 9 - Efeito dos diferentes tratamentos na assimilação máxima de CO_2 46

Figura 10 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) no número de folhas, e (b) na área foliar total das plantas durante dois meses de experimentos 48

Figura 11 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) na altura e (b) no comprimento das raízes das plantas durante dois meses de experimentos. 50

Figura 12 - Efeito dos diferentes tratamentos na biomassa total das plantas durante dois meses de experimentos 51

Figura 13 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) na biomassa aérea e (b) na biomassa radicular das plantas durante dois meses de experimentos. 52

Figura 14 - Efeito dos diferentes tratamentos na assimilação máxima das CO_2 durante dois meses de experimentos 53

Figura 15 - Aminoácidos totais encontrados na seiva do xilema das plantas submetidas, durante dois meses, aos diferentes tratamentos 54

Figura 16 - Aminoácidos encontrados na seiva do xilema das plantas durante o segundo mês de tratamentos. (a) Quantidade de aminoácidos (b) Porcentagem dos aminoácidos 54

Figura 17 - Nitrogênio total (Ntotal) transportado por aminoácidos na seiva do xilema das plantas durante o segundo mês de tratamentos 55

Figura 18 - Efeito dos diferentes tratamentos na porcentagem de nitrogênio (%N) total nas plantas durante dois meses de experimentos 56

Figura 19 - Efeito dos diferentes tratamentos na porcentagem de nitrogênio (%N) (a) nas folhas e (b) nas raízes das plantas durante dois meses de experimentos 57

Figura 20 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) no número de folhas e (b) na área foliar total nas plantas durante dois meses de experimentos. 58

Figura 21 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) na altura e (b) no comprimento das raízes das plantas durante dois meses de experimentos. 60

Figura 22 - Efeito dos diferentes tratamentos na biomassa total das plantas durante dois meses de experimentos 61

Figura 23 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) na biomassa aérea e (b) na biomassa radicular das plantas durante dois meses de experimentos 62

Figura 24 - Efeito dos diferentes tratamentos na assimilação máxima de CO_2 durante dois meses de experimentos 63

Figura 25 - Efeito dos diferentes tratamentos na atividade da enzima nitrato redutase (NR) foliar das plantas durante dois meses de experimentos 64

Figura 26 - Aminoácidos totais encontrados na seiva do xilema de plantas submetidas, durante dois meses, aos diferentes tratamentos 65

Figura 27 - Aminoácidos encontrados na seiva do xilema das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. (a) Quantidade de aminoácidos (b) Porcentagem dos aminoácidos 65

Figura 28 - Nitrogênio total (Ntotal) transportado por aminoácidos na seiva do xilema de plantas durante dois meses aos diferentes tratamentos 66

Figura 29 - Efeito dos diferentes tratamentos na porcentagem de nitrogênio (%N) total nas plantas durante dois meses de experimentos 67

Figura 30 - Efeito dos diferentes tratamentos na porcentagem de nitrogênio (%N) (a) nas folhas e (b) nas raízes das plantas durante dois meses de experimentos 67

Figura 31 - Curva do consumo de NO3-exibido pela bactéria *Rhizobium* sp. ICB503 ao longo do tempo. 69

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácidos Indol Acético
Amax	Assimilação máxima de CO_2
CTC	Centro de Tecnologia Canaviera
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DAE	Dias após a emergência
DAÍ	Dias após o Inóculo
FAZ	Foreing Agricultural Service
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
IAA	Instituto do Açúcar e do Álcool
NiR	Nitrito Redutase
NR	Nitrato Redutase
PEPC	Fosfoenol-Piruvato Carboxilase
r.p.m.	Revoluções por minuto
RuBisCo	Ribulose-Difosfato-Carboxilase/Oxigenase
SPCV	Substâncias Promotoras de Crescimento Vegetal
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UNICA	União da Industria de Cana-de-Açúcar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 21

1.1 Cana-de-açúcar 21

1.2 Importância da cana-de-açúcar para o Brasil 22

1.3 Fixação biológica de nitrogênio 23

1.3.1 Associações simbióticas 25

1.3.2 Bactérias de vida livre 25

1.3.3 Bactérias endofíticas 26

1.4 Absorção e assimilação do nitrogênio em plantas 27

1.5 Bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio (BEFN) em cana de açúcar 29

1.6 Uso das BFN como inoculantes bacterianos de plantas não leguminosas 30

1.7 *Rhizobium* sp. 31

1.7.1 Rhizobium sp. em cana-de-açúcar 33

1.7.2 Rhizobium sp. ICB 503 33

1.8 Hipóteses iniciais 34

2 OJETIVOS 35

2.1 Geral 35

2.2 Específicos 35

3 MATERIAL E MÉTODOS 36

3.1 Material biológico 36

3.2 Cultivo de *Rhizobium* sp. ICB 503 36

3.3 Preparação das plantas para os testes 36

3.4 Experimento 1. Teste de preferência no uso de fontes de nitrogênio 37

3.4.1 Coleta e análise do material vegetal 37

3.5 Experimento 2. Cultura das plantas inoculadas com *Rhizobium* sp. ICB503, durante os meses Abril -Junho de 2011 38

3.5.1 Coleta e análise do material vegetal 38

3.5.2 Atividade da enzima nitrato redutase (NR) foliar 38

3.5.3 Análise dos aminoácidos contidos no fluido do xilema. 39

3.5.4 Análise elementar da porcentagem de nitrogênio (%N) em amostras de folhas e raízes . . 40

3.6 Re-isolamento de *Rhizobium* sp. ICB503 das plantas de cana-de-açúcar 40

3.6.1 Processo de isolamento e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). 41

3.7 Experimento 3. Cultivo das plantas inoculadas com *Rhizobium* sp. ICB 503, durante os meses Nov de 2011-Jan de 2012 41

3.8 Medida de consumo de nitrato de *Rhizobium* sp. ICB503 41

3.9 Análise Estatística 42

4 RESULTADOS 43

4.1 Experimento 1. Preferência no uso de fontes de nitrogênio 43

4.1.1 *Parâmetros de crescimento* 43

4.1.1.1 Número de folhas e área foliar 43

4.1.1.2 Altura e comprimento das raízes 43

4.1.1.3 Biomassa total 44

4.1.1.4 Biomassa radicular e biomassa aérea 45

4.1.2 Assimilação líquida máxima do CO_2 46

4.2 Experimento 2. Cultura das plantas inoculadas com Rhizobium sp. ICB503, durante os meses Abril -Junho de 2011 48

4.2.1 Parâmetros de crescimento 48

4.2.1.1 Número de folhas e área foliar 48

4.2.1.2 Altura 49

4.2.1.3 Comprimento das raízes 50

4.2.1.4 Biomassa total 50

4.2.1.5 Biomassa aérea 51

4.2.1.6 Biomassa radicular 52

4.2.2 Assimilação líquida máxima do CO_2 52

4.2.3 Análise dos aminoácidos contidos no fluido do xilema 53

4.2.4 Análise elementar da porcentagem de nitrogênio (%N) em amostras de folhas e raízes . . 54

4.2.4.1 Porcentagem de nitrogênio (%N) total 54

4.2.4.2 Porcentagem de nitrogênio (%N) nas folhas e raízes 55

4.2.5 Re-isolamento de Rhizobium sp. ICB503. 56

4.3 Experimento 3. Cultura das plantas inoculadas com *Rhizobium* sp. ICB503, durante os meses Novembro - Janeiro de 2012 58

4.3.1 Parâmetros de crescimento 58

4.3.1.1 Número de folhas e área foliar 58

4.3.1.2 Altura 59

4.3.1.3 Comprimento das raízes 60

4.3.1.4 Biomassa total 60

4.3.1.5 Biomassa aérea 61

4.3.1.6 Biomassa radicular 61

4.3.2 Assimilação líquida máxima do CO_2 62

4.3.3 Atividade da enzima nitrato redutase (NR) foliar 63

4.3.4 Análise dos aminoácidos contidos no fluido do xilema 64

4.3.5 *Análise elementar da porcentagem de nitrogênio (%N) em amostras de folhas e raízes* . . 66

4.3.5.1 Porcentagem de nitrogênio (%N) total 66

4.3.5.2 Porcentagem de nitrogênio (%N) nas folhas e raízes 67

4.3.6 Re-isolamento de Rhizobium sp. ICB503 68

4.4 Consumo de nitrato por *Rhizobium* sp. ICB503 em meio de cultura contendo KNO_3 como fonte de nitrogênio 69

5 DISCUSSÃO 73

5.1 Preferência no uso de fontes de nitrogênio 73

5.2 Experimentos de inoculação com *Rhizobium* sp. ICB503 (Experimentos 2 e 3) 76

6 CONCLUSÕES 87

REFERÊNCIAS. 88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea perene originária do Sudeste Asiático, pertencente à família *Poaceae*, gênero *Saccharum*, e típica de climas tropicais e subtropicais (SEGATO et al., 2006). A planta armazena, no caule, elevada quantidade de sacarose, que varia de 12% e 20% no caldo (MOMOSE et al., 2009) e fornece cerca de 70% do açúcar produzido no mundo (CONTRERAS et al., 2009). Atualmente, para o comércio, utilizam-se híbridos de *Saccharum officinarum* com outras espécies (BIGGS, 2003) que apresentam características como: boa produtividade, alto teor de sacarose, teor médio a baixo de fibra, resistência às principais doenças e pragas, capacidade de adaptação a diferentes tipos de solo e climas, ausência de florescimento, rápido crescimento, entre outras (OLIVEIRA, 2011). No Brasil existem variedades melhoradas, entre elas SP791011, RB72454, SP801842 e SP801816, com uma ou várias dessas características (MELLO et al., 2006). Estas variedades desenvolvidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e pelo Instituto do Açúcar e do Álcool (IAA) contribuíram para o aumento constante da produtividade e maior capacidade de adaptação a diferentes ambientes no sentido sul para o norte do país. Juntos, permitiram uma expansão contínua da área cultivada atingindo os oito milhões de hectares cultivados atualmente (ARRUDA, 2011b).

A cana-de-açúcar pode se reproduzir a partir de sementes verdadeiras, gemas nodais ou rizomas (BIGGS, 2003), mas, a propagação para fins comerciais é assexuada e realiza-se a partir de secções dos colmos contendo uma o mais gemas (toletes). Cada gema pode se desenvolver em colmos primários, secundários, ou terciários num processo conhecido como perfilhamento (BIGGS, 2003). O tolete constitui uma fonte importante de nutrientes para a planta nos primeiros meses de vida (OLIVEIRA, 2011).

Por ser uma planta de metabolismo C_4, processo no qual o dióxido de carbono (CO_2) captado pela folha gerando um composto de quatro carbonos, apresenta maior eficiência no uso energético (BALDANI et al., 2002), sendo capaz de converter até 2% da energia solar incidente em biomassa (MOMOSE et al., 2009). Na maioria das espécies, o CO_2 é fixado pela enzima Ribulose-Difosfato-Carboxilase/Oxigenase (RuBisCO) no ciclo de Calvin-Benson, gerando um composto de três carbonos, sendo assim, referidas como C_3 (HIBBERD et al., 2008). No entanto, algumas espécies conhecidas como plantas C_4 usam a enzima Fosfoenol-Piruvato-Carboxilase (PEPC) para fixar inicialmente o HCO_3^-, gerando um composto de quatro carbonos. Uma

característica importante do metabolismo C_4 é que as enzimas PEPC e RuBisco encontram-se espacialmente separadas, estando localizadas nas células do mesofilo e bainha perivascular, respectivamente (HIBBERD; COVSHOFF, 2010). A compartimentalização das enzimas PEPC e RuBisco e a transferência de HCO_3^- do mesofilo para a bainha perivascular permitem o acúmulo de CO_2 ao redor da RuBisCO, o que se traduz em taxas fotossintéticas mais elevadas, e portanto, maior eficiência na assimilação do CO_2 (HIBBERD; COVSHOFF, 2010; SAGE, 2004).

A cana-de-açúcar é importante tanto pela produção de açúcar como de novas fontes de energia como o etanol (RODRIGUES et al., 2008). Nos últimos 15 anos, a cultura ganhou grande atenção por seu potencial para ajudar a demanda mundial de produção de energia sustentável (ARRUDA, 2011).

1.2 Importância da cana-de-açúcar para o Brasil

A cana-de-açúcar é uma cultura importante em muitos países incluindo o Brasil (MAGALHÃES; CERRI, 2007) onde, a área cultivada, destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13, é estimada em 8.567,2 mil hectares, distribuídos em vários Estados, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor com 51,66% (4.426,45 mil hectares) (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2012). O Brasil, o maior produtor e exportador de açúcar do mundo (FOREING AGRICULTURAL SERVICE, 2011) é o segundo maior produtor de etanol, depois dos Estados Unidos, porém, o primeiro a partir de cana-de-açúcar. Juntos representam 88% da produção global (JAGGER, 2010). O etanol é reconhecido mundialmente pelas suas vantagens ambientais e econômicas (ALBINO et al., 2006) pois, é uma alternativa energética para a substituição do petróleo mais apropriada, por ser renovável, barata, e menos poluidora (JAGGER, 2010; LEE; BRESSAN, 2006). Atualmente, o bioetanol substitui cerca de 30% da gasolina consumida no país e sua demanda é projetada para se dobrar nos próximos 10 anos (ARRUDA, 2011b). Em 2006 foi lançado o Plano Nacional de Agroenergia, um projeto que busca estimular a produção de cana-de-açúcar aproveitando as vantagens territoriais e climáticas que tem o país para a cultura desta gramínea (RODRIGUES et al., 2008). Também é importante ressaltar sua maior eficiência energética em relação ao milho usado nos Estados Unidos, e à beterraba, usada na Europa para a produção de etanol (BIRUR et al., 2008). O balanço energético, determinado pela quantidade de energia fóssil usada/bio-energia (energia do etanol)

produzida, para a cana é estimado em 9,3, enquanto que para beterraba é 2,0 e para o milho é 1,4 (ARRUDA, 2011b).

Em 2015, estima-se que a produção de cana-de-açúcar atinja 829 milhões de toneladas, sendo produzidos 46 bilhões de litros de álcool e 41 milhões de toneladas de açúcar (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR, 2009).

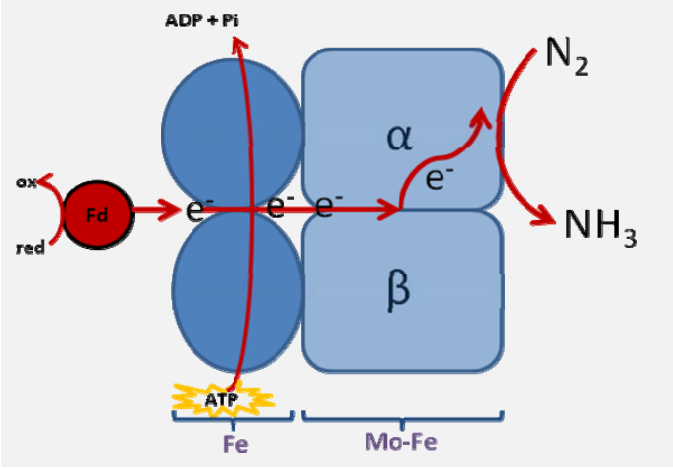
Há grande interesse em aumentar a produtividade de cana-de-açúcar, sem necessidade de aumento de áreas de plantio (MARQUES, 2008). Um dos maiores desafios será a criação de variedades de alto rendimento, que precisem de menor quantidade de água e nutrientes e que apresentem a capacidade de afastar o estresse biótico ocasionado por insetos e nematoides, assim como resistência a doenças causadas por fungos e bactérias patogênicas (ARRUDA, 2011b). A implementação de uma agricultura sustentável, evitaria grandes desmatamentos, principalmente do cerrado, ecossistema que contém maior biodiversidade da América do Sul e constitui o foco da expansão da cultura de cana-de-açúcar (SEGATO et al., 2006).

1.3 Fixação biológica de nitrogênio.

Apesar de a atmosfera terrestre ser composta por 78% do gás nitrogênio (N_2), este elemento é um fator limitante ao crescimento, pela incapacidade da maioria dos organismos vivos assimilarem esse nutriente nessa forma. A incorporação do N_2 como tal não ocorre, mas, deve ser convertido a amônia, num processo realizado apenas por um número limitado de procariotos. Para tanto, estes organismos possuem um mecanismo enzimático apropriado. Este processo recebe o nome de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e é catalisada pela enzima nitrogenase (fig 1). Os organismos capazes de realizá-la são denominados diazotróficos.

A nitrogenase é composta de duas proteínas, a Fe proteína (dinitrogenase) e a Mo-Fe proteína (dinitrogenase redutase) codificadas pelos genes *nif*. A dinitrogenase é codificada pelos genes *nifD* e *nifK,* enquanto que a dinitrogenase redutase é codificada pelo gene *nifH*, sendo este gene altamente conservado entre bactérias diazotróficas (RAYMOND et al., 2004). Uma diversidade molecular substancial das bactérias fixadoras de N_2 foi detectada com base na recuperação de fragmentos dos genes *nifH* e *nifD* a partir de tecidos vegetais. Uma vez que o gene *nifH* faz parte do genoma de apenas um determinado grupo de bactérias, sua presença tem sido pesquisada para monitorar a ocorrência de microorganismos fixadores de N_2 em vários ambientes como culturas bacterianas, no solo e dentro das plantas (SUGITHA; KUMAR, 2011).

Figura 1 - Representação esquemática da enzima nitrogenase, responsável pela redução de N_2 a amônia.



Fd: ferredoxina; red: reduzida; ox: oxidada.
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

A reação de fixação do nitrogênio é catalisada pela nitrogenase, enzima capaz de quebrar a tripla ligação existente no N_2 (N≡N) (DALTON; KRAMER, 2006).

$$N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16\ Pi \quad (1)$$

Esta reação é energeticamente custosa, exigindo cerca de 16 moléculas de ATP para cada molécula de N_2 reduzida (RAYMOND et al., 2004).

A fixação de nitrogênio também é complicada pela natureza complexa da nitrogenase que é inativada por oxigênio. Nos microrganismos aeróbios, o oxigênio é necessário para a fosforilação oxidativa, um dos processos responsáveis pela produção de ATP, necessário para que a redução do N_2 ocorra. Assim, para a fixação de nitrogênio acontecer, é necessário que existam níveis de oxigênio suficientes para haver fosforilação oxidativa sem que a nitrogenase seja inibida (DALTON; KRAMER, 2006).

Os organismos diazotróficos desenvolveram uma grande variedade de estratégias para superar esse problema de inativação da nitrogenase. Os microrganismos anaeróbios estritos como *Clostridium* sp. crescem apenas em ambientes desprovidos de O_2. Por sua vez, os aeróbios estritos e facultativos, apresentam estratégias como barreiras físicas (p.ex. muco, heterocistos, nódulos) que impedem a difusão do O_2 até a nitrogenase. Exemplos de microrganismos que desenvolveram estas barreiras físicas são *Beijerinckia* sp., *Rhizobium* sp., e as cianobactérias.

Outros mecanismos como eliminação metabólica do O_2 ou modificação estrutural da nitrogenase foram desenvolvidos por *Azotobacter* sp. e *Bradyrhizobium japonicum* (SOTO-URZÚA; BACA, 2001).

Existem três formas pelas quais os microrganismos podem levar a cabo a FBN: bactérias em associações simbióticas com plantas, bactérias de vida livre e bactérias endofíticas (NEWTON; FISHER, 2002).

1.3.1 Associações simbióticas

Dentro da agricultura, a relação simbiótica mais importante envolve bactérias da família *Rhizobiaceae* com plantas leguminosas. Estas bactérias habitam o interior das raízes dentro de estruturas denominadas nódulos, local ideal para fixar o nitrogênio atmosférico; o amônio obtido através da reação (1) é, então, disponibilizado para a planta. Esta, em troca, provê proteção e nutrientes à bactéria (MEHBOOB et al., 2009). Os nódulos também provêm um ambiente com baixo conteúdo de oxigênio, evitando assim que a enzima nitrogenase seja inativada pelo O_2 (NEWTON; FISHER, 2002). O nitrogênio fixado pelos rizóbios é depois transportado para os tecidos da planta através de moléculas orgânicas (DALTON; KRAMER, 2006; GUTIÉRREZ-ZAMORA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2001).

1.3.2 Bactérias de vida livre

Muitas das bactérias que fixam nitrogênio vivem livremente na rizosfera, porção do solo ao redor das raízes, que se encontra sob a influência do sistema radicular da planta. Esta influência é devido à presença de exsudados ricos em fontes de carbono e nutrientes, utilizados pelas bactérias (DALTON; KRAMER, 2006). Em troca, os microrganismos podem ajudar no crescimento da planta, através da excreção de substâncias promotoras de crescimento vegetal como fitormônios (ácido indolacético [AIA], etileno), aminoácidos e substâncias reguladoras do metabolismo como poliaminas (THULER et al., 2003). Visto que estas bactérias não apresentam uma relação direta com a planta, aparentemente só fixam N_2 em seu próprio benefício, e a contribuição para a planta deve ocorrer apenas indiretamente quando elas morrem. Pouco se sabe a respeito de transferência de N-fixado por bactérias de vida livre para as plantas, no entanto, foi detectada a liberação de diferentes aminoácidos por *Beijerinckia derxii,* cultivada em meio

carente de N-combinado (THULER et al., 2003). Dentre as rizobactérias, a mais estudada foi o gênero *Azotobacter* sp. (NEWTON; FISHER, 2002).

1.3.3 Bactérias endofíticas

Certas bactérias diazotróficas são capazes de colonizar endogenamente todos os tecidos das plantas e sobreviver no interior delas sem causar dano aparente a seus hospedeiros (BHATTACHARJEE et al., 2008). Estas bactérias conseguem penetrar nos tecidos vegetais via estômatos, lenticelas e áreas de emergência radicular, através da produção e excreção de enzimas hidrolíticas como pectinases e celulases (HUANG, 1986; SPRENT; DE FARIA, 1988). Estas enzimas estão sob forte regulação para atuarem apenas por ocasião da penetração da epiderme da raiz (HALMANN et al.,1997).

O interior da planta é o nicho mais favorável para as bactérias endofíticas, pois, fornece diretamente nutrientes e mantém baixas as concentrações de oxigênio, condições que otimizam a atividade da nitrogenase (BHATTACHARJEE et al., 2008). Em troca, as bactérias podem contribuir para o desenvolvimento vegetal pela produção de substâncias que estimulam o seu crescimento (FERRARA, 2010; SEVILLA; KENNEDY, 2000; THULER et al., 2003). Na última década, uma grande quantidade de endófitos foi isolada do tecido fresco de várias plantas não-leguminosas, onde estabeleciam "relações associativas" (BHATTACHARJEE et al., 2008; DALTON; KRAMER, 2007; REIS et al., 2007). Acredita-se que o nitrogênio fixado pelas bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio seja transferido para os tecidos das plantas, mas os mecanismos pelos quais isso ocorre, é uma questão que precisa ser ainda muito estudada (BALDANI et al., 2002; URQUIAGA et al., 1992).

Ainda não está claro se as interações planta-bactéria têm uma base comum. No entanto, existem inúmeras evidências de que uma grande quantidade de bactérias endofíticas e rizosféricas têm efeitos benéficos em diferentes espécies de plantas. A promoção do crescimento pode ser resultado da produção de reguladores de crescimento por parte da bactéria como as auxinas, citocininas e giberelinas. Relacionado ao estresse, a síntese de etileno da planta pode ser suprimida por ação da 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, enzima esta que também pode ser produzida pelas bactérias (GLICK, 2005). O nitrogênio ou outros nutrientes podem ser fornecidos pela fixação biológica de nitrogênio ou mobilizados, como no caso do

fósforo. Além disso, as bactérias endofíticas podem conferir à planta proteção contra patógenos por indução dos mecanismos de defesa, excreção de substâncias antagônicas (antibióticos) ou através de competição por sítios de colonização e nutrientes (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011).

1.4 Absorção e assimilação do nitrogênio em plantas

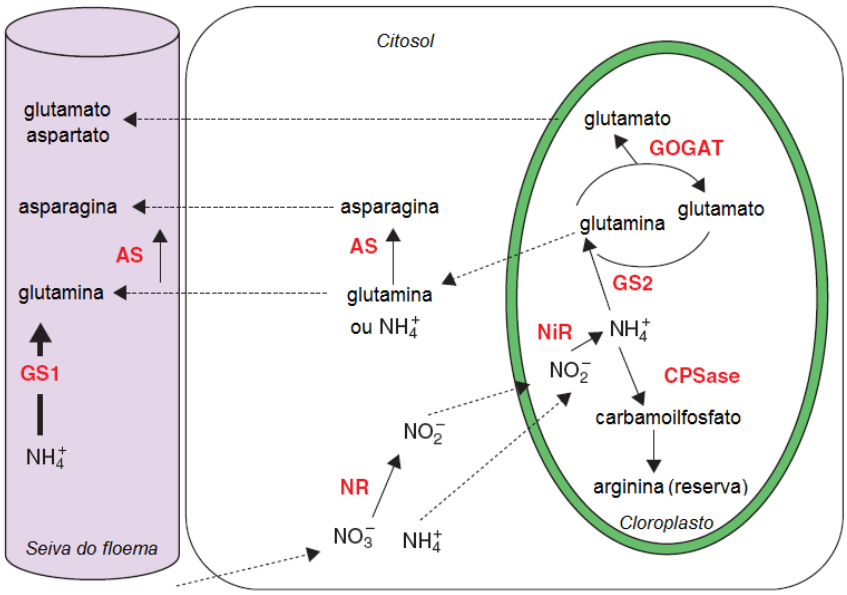
O uso do nitrogênio pelas plantas envolve vários passos que incluem captação, assimilação, transporte e, quando a planta está envelhecendo, reciclagem e remobilização (MASCLAUX-DAUBRESS et al., 2010). A habilidade da planta para capturar o nitrogênio presente no solo depende de fatores como tipo de solo, ambiente ou espécie de planta. Apesar da disponibilidade de N no solo ser geralmente baixa, esta pode variar em resposta a condições ambientais como precipitação, temperatura, vento, tipo de solo e pH. No entanto, a forma preferencial na qual o N é absorvido pela planta depende direitamente da adaptação que ela tem às condições do solo. As fontes inorgânicas de N absorvidas pelas plantas são nitrato (NO_3^-) e amônia (NH_4^+); no entanto, em condições particulares, os aminoácidos podem também atuar como fonte de N (MASCLAUX-DAUBRESS et al., 2010).

A absorção de N ocorre principalmente através da raiz, local onde se localizam os sistemas de captação e transporte do N adaptados à disponibilidade de nitrogênio no solo. São conhecidos dois sistemas de absorção/transporte de NO_3^- que trabalham em conjunto para absorver o nitrato presente no solo e distribuí-lo pela planta. O sistema LATS (sistema de transporte de baixa afinidade) é expresso quando a concentração de NO_3^- é alta e o sistema HATS (sistema de transporte de alta afinidade) expresso quando há concentrações baixas deste nutriente; estes sistemas são codificados pelos genes *NTR1* e *NTR2*, respectivamente (TSAY et al., 2007). Igualmente existem sistemas de absorção e transporte de amônio e aminoácidos especialmente adaptados a altas ou baixas concentrações desses nutrientes. Estes sistemas são codificados pelos genes *AMT* no caso do amônio e pelos *ATF* no caso dos aminoácidos (BREDEMIER; MUNDSTOCK, 2000).

A assimilação de NO_3^- em plantas requer sua redução a amônia seguida de assimilação, originando aminoácidos (MASCLAUX-DAUBRESS et al., 2010). A redução de NO_3^- a nitrito (NO_2^-) é catalisada no citosol pela enzima nitrato redutase (NR). Depois o NO_2^- é transportado ao cloroplasto onde é reduzido a NH_4^+ por ação da nitrito redutase (NiR) (MEYER; STITT., 2001) (fig 2). O NH_4^+ produzido é então assimilado no cloroplasto através de um ciclo conhecido como

GS/GOGAT. A glutamina sintetase (GS) catalisa a reação do amônio com uma molécula de glutamato para formar glutamina. Em continuação, a glutamina reage com α-ceto-glutarato formando duas moléculas de glutamato numa reação catalisada pela enzima glutamina-2-ceto-glutarato amino transferase (GOGAT) (BREDEMIER; MUNDSTOCK., 2000). Existem duas classes de GS (GS1 e GS2) sendo a GS1 predominante nas raízes e encontrada apenas no citosol; a GS2 é mais comum nas folhas e encontra-se no cloroplasto (LAM et al., 1996) (fig 2). Além das enzimas implicadas no ciclo GS/GOGAT, acredita-se que outras três enzimas participem ativamente da assimilação de amônia: a asparagina sintetase (AS) citosólica que catalisa a transferência do grupo amida da glutamina a uma molécula de aspartato gerando glutamato e asparagina. A carbamoilfosfato sintetase (CPSase) produz carbamoil fosfato (precursor da citrulina e da arginina) a partir de bicarbonato e amônio ou o grupo amida da glutamina. A NADH-glutamato desidrogenase mitocondrial incorpora amônio em glutamato em resposta a altas concentrações de amônia no solo e está envolvida na desaminação do glutamato (BREDEMIER; MUNDSTOCK., 2000).

Figura 2 - Esquema representativo das principais enzimas que atuam na assimilação de nitrogênio nas folhas.



(NR) nitrato redutase, (AS) asparagina sintetase, (CPSase) carbamoilfosfato sintetase, (NiR) nitrito redutase, (GS) glutamina sintetase, (GOGAT) glutamina-2-cetoglutarato sintetase.
Fonte: Modificado de Masclaux-Daubress et al.,(2010).

A assimilação de nitrogênio pelas plantas encontra-se fortemente ligada a processos como fotossíntese, respiração e fotorrespiração devido à necessidade dos produtos destes processos como poder redutor, NADH ou ferrodoxina (Fdx), esqueletos carbonados e ceto-ácidos para a síntese das biomoléculas (LAM et al., 1996).

1.5 Bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio (BEFN) em cana-de-açúcar.

A cana é uma das poucas não leguminosas cultivadas em campo conhecida por ser capaz de obter uma quantidade substancial de N total a partir de N_2 atmosférico através da FBN (BODDEY et al., 2003; CANUTO et al., 2003; GUTIÉRREZ-ZAMORA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2001; URQUIAGA et al., 1992). No entanto, a eficiência do processo de transferência de N (SEGATO et al., 2006), assim como o modo de ação pelo qual esses microrganismos transferem o N-fixado para as plantas são ainda desconhecidos (BODDEY et al., 2006). Diversas bactérias fixadoras de nitrogênio têm sido isoladas de raízes, folhas e caules de diferentes variedades de cana, entre elas *Gluconacetobacter diazotrophicus* (JAMES et al., 2001), *Beijerinckia* sp. (KOOMNOK et al., 2007), *Herbaspirillum* sp. (DÖBEREINER et al., 1995), *H. seropedicae, Burkolderia* sp. (CASTRO-GONZALES et al., 2011), *Azospirillum* sp. (REINHOL-HUREK; HUREK, 2011). O sítio preferencial de colonização de bactérias endofíticas na cana-de-açúcar é a raiz (PARIONA-LLANOS et al., 2010) sendo capazes também de habitar partes aéreas (BELLONE; BELLONE, 2006). James et al., (2001) sugeriram que, pelo fato de serem endofíticas, estas bactérias sejam capazes de fixar N_2 mais eficientemente do que os microrganismos diazotróficos presentes na rizosfera e no rizoplano.

Uma das relações BEFN-planta mais estudada em cana-de-açúcar é aquela estabelecida com bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, tendo sido comprovado o efeito positivo gerado pela fixação de N_2 sobre a produtividade da planta (DALTON; KRAMER, 2006; DÖBEREINER et al., 1995; JAMES et al., 1994). A introdução de inoculantes de bactérias fixadoras de nitrogênio com alto potencial de transferência do nitrogênio fixado pode diminuir a dependência de nitrogênio do solo ou de fertilizantes nitrogenados (CANUTO et al., 2003). Variedades de cana-de-açúcar com maior quantidade bactérias diazotróficas, quando submetidas à metade da dose recomendada de fertilizante nitrogenado, alcançaram níveis de produtividade similares aos de plantas tratadas com a dose completa (SUMAN et al., 2008).

1.6 Uso das BFN como inoculantes bacterianos de plantas não leguminosas

Plantas não-leguminosas como milho, arroz, trigo e cana-de-açúcar pertencentes à família *Poaceae*, constituem o alimento básico para aproximadamente 6,5 bilhões de pessoas ao redor do mundo. O aumento exponencial na população mundial trouxe como resultado um incremento na produção agrícola provocado, principalmente, pelo uso indiscriminado de adubos químicos (N, P, K) (BHATTACHARJEE et al., 2008). Apesar da adubação nitrogenada ser altamente dispendiosa, é constantemente aplicada em grandes quantidades nos solos cultivados, pois, reverte em melhor rendimento das culturas. A produção destes fertilizantes requer grandes quantidades de energia derivada de recursos não-renováveis como petróleo, carvão ou gás (LIMA et al., 2010). Contudo, aproximadamente 65% do nitrogênio mineral aplicado no solo é perdido por emissões de gases (NOx), escoamento superficial, erosão e lixiviação (GOOD et al., 2004; SUMAN et al., 2008). Além dos altos custos, essa perda traz como consequência um alto impacto ao meio ambiente já que a produção de NOx está relacionada ao aumento do efeito estufa, diminuição estratosférica do ozônio e produção de chuva ácida. Por sua vez, as perdas por escoamento e lixiviação podem resultar em alterações no ciclo global de N, poluição das águas superficiais e subterrâneas e eutrofização dos corpos de água (BHATTACHARJEE et al., 2008)

Com a crescente preocupação relacionada ao meio ambiente, várias alternativas estão sendo aproveitadas para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados nas culturas. Neste contexto a utilização das BFN em práticas agrícolas está ganhando importância (BHATTACHARJEE et al., 2008).

As bactérias diazotróficas simbióticas têm a capacidade de disponibilizar o N_2 às plantas, fixando cerca de 50-200 kg N ha^{-1} ano^{-1} enquanto que para algumas associativas obteve-se uma contribuição de 30-80 kg N ha^{-1} ano^{-1}. As bactérias diazotróficas de vida livre podem ser uma alternativa para enriquecer com N o solo especialmente quando usadas junto com resíduos orgânicos (BALDANI et al., 2002). Exemplo de disso são as culturas alagadas como o arroz (KEYEO; NOOR-AISHAH; AMIR, 2011). Em muitos trabalhos de pesquisa são demonstrados os benefícios da utilização de BFN em diversas culturas tanto em escala de laboratório (JAMES et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002) quanto em campo (RIGGS et al., 2001; SUMAN et al., 2008; URQUIAGA et al., 1992). Como resultado destas descobertas, existe atualmente no mercado mundial uma grande quantidade de inoculantes bacterianos para diferentes espécies vegetais.

No Brasil estão sendo comercializados inoculantes para milho, arroz, trigo e cana-de-açúcar desenvolvidos pela Embrapa e produzidos por diferentes empresas multinacionais. Em 2009 foi lançado no mercado o Masterfix Gramíneas® um inoculante para milho, arroz e trigo feito com varias estirpes da bactéria *Azospirillum brasilense*; estudos realizados com esta bactéria mostraram incrementos de até 30% no rendimento do milho e de 11% no rendimento do trigo (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGRUPECUÁRIA, 2009). Nesse mesmo ano, quatro empresas produtoras de fertilizantes (AGROLATINO, STOLLER e TURFAL) foram selecionadas pela Embrapa Agrobiologia para a produção do inoculante para cana-de-açúcar, desenvolvido em seus laboratórios. O inoculante é composto por cinco espécies de bactérias previamente isoladas de plantas de cana: *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica* (EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2008).

Até o momento não existem reportes de que o inoculante para cana-de-açúcar esteja disponível no mercado ou trabalhos que avaliem a reposta de plantas à inoculação com esse produto.

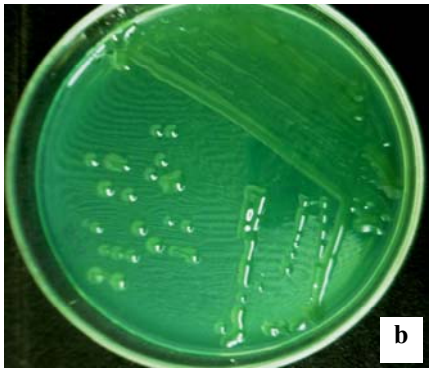
1.7 *Rhizobium* sp.

Rhizobium sp. é uma bactéria aeróbia, Gram negativa, fixadora de nitrogênio, que pode crescer e se reproduzir tanto no solo quanto dentro de nódulos desenvolvidos nas raízes das plantas leguminosas (fig3a) (FORD; TOBY, 2004). Diversos autores descreveram a capacidade de *Rhizobium* sp. colonizar endofíticamente plantas não leguminosas, sem a formação de nódulos nas raízes, mas se estabelecendo dentro dos tecidos (DALTON; KRAMER, 2006; GUTIÉRREZ-ZAMORA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2001). Yanni et al. (2001) e Chi et al. (2005) encontraram *R. leguminosarum* como endofítico em plantas de arroz. A bactéria, além de estar presente nos tecidos da planta, apresentava a capacidade de promover o crescimento da mesma. Resultados similares já foram reportados em cultivos como trigo, canola e cevada (BIEDERBECK et al., 2000; LUPWAYI et al., 2004).

A família *Rhizobiaceae* induz a formação de nódulos em leguminosas utilizando processos dependentes ou não de fatores de nodulação, conhecidos como Fatores Nod (FN). Na estratégia FN dependente, os flavonoides, moléculas de sinalização produzidas pelas plantas, são percebidas pelas proteínas reguladoras NodD bacterianas, que induzem a síntese FN

(lipoquitooligossacarídeos) através da expressão dos genes *nod* (MASSON-BOIVIN et al, 2009). Os fatores de nodulação são os que iniciam a formação do nódulo. A percepção dos FN pela planta desencadeia várias respostas na raiz, tais como fluxos iônicos, deformação do pelo radicular e formação do tubo de infecção, que orienta as bactérias para o primórdio emergente. Concomitantemente com a formação do tubo de infecção, as células corticais da planta se dividem para formar um primórdio do nódulo e o tubo de infecção cresce em direção a esse nódulo em formação (RHIJ; VANDERLEYDEN, 1995).

Figura 3 - a) Cultura de *Rhizobium* sp ICB 503 em meio seletivo 79R .b) Formação de nódulos ativos pela associação simbiótica entre *Rhizobium* sp. e plantas leguminosas.



Fontes: a) (DEAN, 2009) ; b) (RADA-MARTINEZ, 2012).

No processo independe FN, as bactérias podem entrar na planta através zonas de emergência radicular. A acumulação de compostos similares a citocininas, sintetizados pelas bactérias nestas zonas de infecção, pode iludir o início da via de sinalização dependente de FN, evitando a formação do nódulo (MASSON-BOIVIN et al, 2009). A entrada de *Rhizobium* sp. em plantas leguminosas é realizada pelo processo independente de FN; sugere-se que os flavonoides também desempenham um papel importante na relação rizóbio-planta não leguminosa, estimulando a colonização (GUTIÉRREZ-ZAMORA; MARTÍNEZ-ROMERO, 2001). O flavonoide naringenina promove a entrada e posterior colonização intercelular de raízes de arroz por parte *A. caulinodans*. Neste caso, a entrada da bactéria é realizada através de áreas de emergência radicular sendo independente de regulação pelos genes *nod* (YAIN; GUPTA, 2003).

Rhizobium sp. é uma bactéria amplamente utilizada com fins agrícolas. Suas aplicações já foram demonstradas como inoculantes há mais de 100 anos, com resultados muito positivos na

transferência de N-fixado para a planta, além de ter facilidade de manipulação genética (GUTIÉRREZ-ZAMORA; MATÍNEZ-ROMERO, 2001).

1.7.1 Rhizobium sp. *em cana de açúcar*

Até o momento não existem trabalhos citando a presença de *Rhizobium* sp. como endofítico em plantas de cana-de-açúcar, no entanto Mehnaz et al., (2010) isolaram duas linhagens de *Rhizobium* sp., LH-R3 e Q-R1, das raízes de variedades de cana-de-açúcar cultivada em Pakistan. Nesse trabalho, os autores não deixam claro se as duas linhagens foram isoladas da rizosfera ou do interior dos tecidos das plantas. Num outro trabalho, Thaweenut et al. (2011) observaram a presença de sequências *nifH* similares às de *Bradyrhizobium* sp. e *A. caulinodans*, nas raízes e no caule de plantas de cana da variedade NiF8.

No Brasil, pesquisadores da Embrapa, encontraram sequencias *nifH* pertencentes a gêneros de *Bradyrhizobium* sp e *Rhizobium* sp. em raízes de cana da variedade RB867515 (FISCHER et al., 2011).

Burbano et al. (2011) analisaram em raízes de cana-de-açúcar do México, Brasil e África do Sul a presença de sequências específicas *nifH*, encontrando um filotipo comum a todas as amostras, este filotipo tem DNA com 93,9-99,6% de similaridade à sequência parcial *nifH* de uma linhagem afiliada com *Rhizobium rosettiformans*.

1.7.2 Rhizobium sp. *ICB 503*

No laboratório de fisiologia de microrganismos foram isoladas, oito linhagens endofíticas de *Rhizobium* de plantas de cana-de-açúcar (fig 3b). Culturas puras dessas linhagens foram pesquisadas quanto à: presença de genes *nifH*, capacidade de excretar ácido indol-3-acético (AIA), etileno e poliaminas, produção de endoglicanase e pectinase, capacidade de solubilizar fosfatos e presença de nitrato redutase assimilatoria ativa. Os resultados sugerem que essas linhagens têm potencial para contribuir para o crescimento vegetal (FERRARA, 2010).

Continuando os estudos com rizóbios endofíticos, isolados de cana-de-açúcar, neste trabalho está em avaliação, a possibilidade da linhagem ICB503 exercer efeito sobre o crescimento e metabolismo do nitrogênio em plantas de cana-de-açúcar. Trabalhos realizados no grupo mostraram que esse microrganismo expressa o gene *nifH*, implicado na FBN produz as enzimas endoglicanase, pectinase, e nitrato redutase assimilatória, excreta AIA *in vitro* e

apresenta capacidade para solubilizar fosfatos (FERRARA, 2010; SOTO, 2008). Determinou-se também que essa bactéria tem resistência à canamicina e ao ácido nalidíxico, características importantes para o posterior re-isolamento. Com base nesses dados e por não terem sido encontrados estudos sobre a relação estabelecida entre o gênero *Rhizobium* e plantas de cana-de-açúcar, optou-se por estudar essa linhagem bacteriana.

1.8 Hipóteses iniciais

Para a realização do presente trabalho foram propostas duas hipóteses iniciais:

a) *Rhizobium* sp. ICB503 é capaz de fixar N_2 no interior dos tecidos de plantas de cana-de-açúcar e disponibilizar o nitrogênio fixado à planta.
b) *Rhizobium* sp. ICB503 promove o crescimento de plantas cana-de-açúcar.
c) *Rhizobium* sp.ICB503 é capaz de colonizar plantas de cana-de-açúcar, caracterizando-se como endofítica verdadeira.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral: Avaliar o efeito da inoculação de *Rhizobium* sp. ICB503, uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio, isolada de cana-de-açúcar, em plantas da variedade comercial SP801816 de *Saccharum* sp.

2.2 Específicos:

- Determinar a fonte de N-combinado que promove o melhor crescimento da planta;

- Em plantas submetidas aos tratamentos:

a) ausência de fonte de nitrogênio combinado;

b) presença de fonte de nitrogênio combinado;

c) ausência de fonte de nitrogênio combinado e presença de *Rhizobium* sp. ICB503;

d) presença de fonte de nitrogênio combinado e presença de *Rhizobium* sp. ICB503;

pretende-se:

- Caracterizar os parâmetros de crescimento: número de folhas, área foliar, altura, comprimento da raiz, e produção de biomassa;
- Caracterizar o potencial de assimilação fotossintética;
- Analisar composição quantitativa e qualitativa de aminoácidos presentes no xilema;
- Determinar a porcentagem de N nas folhas e raízes;
- Avaliar a atividade da enzima nitrato redutase foliar;
- Caracterizar a capacidade de re-colonização da cana-de-açúcar pela bactéria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Dentre oito isolados de cana-de-açúcar foi selecionada a linhagem *Rhizobium* sp. ICB503 para o presente estudo.

As plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) da variedade SP801816, com um mês de idade, cultivadas a partir de toletes, foram fornecidas pelo CTC. Esta variedade é a mesma da qual o *Rhizobium* sp. ICB503 foi isolado.

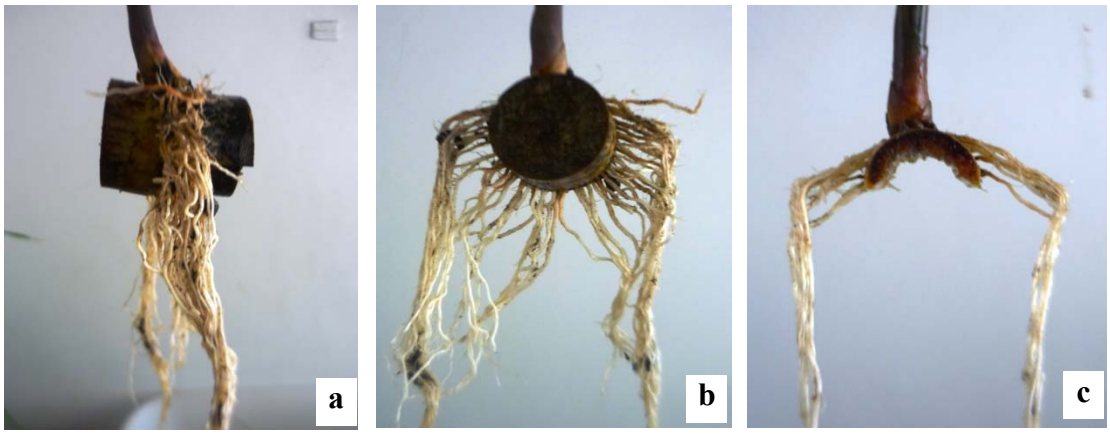
3.2 Cultivo de *Rhizobium* sp. ICB 503

Para cultivo do microrganismo, foi utilizado o meio 79R (ALLEN, 1957). *Rhizobium* sp. ICB503 foi cultivado em 100 ml de meio 79R acrescido de 0,134 g de sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) sob agitação a 28±2 °C por 24 h. Posteriormente a cultura bacteriana foi transferida para 900 ml de meio 79R sem fonte de nitrogênio e foi cultivada sob agitação a 28±2 °C por 48h. Após esse período, a cultura atingiu 10^8 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) ml^{-1}. Em seguida a cultura bacteriana foi submetida a centrifugação por 20 min a 5000 revoluções por minuto (r.p.m.) a 4 °C, para a retirada do meio de cultura. O precipitado foi suspenso em água destilada estéril. Essa suspensão foi utilizada para inocular as plantas de cana-de-açúcar.

3.3 Preparação das plantas para os testes

Após a retirada do tolete, conforme a figura 4, as plantas de cana-de-açúcar de um mês de idade foram cultivadas individualmente em vasos plásticos de 15 l contendo como substrato areia e vermiculita na proporção 2:1 e receberam 250 ml de solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) com nitrato de potássio (KNO_3^- 0,5 mM) por vaso.

Figura 4 - Sistema radicular de plantas de cana-de-açúcar antes (a) (b) e depois (c) da retirada do tolete.



Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

3.4 Experimento 1. Teste de preferência no uso de fontes de nitrogênio

Após uma semana de tratamento conforme item 3.3, o substrato foi lavado, e os vasos foram sorteados aleatoriamente para receber os seguintes tratamentos: **1) controle** (solução nutritiva sem fonte de N-combinado); **2) nitrato** (solução nutritiva contendo KNO_3^-, 5 mM); **3) amônia** (solução nutritiva contendo ($(NH_4)_2SO_4$ 5 mM); e **4) combinado** (solução nutritiva contendo KNO_3 e $(NH_4)_2SO_4$ em concentração final de 5 mM). As plantas receberam solução nutritiva (250 ml por vaso), uma vez por semana durante 4 meses. n=20 para cada tratamento.

3.4.1 Coleta e análise do material vegetal

A coleta de material vegetal foi realizada após 4 meses de tratamento para análise dos parâmetros descritos a seguir.

Foram feitas as medidas: 1) número de folhas, 2) área foliar (cm^2), 3) altura total (cm), 4) comprimento da raiz, 5) produção de biomassa (g) e 6) fotossíntese (µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}). A altura foi medida da base do tolete até a folha mais alta e o comprimento radicular, da base do tolete até a raiz mais comprida. As medidas de área foliar foram realizadas com auxilio de um medidor de área foliar LI-3100 (Li-Cor Biosciences). Para as medidas de produção de biomassa (aérea e radicular) as plantas foram coletadas e secas em estufa a 60 °C até atingir peso constante e imediatamente depois pesadas em balança semi-analítica. Para a avaliação da fotossíntese máxima, foram determinadas as taxas de assimilação de CO_2 por analisador de gás infravermelho

portátil (PP Systems – CIRAS 2). As medidas foram feitas no período da manhã antes das coletas destrutivas. Foram realizadas curvas de resposta à luz (curva A x PAR) para identificação da fotossíntese máxima (Amax), pontos de saturação de luz (Asat) e eficiência do uso de água. Em todas as avaliações de trocas gasosas foram definidos os parâmetros baseados em área foliar e massa foliar, através da caracterização das áreas foliares específicas (área foliar/massa seca foliar; $cm^2\ g^{-1}$).

3.5 Experimento 2: Cultura das plantas inoculadas com *Rhizobium* sp. ICB503, durante os meses Abril -Junho de 2011.

Após uma semana de tratamento conforme item 3.3., o substrato foi lavado e as plantas foram retiradas dos vasos para o procedimento de inoculação. As raízes foram lavadas e suas pontas foram cortadas. Em seguida as raízes de metade das plantas foram mergulhadas na suspensão bacteriana e as raízes da metade restante foram mergulhadas em água destilada estéril durante 1 h. Em seguida, as plantas foram re-plantadas em vasos e sorteados aleatoriamente para receber os seguintes tratamentos: **1) controle (C) -** não inoculadas – adicionadas de solução nutritiva sem fonte de N-combinado; **2) nitrato (N)** não inoculadas – adicionadas de solução nutritiva contendo KNO_3 (5 mM); **3) inoculadas com bactéria (B)-** adicionadas de solução nutritiva sem N-combinado e **4) inoculadas com bactéria + nitrato**) **(BN)** – adicionadas de solução nutritiva contendo KNO_3 (5 mM). As plantas distribuídas nos diferentes tratamentos foram mantidas em estufa e avaliadas após um e dois meses: n=8 por tratamento por mês (n=5 parâmetros de crescimento e n=3 re-isolamento da bactéria).

3.5.1 Coleta e análise do material vegetal

O acompanhamento do crescimento das plantas no primeiro e segundo meses (n= 5) foi feito utilizando-se das mesmas medidas citadas no item 3.4.1., acrescidas de determinações da atividade da enzima nitrato redutase foliar, análise da composição dos aminoácidos contidos na seiva do xilema e determinação da porcentagem total de nitrogênio (%N) em raízes e folhas.

3.5.2 Atividade da enzima nitrato redutase (NR) foliar

Para o ensaio de atividade da enzima nitrato redutase no tecido foliar (n=3) a coleta de material vegetal foi realizada no período da manhã, antes das medidas destrutivas, amostrando o

terço médio da última folha totalmente expandida (STEWART et al., 1986). O tecido fresco foi lavado e picado em pequenos pedaços. Cem miligramas de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 ml de solução de incubação composta por: fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4 0,05 M), KNO_3 100 mM e 1-propanol 0,05 M. Realizou-se infiltração a vácuo por três vezes seguidas até o material afundar. Os tubos foram encubados a 30 °C durante 1 h no escuro e à vácuo. Após a incubação, 1 ml do sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio, ao qual se adicionou 1ml de ácido sulfanílico 1% (v/v) e 1 ml de reagente de NED 0,05% (v/v) (αnaphtyl-etilenodiamida dihidroclórico). Os tubos permaneceram 30 min a temperatura ambiente e depois foi realizada a leitura de absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (biospectro SP-22).

A atividade da enzima foi calculada com base na fórmula:

$$\rho Katg^{-1}pf^{-1} = [(abs/15)*(v/pf)*(10^6/3600)] \quad (2)$$

$$\rho Katg^{-1}pf^{-1} = \rho Mol\ NO_3\ s^{-1}g^{-1}pf$$

onde: ρKat = atividade da enzima; v = volume de sobrenadante= 1 ml;

pf = peso fresco = 100 mg

3.5.3 Análise dos aminoácidos contidos no fluido do xilema

A seiva do xilema foi coletada *in vivo* (n=3) com auxílio de uma bomba de pressão (PMS Instrument modelo 1000, Oregon EUA) no período da manhã logo após terem sido realizadas as medidas de crescimento. As amostras foram congeladas a -20 °C para análises posteriores.

O conteúdo de aminoácidos e amônio transportados na seiva do xilema foi analisado usando Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência – UPLC (Waters Acquity UPLC® system - Waters, Milford, MA, USA - com detector de fluorescência). As amostras de seiva foram descongeladas e centrifugadas por 5 min a 13 r.p.m. A derivatização foi realizada seguindo o protocolo do kit AccQ-Tag de derivatização da Waters modificado. Em um "vial" foram adicionados 60 µl de tampão borato, 20 µl de amostra e 20 µl de 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC), agitados por 10 segundos em vortex e colocados em banho-maria a 55 °C por 10 min.

A separação foi realizada com a coluna AccQ.Tag Ultra Column C18 (2,1X100 mm 1,7 um), a 60 °C com os seguintes eluentes: A- AccQ.Tag Ultra Eluent A (10% em água), B-

AccQ.Tag Ultra Eluent B (100%), em fluxo de 0,7 ml/min. O gradiente entre os dois eluentes foi obtido da seguinte forma, por dez minutos: t=0 min, 99,9% A e 0,1% B; t=0,54 min, 99,9% A e 0,1% B; t=5,74 min, 90,9% A e 9,1%B; t=7,74 min, 78,8% A e 21,2% B; t=8,05 min, 10% A e 90% B; t=8,64 min, 10% A e 90% B; t=8,73 min, 99,9% A e 0,1% B; t=9,50 min, 99,9% A e 0,1% B. Os aminoácidos foram detectados no comprimento de onda de excitação de 260 nm. Após cada injeção, a coluna foi lavada com 200 µl de acetonitrila 95% em água e posteriormente com 600 µl acetonitrila 5% em água.

Para a determinação da concentração de cada aminoácido, foram passados padrões com concentração de 10 a 150 ρmol dos seguintes aminoácidos, além da amônia (NH_3): Alanina (Ala), Arginina (Arg), Asparagina (Asn), Aspartato (Asp), Citrulina (Cit), Cisteína (Cys), Glicina (Gly), Glutamato (Glu), Glutamina (Gln), Hidroxiprolina (HyPro), Histidina (His), Ileucina (Ile), Leucina (Leu), Lisina (Lys), Metionina (Met), Ornitina (Orn), Fenilalanina (Phe), Prolina (Pro), Serina (Ser), Tirosina (Tyr), Treonina (Thr), Triptofano (Trp), Valina (Val).

3.5.4 Análise elementar da porcentagem de nitrogênio (%N) em amostras de folhas e raízes

A determinação da concentração de nitrogênio no material vegetal foi realizada nas mesmas amostras de folhas e raízes secas a 50 °C, utilizadas para determinar a biomassa (n=3). O material foi moído com ajuda de moinho de bolas e analisado através de analisador elementar (Perkin-Elmer CHN 2400) e espectrometria de emissão atômica com plasma induzido (ICP-AES) Spectro Ciros CDD do laboratório de Análise Elementar na Central Analítica do Instituto de Química IQ/USP.

3.6 Re-isolamento de *Rhizobium* sp. ICB503 das plantas de cana-de-açúcar.

Mensalmente, as plantas foram removidas dos vasos e 3 g de raízes e 3 g da parte aérea foram utilizadas para re-isolar e quantificar as bactérias. Para determinar o caráter endofítico da colonização, foi necessária a desinfecção prévia da superfície das raízes e parte aérea da planta.

As plantas foram desinfetadas segundo a técnica descrita por Araújo et al.,(2002), modificada por Pariona-Llanos et al., (2010). Antes de começar, as pontas cortadas foram seladas com parafina para isolar o conteúdo interno, evitando saída de bactérias endofíticas. As raízes e parte aérea foram lavadas em água corrente para a retirada de resíduos. O material vegetal foi

imerso em álcool 70% (v/v) por 2 min com agitação, 5 min em solução de hipoclorito de sódio a 2% com agitação e três lavagens sucessivas em água destilada estéril por 2 min com agitação.

Para se determinar se a desinfecção foi bem sucedida, uma amostra dos materiais desinfetados foi colocada em caldo nutriente e incubada por 24 h a 30 ºC. No caso de crescimento microbiano, o material seria descartado.

3.6.1 Processo de isolamento e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)

Três gramas de material desinfetado foram macerados em 3 ml de água destilada estéril em almofariz e pistilo estéreis. O caldo obtido foi diluído e semeado, com auxílio da alça de Drigalski, em meio YMA-CR sem fonte de nitrogênio e com adição de canamicina (50 µg ml^{-1}), micostatina (30 µg ml^{-1}) e ácido nalidíxico (30 µm ml^{-1}). Após incubação a 28±2 ºC por 48 h, colônias com morfologia característica foram contadas para calcular a quantidade de UFC g^{-1}. O número médio de UFC de *Rhizobium* sp. ICB503 em cada tratamento foi utilizado para o cálculo da estimativa da população endofítica presente na raiz e parte aérea.

3.7 Experimento 3: Cultivo das plantas inoculadas com *Rhizobium* sp. ICB503, durante os meses Novembro de 2011-Janeiro de 2012

Foi realizado um novo experimento de inoculação com a bactéria durante o verão, no período de Novembro de 2011 a Janeiro de 2012. O manejo e cultivo das plantas, assim como os parâmetros avaliados foram realizados conforme item 3.5. e o re-isolamento da bactéria foi realizado conforme item 3.6.

3.8 Medida de consumo de nitrato de *Rhizobium* sp. ICB503

Para medir o consumo de nitrato por parte da linhagem ICB503 foi preparado o inóculo a partir de colônias isoladas com 48 h de crescimento. Uma colônia isolada foi inoculada em 150 ml de meio 79R líquido sem adição de corante e acrescido com 1,32 g de $(NH_4)_2SO_4$. A cultura foi incubada em aerobiose a 280 r.p.m. e 28±2 ºC durante 24 h. Dez mililitros dessa cultura foram inoculados em 100 ml de meio 79R sem adição de corante e acrescido com 10 mM de KNO_3 (PARIONA-LLANOS, 2009). A cultura foi incubada em aerobiose a 280 r.p.m. e 28±2 ºC.

Durante o crescimento da bactéria foram retiradas amostras de 1 ml a cada 4 horas e usadas para medir a concentração de nitrato no meio seguindo a metodologia descrita por Cataldo et

al.,(1975). A amostra foi filtrada em filtro bacteriológico de 0,22 µm (Millipore®). Cem microlitros do sobrenadante foram adicionados a 400 µl de ácido salicílico (5% v/v em ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado). Após 20 min à temperatura ambiente foram acrescidos 9,5 ml de hidróxido de sódio (NaOH) 2N. Após atingir a temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Cary 50 Bio Spectrophotometer) a 410 nm. O experimento foi realizado em triplicata. Para medir a concentração de nitrato no meio foi realizada a curva padrão com quantidades decrescentes conhecidas de KNO_3 a partir de 10 mM.

3.9 Análise Estatística

No experimento 1. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância por ANOVA ($p<0.05$), seguido por teste de Tukey ($p<0.05$).

Nos experimentos 2 e 3. Os dados obtidos foram analisados por ANOVA ($p<0.05$) com três fatores (nitrogênio, bactéria e tempo). Quando necessário foram realizadas comparações múltiplas pelo método de Tukey ($p<0.05$).

Em todas as análises verificou-se a homogeneidade das variâncias e quando necessário empregou-se transformação dos dados.

4 RESULTADOS

4.1 Experimento 1: Preferência no uso de fontes de nitrogênio

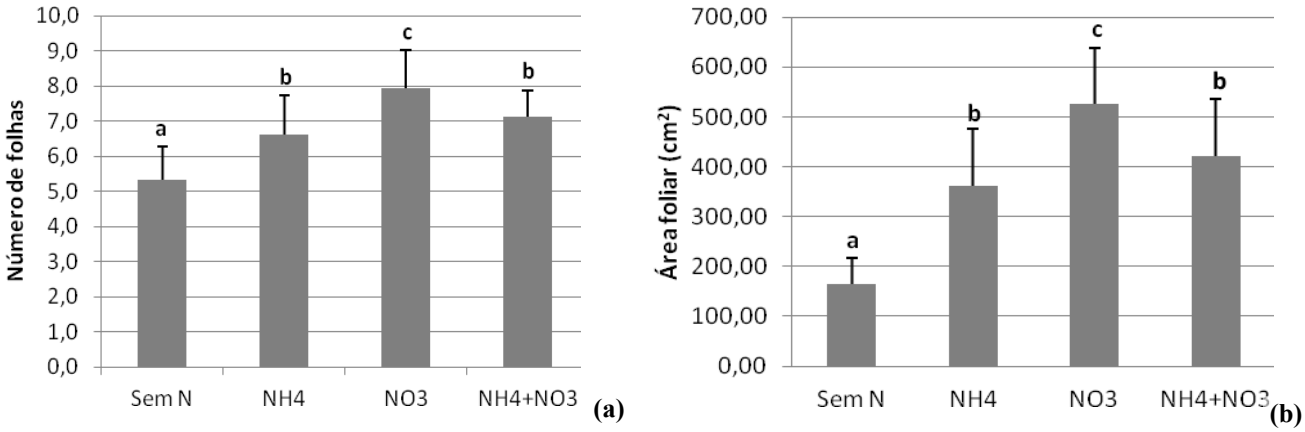
Para se determinar se as plantas no começo dos experimentos eram semelhantes, os parâmetros de altura e número de folhas foram medidos uma semana após o corte do tolete. A análise estatística dos dados permitiu observar que não existiam diferenças significativas entre elas.

4.1.1 Parâmetros de crescimento

4.1.1.1 Número de folhas e área foliar

Os resultados obtidos depois de quatro meses de crescimento mostraram que tanto o número de folhas quanto a área foliar foram significativamente maiores nas plantas tratadas com NO_3^- comparadas com o restante dos tratamentos (fig 5) ($p<0.05$). As plantas tratadas com NH_4^+ e com NH_4^++ NO_3^-apresentaram número de folhas e área foliar significativamente maiores se comparadas com as plantas controle. Não foram encontradas diferenças significativas entres os tratamentos NH_4^+ e NH_4^++ NO_3^-.

Figura 5 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) no número de folhas e (b) na área foliar.



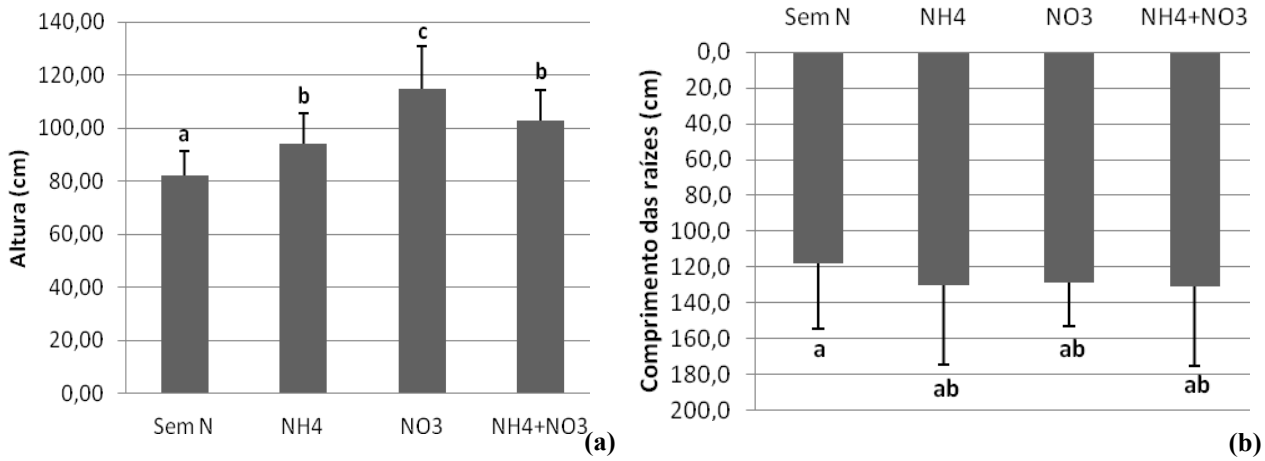
Valores médios (n=20); barras com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

4.1.1.2 Altura e comprimento das raízes.

As plantas tratadas com NO_3^- foram significativamente mais altas em comparação com os outros tratamentos (fig 6a) ($p<0.05$). As plantas tratadas com NH_4^++ NO_3^- apresentaram uma

altura significativamente maior comparada com as tratadas com NH_4^+ e com o controle, enquanto que o tratamento com NH_4^+ foi signitivamente maior do que o controle.

Figura 6 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) na altura e (b) no comprimento das raízes.



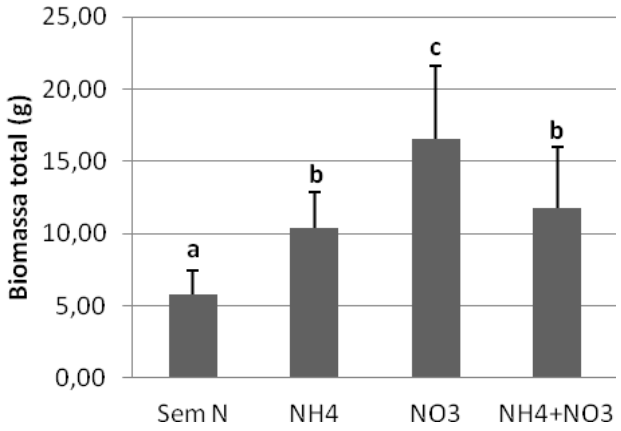
Valores médios (n=20); barras com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

O comprimento das raízes não apresentou diferenças significativas em nenhum dos tratamentos comparados com o controle (fig 6b). Os valores médios em todas as plantas variaram entre 117 e 130 cm.Observou-se que o volume das raízes das plantas tratadas com NO_3^- e com a mistura era maior do que as raízes das plantas tratadas com NH_4^+ e do que o controle.

4.1.1.3 Biomassa total

Depois de quatro meses as plantas tratadas com NO_3^- atingiram o maior valor, 16,57 g, seguidas pelas tratadas com NH_4^++ NO_3^-, que atingiram um valor de médio de 11,75 g (fig 7). A análise estatística mostrou que as plantas tratadas com NO_3^- alcançaram uma biomassa total significativamente maior comparada com o restante dos tratamentos ($p<0.05$). Os tratamentos NH_4^+ e NH_4^++ NO_3^- foram significativamente maiores do que o controle, mas, não foram encontradas diferenças significativas entre eles.

Figura 7 - Efeito dos diferentes tratamentos na biomassa total.



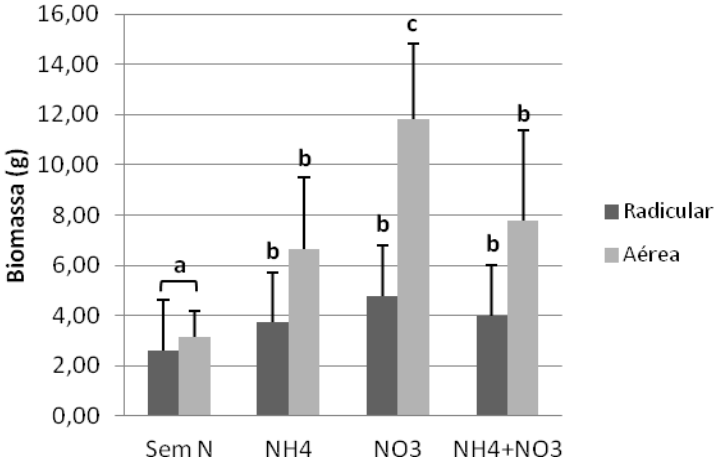
Valores médios (n=20); barras com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

4.1.1.4 Biomassa radicular e biomassa aérea

O maior valor de biomassa radicular foi atingido pelas plantas submetidas ao tratamento NO_3^- com um valor de 4,78 g, seguidas pelas tratadas com NH_4^++ NO_3^-, que atingiram um valor de médio de 3,99 g (fig8). A análise estatística mostrou que as plantas tratadas com NO_3^- alcançaram uma biomassa radicular significativamente maior comparada com o restante dos tratamentos ($p<0.05$). Os tratamentos NH_4^+ e NH_4^++ NO_3^- foram significativamente maiores do que o controle, mas, não foram encontradas diferenças significativas entre eles.

De forma similar, a biomassa aérea de plantas tratadas com NO_3^- foi significativamente maior comparada com o restante dos tratamentos (fig 8) ($p<0.05$). As plantas tratadas com NH_4^+ e NH_4^++ NO_3^- apresentaram valores significativamente maiores coparadas ao controle, mas, não foram encontradas diferenças significativas entre eles.

Figura 8 - Efeito dos diferentes tratamentos nas biomassas radicular e aérea.

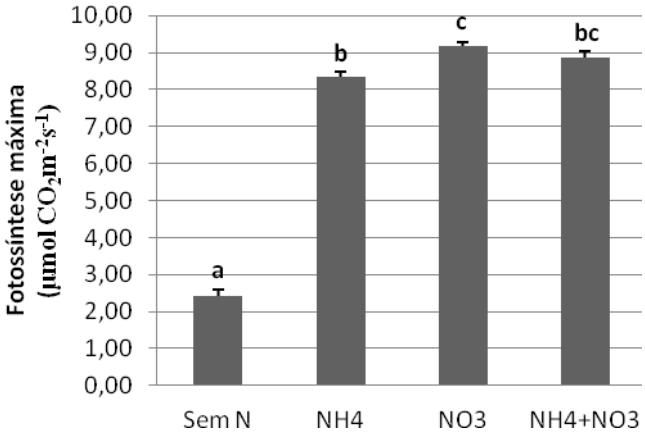


Valores médios (n=20); barras com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

4.1.2 Assimilação líquida máxima do CO_2.

As plantas tratadas com NO_3^- apresentaram o maior valor de assimilação máxima de CO_2 com 9,1 µmol CO_2 $m^{-2}s^{-1}$, seguidas pelo tratamento NH_4^++ NO_3^- (8,9 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}) e o tratamento com NH_4^+ (8,3 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}). O controle apresentou o menor resultado neste parâmetro com um valor de 2,4 µmol CO_2 $m^{-2}s^{-1}$(fig 9). Os resultados de respiração no escuro são apresentados no quadro 1

Figura 9 - Efeito dos diferentes tratamentos na assimilação máxima de CO_2.



Valores médios (n= 3); barras com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

A análise estatística mostrou que os valores atingidos pelas plantas tratadas com NO_3^- foram significativamente maiores do que as plantas controle e o tratamento NH_4^+ ($p<0.05$). Não foram encontradas diferenças significativas entres os tratamentos NO_3^- e NH_4^++ NO_3^-.

O quadro 1 apresenta um resumo dos diferentes parâmetros de crescimento avaliados nas plantas de cana-de-açúcar submetidas aos quatro diferentes tratamentos. O tratamento com NO_3^- foi significativamente melhor do que os tratamentos restantes em seis dos sete parâmetros avaliados: número de folhas, altura, área foliar, biomassa aérea, biomassa da raiz e assimilação maxima de CO_2.

Quadro 1 - Efeito dos diferentes tratamentos nos parâmetros de crescimento avaliados nas plantas.

	Controle (Sem N)	**NH_4^+**	**NO_3^-**	**NH_4^++ NO_3^-**
No. Folhas	5,3 (0,95) a	6,6 (1,13) b	7,9 (1,12) c	7,1 (0,74) b
Altura (cm)	82,25 (9,07) a	94,23(11,35) b	114,58 (16,20) c	102,98 (11,40) b
Comp. raiz (cm)	117,71 (36,81) a	130,44 (44,43) ab	128,52 (24,59) ab	130,85(44,30) ab
Área foliar (cm2)	165,62 (51,24) a	361,63 (115,0) b	525,76 (113,2) c	422,33b
Biomassa raiz (g)	2,61 (0,82) a	3,72 (1,06) b	4,79 (1,15) b	3,99 (0,88) b
Biomassa aérea (g)	3,13 (1,07) a	6,65 (2,24) b	11,83 (5,36) c	7,76 (3,61) b
Amax	2,4 (0,15)a	8,3 (0,24)b	9,1 (0,12)cd	8,9 (0,15)c

Os valores apresentados referem-se às médias das diferentes medidas com o seu respectivo desvio padrão (entre parênteses). Amax – assimilação máxima (µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}); valores médios seguidos da mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012)

Os resultados dos diferentes parâmetros de crescimento demonstraram que a fonte de nitrogênio mais apropiada para o crescimento e desenvolvimento de plantas de cana-de-açucar, sob as condições avaliadas, é o nitrato. Essa forma de nitrogênio foi usada nos experimentos subsequentes.

4.2 Experimento 2: Cultura das plantas inoculadas com *Rhizobium* sp. ICB503, durante os meses Abril -Junho de 2011.

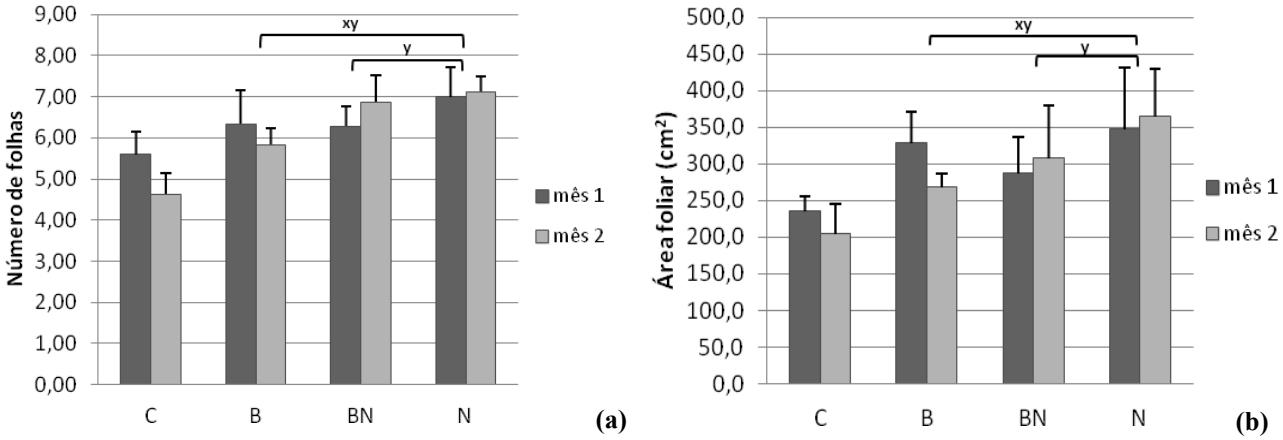
Uma análise estatística dos dados para avaliar se havia diferenças entre as plantas precedeu aos ensaios de inoculação da bactéria. Esta análise mostrou que não existiam diferenças significativas na altura e no número de folhas uma semana após o corte do tolete.

4.2.1 Parâmetros de crescimento

4.2.1.1 Número de folhas e área foliar

No primeiro mês de crescimento, o número de folhas nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos variou entre 5 e 7 folhas, sendo o NO_3^- o melhor tratamento nesse parâmetro (fig 10a) O número de folhas de plantas inoculadas nos tratamentos B e BN foi maior do que as plantas do tratamento C.

Figura 10 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) no número de folhas, e (b) na área foliar total das plantas durante os dois meses de experimentos.



Valores médios (n=5); x: efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y: efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z: efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

Do primeiro para o segundo mês, as plantas nos tratamentos N e BN apresentaram aumento no número de folhas, no entanto, as plantas do tratamentos B e C apresentaram diminução no número de folhas. Apesar deste resultado, os três tratamentos foram significativamente maiores do o tratamento C.

No primeiro mês, o aumento do número de folhas dos tratamentos B, BN e N comparados ao controle foram de 13%, 12% e 25% respectivamente. No segundo mês, os aumentos foram de 25%, 48% e 54% respectivamente. A análise estatística mostrou que houve atuação, na planta, tanto da bactéria quanto do nitrato ($p<0.05$). Na presença de nitrato não existem diferenças entre plantas tratadas ou não com bactéria (BN e N). Igualmente, em presença da bactéria, não existem diferenças significativas no número de folhas de plantas tratadas ou não com nitrato (BN e B).

Quanto à área foliar observou-se que, nos dois meses, as plantas do tratamento N apresentaram áreas maiores que o restante dos tratamentos (fig 10b). No primeiro mês, as áreas foliares de plantas do tratamento BN foram menores do que as áreas de plantas no tratamento B. Nos dois casos, as áreas foliares, com valores médios de 267 e 307cm^2 respectivamente, foram maiores do que nas plantas do tratamento C. No segundo mês, as plantas do tratamento BN apresentaram áreas maiores do que as plantas do tratamento B, mostrando valores médios de 283 e 328 cm^2, respectivamente.

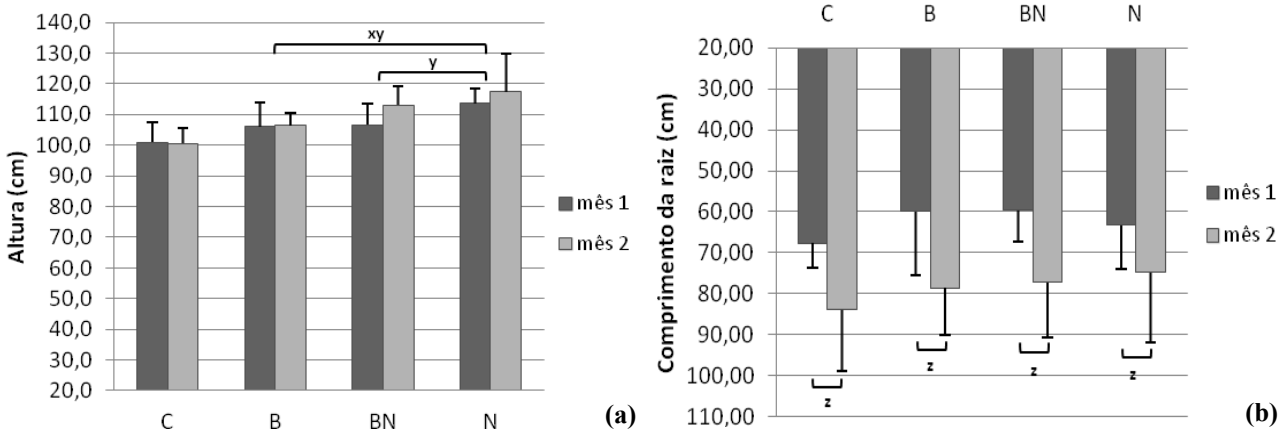
Na figura 10b, pode-se observar que do primeiro para o segundo mês, houve uma diminução na área foliar das plantas nos tratamentos B e C. Contudo, na análise estatística foi detectado efeito, sobre a planta, tanto da bactéria (B e BN) como de NO_3^- (N e BN) ($p<0.001$), o que evidencia que não existem diferenças significativas entre B, BN e N.

4.2.1.2 Altura

No primeiro mês, a altura das plantas do tratamento N foi maior do que o restante dos tratamentos, atingindo um valor de 113,58 cm (fig 11a) As plantas nos tratamentos BN e B mostraram valores médios muito próximos, 106,03 e 106,57 cm respetivamente, apresentando uma altura maior do que as plantas do tratamento C. No segundo mês, as plantas do tratamento N apresentaram uma altura 16% maior do que as do tratamento C. Os tratamentos B e BN mostraram, respectivamente, plantas com alturas 5% e 12% maiores do que as plantas do tratamento C (fig 11a)

A análise estatística mostrou que nitrato e bactéria influenciaram positivamente na altura das plantas, comparados ao tratamento C. Em presença de NO_3^- não houve diferenças significativas entre plantas tratadas (B e BN) ou não (N e C) com a bactéria. Igualmente, em presença da bactéria não houve diferença na altura de plantas tratadas (N e BN) ou não (B e C) com nitrato.

Figura 11 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) na altura e (b) no comprimento das raízes das plantas durante dois meses de experimentos.



Valores médios (n=5); x: efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z: efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

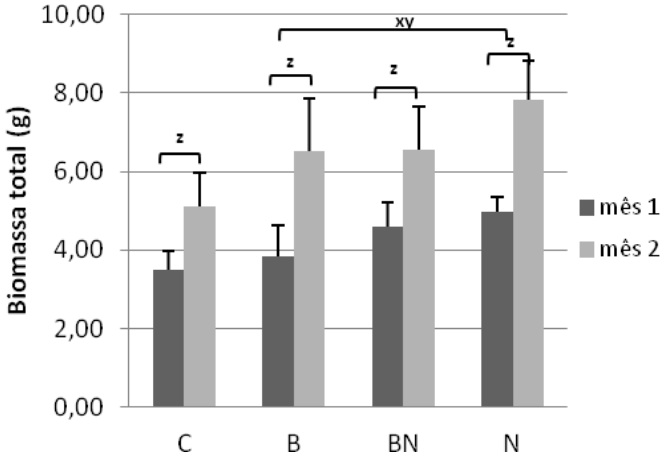
4.2.1.3 Comprimento das raízes

No primeiro mês, os valores do comprimento das raízes variaram, em média, entre 63 e 67 cm (fig 11b), sendo que as plantas controle apresentaram o maior valor. Não foram encontradas diferenças entre nenhum dos tratamentos. No segundo mês, os valores de comprimento de raiz variaram em média, entre 74 e 86 cm, as plantas no tratamento C foram também as que atingiram o maior comprimento. Não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos tratamentos, nem efeito de interação entre a bactéria e o NO_3^- .

4.2.1.4 Biomassa total

Referente à biomassa total, observou-se que as plantas tratadas do tratamento N foram as que atingiram os maiores valores médios nos dois meses de experimento com valores de 4,98 e 7,81 g respectivamente (fig 12). Do primeiro para o segundo mês houve aumento significativo em todos os tratamentos neste parâmetro ($p<0.05$). A análise estatística mostrou a existência de efeito de interação entre a bactéria e o NO_3^- ($p<0.05$): Em presença da bactéria não existem diferenças significativas entre plantas tratadas ou não com NO_3^-, igualmente em presença de NO_3^- não existem diferenças significativas entres plantas inoculadas ao não com a bactéria.

Figura 12 - Efeito dos diferentes tratamentos na biomassa total das plantas durante os dois meses de experimentos.

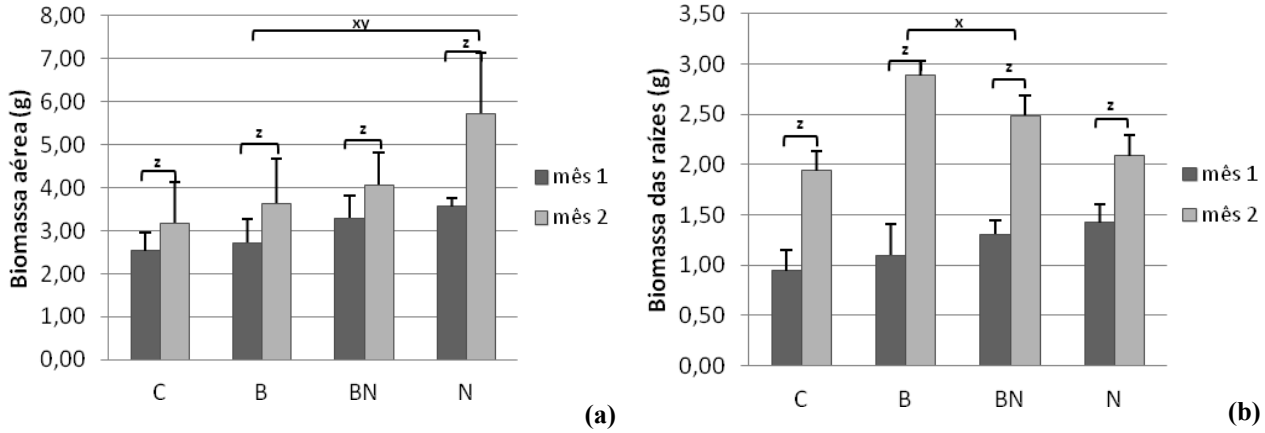


Valores médios (n=5); x: efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y: efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z: efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

4.2.1.5 Biomassa aérea

Tanto no primeiro, quanto no segundo mês de experimentos, observou-se que o maior valor de biomassa da parte aérea foi atingido pelas plantas do tratamento N apresentando pesos médios de 3,56g no primeiro mês e de 5,73 g no segundo (fig 13a). Nos tratamentos B e BN a biomassa da aérea também foi maior do que as plantas do tratamento C. Em todos os tratamentos as plantas apresentaram um aumento significativo na biomassa aérea do primeriro para o segundo mês. Na análise estatística foi detectado efeito tanto da bactéria quanto do NO_3^- ($p<0.05$), revelando que não existem diferenças significativas entre os três tratamentos.

Figura 13 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) na biomassa aérea e (b) na biomassa radicular nas plantas durante dois meses de experimentos.



Valores médios (n=5); x: efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y: efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z: efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

4.2.1.6 Biomassa radicular

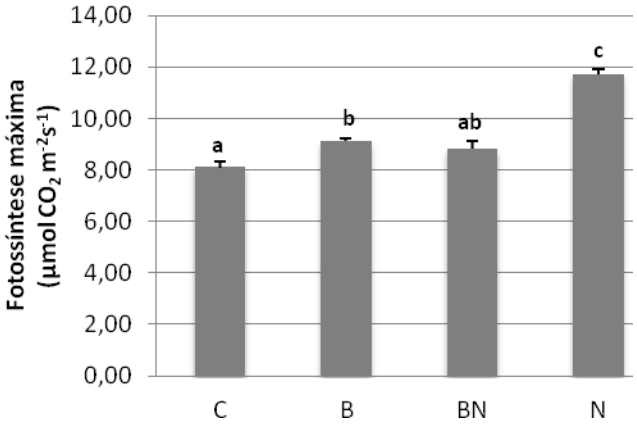
Quanto à biomassa das raízes, no primero mês de experimentos as plantas do tratamento N foram as que apresentaram o maior valor médio, 1,42 g, Comparadas às plantas no tratamento C, os tratamentos B, BN e N atingiram valores de biomassa radicular significativamente maiores (fig 13b) ($p<0.05$). No segundo mês, as plantas do tratamento B foram as que apresentaram a maior biomassa radicular com um valor médio de 2,88 g, seguidas pelas plantas do tratamento BN. Na análise estatística foi detectado efeito tanto da bactéria quanto do NO_3^- ($p<0.05$), não existindo diferenças significativas entre os tratamentos B, BN e N. Em todos os tratamentos houve aumento nos valores de biomassa radicular do primeiro para o segundo mês ($p<0.05$).

4.2.2 Assimilação líquida máxima do CO_2

No primeiro mês, as plantas do tratamento N apresentaram um valor médio de assimilação líquida máxima de CO_2 significativamente maior do que o apresentado por plantas dos demais tratamentos, atingindo um valor de 11,7 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}; em seguida o valor atingido por as plantas do tratamento B (9,1 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}) foi significativamente maior do que o das plantas do tratamento C. As plantas do tratamento BN apresentaram um valor médio de 8,8 µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}, não existindo diferenças significativas entre elas e as plantas do tratamento B, nem com as plantas do tratamento C, que apresentaram valores ligeiramente mais baixos (fig 14). Devido às

condições climáticas, não foi possível realizar medidas de taxa fotossintética no segundo mês de experimentos.

Figura 14 - Efeito dos diferentes tratamentos na assimilação máxima das CO_2 das plantas durante o primeiro mês de experimentos.



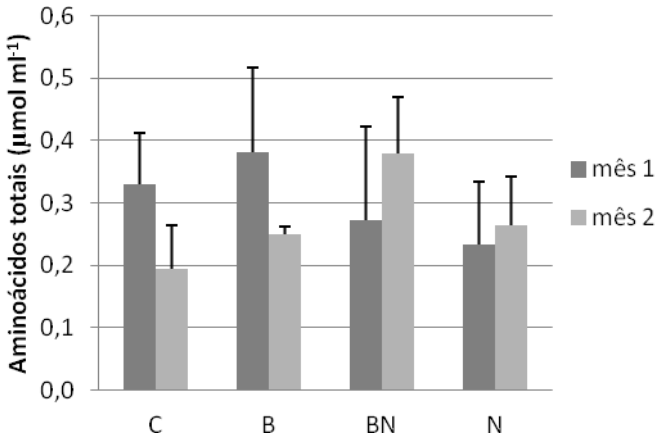
Valores médios (n=3); barras com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p<0.05$)
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

4.2.3 Análise dos aminoácidos contidos no fluido do xilema

Tanto no primeiro quanto no segundo mês de experimentos, os resultados obtidos, referentes ao conteúdo de aminoácidos presentes na seiva do xilema, foram muito variáveis. Na análise estatística foi determinado que não existem diferenças significativas entre os tratamentos quanto à quantidade de aminoácidos totais presentes na seiva, não sendo este parâmetro influenciado nem pela bactéria ($p=0.136$) nem pelo nitrato ($p=0.970$) (fig15). Igualmente não houve aumento significativo na quantidade de aminoácidos totais do primeiro para o segundo mês ($p=0.450$).

A análise qualitativa e quantitativa da seiva do xilema mostrou que nos dois meses houve prevalência dos aminoácidos Asp, Gln, Asn, Glu, e Arg, sendo os três primeiros encontrados numa maior proporção (fig 16).

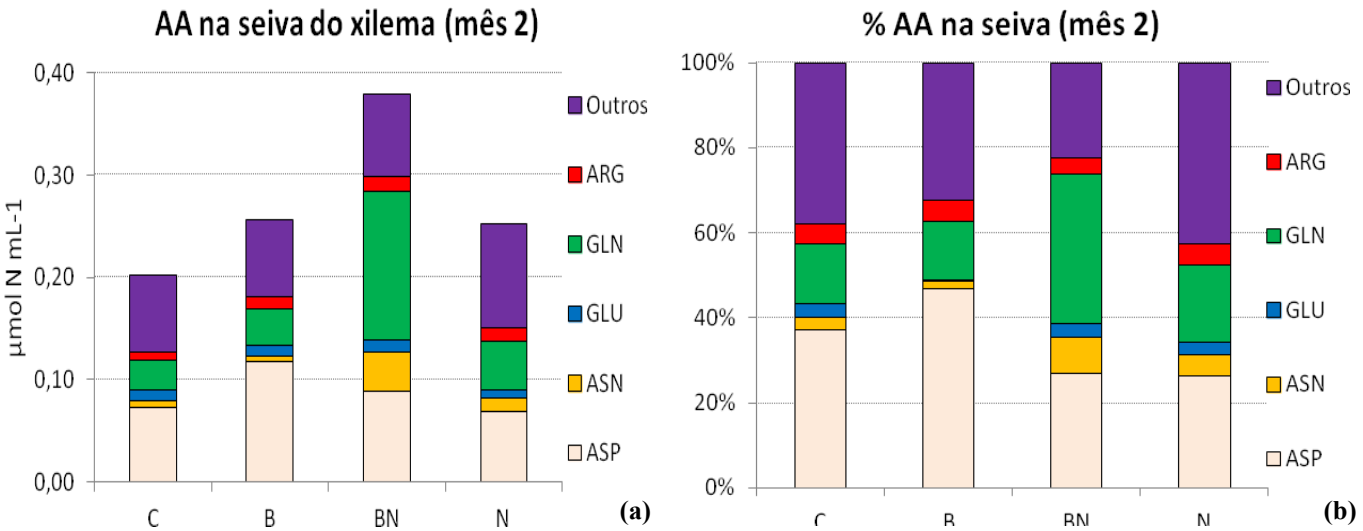
Figura 15 - Aminoácidos totais encontrados na seiva do xilema de plantas submetidas aos diferentes tratamentos.



Valores médios (n=3); x: efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y: efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z: efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012)

No segundo mês de experimentos as plantas do tratamento BN apresentaram uma maior quantidade de Gln do que o restante dos tratamentos (fig 16a). Devido à variabilidade dos dados no primeiro mês, foram realizados gráficos de quantidade e porcentagem dos aminoácidos apenas do segundo mês de experimentos (fig 16).

Figura 16 - Aminoácidos encontrados na seiva do xilema de plantas durante o segundo mês de tratamentos. (a) Quantidade de aminoácidos (b) Porcentagem dos aminoácidos.

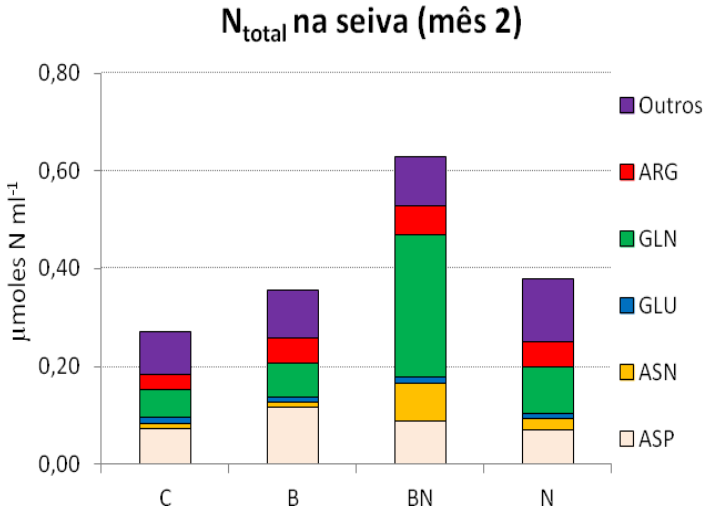


Valores médios (n=3).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012)

Embora não terem sido encontradas diferenças significativas no teor total de aminoácidos, as plantas do tratamento BN apresentaram quantidades de Asp e Gln maiores comparadas com os outros tratamentos (fig 16a). Observou-se também uma porcentagem de Gln foi maior nas plantas do tratamento BN, a porcentagem do restante dos aminoácidos foi muito similar nos diferentes tratamentos (fig 16b).

Em concordância com os resultados nas figuras 15 e 16 as plantas do tratamento BN apresentaram a maior quantidade de nitrogênio total transportado pelos aminoácidos na seiva do xilema, atingindo um valor de 0,63 µmol N ml^{-1}. O aminoácido Gln foi o que maior quantidade de nitrogênio aportou para o teor total. Os tratamentos B e N apresentaram valores muito próximos, sendo maiores do que os atingidos pelas plantas controle (fig 17).

Figura 17 - Nitrogênio total (Ntotal) transportado por aminoácidos na seiva do xilema de plantas durante o segundo mês de tratamentos.



Valores médios (n=3).
Fonte: RADA-MARTINEZ, 2012

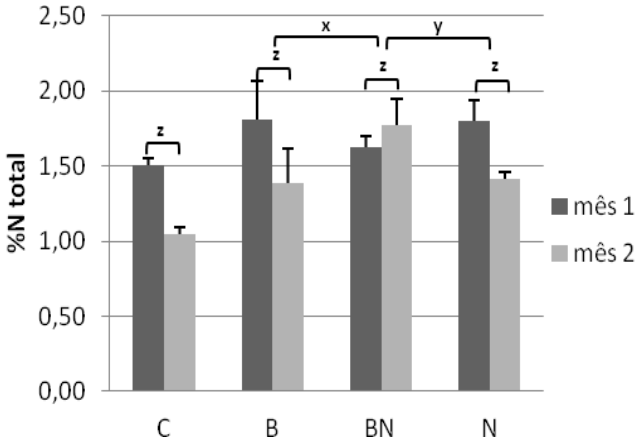
4.2.4 Análise elementar da porcentagem de N em amostras de folhas e raízes

4.2.4.1 Porcentagem de nitrogênio (%N) total

A porcentagem de nitrogênio nos tecidos das plantas no primeiro mês foi maior naquelas submetidas aos tratamentos B e N, com valores médios muito próximos: 1,81% e 1,80%, respectivamente. Com exceção do tratamento BN, houve uma queda significativa na porcentagem de nitrogênio total do primeiro para o segundo mês ($p<0.05$). No segundo mês as plantas do tratamento BN apresentaram uma maior porcentagem de nitrogênio total (1,77%)

seguidas pelos tratamentos N e B (fig 18). A análise estatística mostrou efeito tanto da bactéria ($p<0.05$) (tratamentos B e BN) quanto do nitrato ($p<0.05$) (tratamentos BN e N).

Figura 18 - Efeito dos diferentes tratamentos na porcentagem de nitrogênio (%N) total das plantas durante dois meses de experimentos.



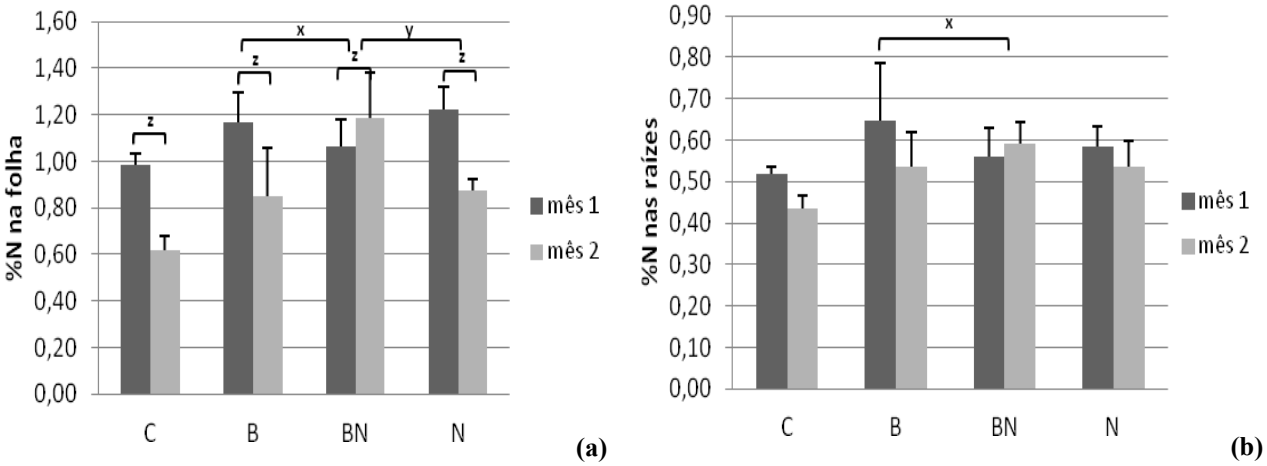
Valores médios (n=3); x: efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y: efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z: efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

4.2.4.2 Porcentagem de nitrogênio(%N) nas folhas e raízes

Analisando separadamente a porcentagem de nitrogênio das folhas e das raízes encontrou-se que em ambas, nos dois meses de experimentos, a bactéria aumento significativamente esses parâmetros ($p<0.05$). No primero mês, as plantas do tratamento N atingiram a maior %N nas folhas seguidas de perto pelas plantas do tratamento B com valores de 0,92% e 0,71% respectivamente. Nesse mês as plantas do tratamento B apresentaram os maiores valores de %N nas raízes, sendo que os outros dois tratamentos ficaram próximos às plantas do tratamento C. Nas folhas houve uma diminuição siginificativa na %N do primeiro para o segundo mês ($p<0.05$).

No segundo mês, as plantas do tratamento BN apresentaram maiores %N tanto nas folhas quanto nas raízes com valor médio de 1,18% e 0,59% respectivemente, seguidas pelos tratamentos N e B (fig 19). As diferenças na %N entre os tratamentos, foram menos evidentes na raiz do que nas folhas, mesmo assim, foram encontradas diferenças significativas entre plantas tratratadas (B e BN) ou não (B e C) com NO_3^- ($p<0.05$).

Figura 19 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) na porcentagem de nitrogênio (%N) nas folhas e (b) nas raízes das plantas durante dois meses de experimentos.



Valores médios (n=3); x efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

4.2.5 Re-isolamento de Rhizobium sp. ICB503

O inoculo inicial foi de 2,5x 10^8 UFC ml^{-1}. A bactéria foi recuperada apenas das raízes das plantas nos tratamentos B e BN. Trinta dias após a inoculação (DAI) a população bacteriana recuperada nos tratamentos B e BN foi 4,8x10^4 e 3,0x10^4 UFC $g^{-1}ml^{-1}$ respectivamente. Do primeiro para o segundo mês (60 DAI) houve uma queda na população sendo recuperadas 2,5x10^3 UFC $g^{-1}ml^{-1}$ apenas nas plantas tratadas do tratamento B (quadro 2).

Quadro 2. Contagem de UFC$g^{-1}ml^{-1}$ de *Rhizobium* sp. ICB503 nas raízes das plantas.

Tratamento	UFC$g^{-1}ml^{-1}$ 30DAI	UFC$g^{-1}ml^{-1}$ 60DAI
B	4,8x10^4	2,5x10^3
BN^-	3,0x10^4	<10
N^-	0	0
C	0	0

Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012)

4.3 Experimento 3: Cultura das plantas inoculadas com *Rhizobium* sp. ICB503, durante os meses Novembro - Janeiro de 2012.

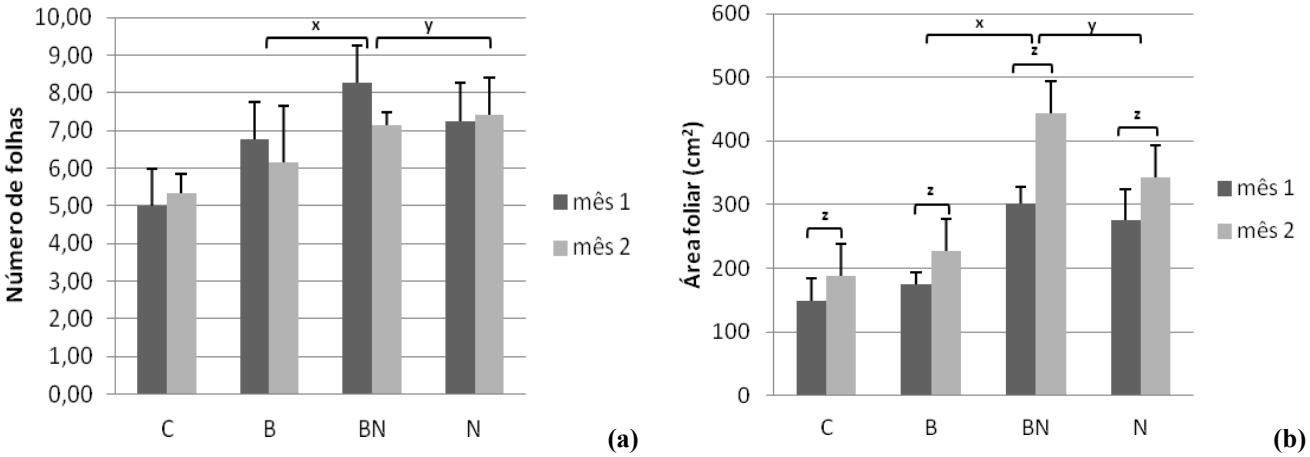
Foram realizadas medidas de número de folhas e altura de todas as plantas uma semana após o corte do tolete e imediatamente antes do inicio dos tratamentos, com o objetivo de se analisar se as plantas estavam no mesmo tamanho. A análise estatística destes dados mostrou que não existiam diferenças significativas nesses parâmetros no inicio dos experimentos.

4.3.1 Parâmetros de crescimento

4.3.1.1 Número de folhas e área foliar

No primeiro mês de crescimento, o número de folhas nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos variou entre 5 e 10, sendo o tratamento BN o que apresentou o maior maior valor médio com 8,25 folhas seguido pelos tratamento N e B. As plantas no tratamento C apresentaram o menor número de folhas com um valor médio de 5,00 folhas (fig 20a). Não houve aumento significativo neste parâmetro do primeiro para o segundo mês (p=0.360), aliás, plantas dos tratamentos B e BN apresentaram uma diminuição no número de folhas (fig 20a) e as plantas nos tratamentos N e C apresentaram um pequeno aumento no segundo mês de experimentos.

Figura 20 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) no número de folhas e (b) na área foliar total das plantas durante dois meses de experimentos.



Valores médios (n=5); x: efeito da bactéria; y: efeito do nitrato; z: efeito do tempo; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

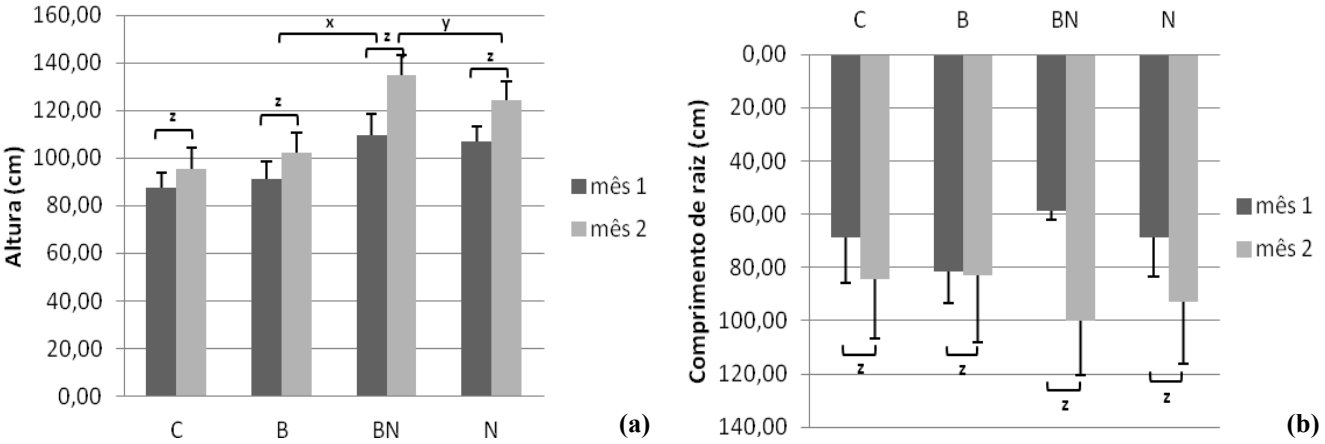
A análise estatística mostrou que existem diferenças significativas entre as plantas tratadas com bactéria (B e BN) ou não (N e C) ($p<0.05$). Igualmente, existem diferenças significativas entre plantas tratadas e não tratadas com NO_3^- ($p<0.05$). No entanto não foi detectado efeito de interação entre bactéria e nitrato ($p=0.114$).

Durante os dois meses de experimentos as plantas do tratamento BN foram as que apresentaram a maior área foliar, seguidas pelas plantas do tratamento N. É importante ressaltar que nos dois meses as áreas foliares de plantas do tratamento B foram 17% e 20% maiores do que as de plantas do tratamento C no primeiro e segundo mês respectivamente (fig 20b). As diferenças entre os tratamentos foram mais evidentes no segundo mês, sendo que as plantas do tratamento BN atingiram uma área foliar média de 444,07 cm^2, 29% maior do que a atingida pelas plantas do tratamento N. A análise estatística mostrou que existem diferenças significativas entre plantas tratadas com bactéria (B e BN) e plantas sem inocular (tratamentos N e C) ($p<0.05$). Do mesmo modo, existe diferença significativa entre plantas tratadas e não tratadas com NO3- ($p<0.05$). Contudo não foi detectado efeito de interação entre a bactéria e o nitrato ($p=0.560$).

4.3.1.2 Altura

Nos dois meses de experimentos a altura das plantas do tratamento BN foi maior do que o restante dos tratamentos atingindo valores médios de 109,55 e 134,94 cm, no primeiro e segundo mês respectivamente (fig 21a). As plantas do tratamento B foram 35% maiores no primeiro mês e 15% maiores no segundo comparadas ao tratamento C. Houve um aumento significativo na altura das plantas do primeiro para o segundo mês ($p<0.05$). No primeiro mês as plantas nos tratamentos BN e N apresentaram alturas médias muito próximas, 109,55 e 107,20 cm, respectivamente. No segundo mês plantas do tratamento BN foram 8,6% maiores do que as plantas do tratamento N. A análise estatística mostrou que a altura de plantas dos tratamentos B e BN foi significativamente maior do que a altura de plantas não tratadas com a bactéria (C e N) ($p<0.05$). Igualmente existem diferenças significativas entre plantas tratadas ou não com NO_3^- ($p<0.05$). Apesar disso não foi detectado efeito de interação entre a bactéria e o nitrato ($p=0.816$).

Figura 21 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) na altura e (b) no comprimento das raízes das plantas durante dois meses de experimentos.



Valores médios (n=5); x: efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y: efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z: efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

4.3.1.3 Comprimento das raízes

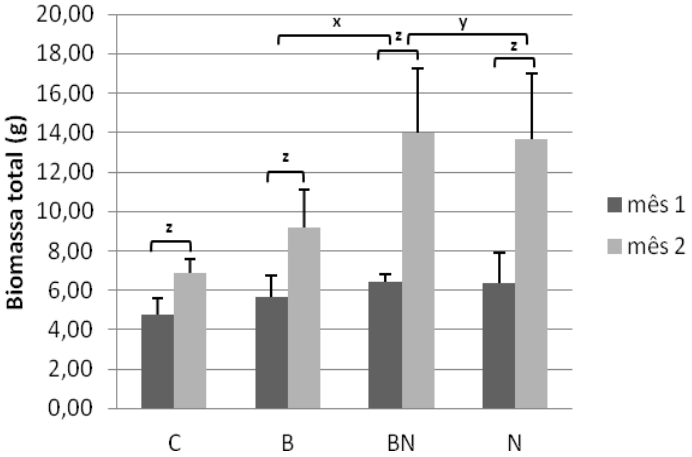
Quanto ao comprimento das raízes, os valores variaram em média entre 68 e 81 cm no primeiro mês, e entre 82 e 100 cm no segundo (fig 21b). As plantas do tratamento B atingiram o maior valor no primeiro mês, e as plantas do tratamento BN no segundo. Não foram encontradas diferenças significativas entre nenhum dos tratamentos, nem efeito de interação; no entanto, as raízes das plantas no segundo mês foram significativamente maiores do que no primeiro mês ($p<0.05$).

4.3.1.4 Biomassa total

Nos dois meses de experimentos, as plantas do tratamento BN foram as que atingiram os maiores valores médios de biomassa total seguidas pelas plantas do tratamento N (fig 22). Em todos os tratamentos houve aumento significativo neste parâmetro do primeiro para o segundo mês ($p<0.05$). No segundo mês, as plantas do tratamento BN apresentaram uma biomassa total 103% maior do que as plantas do tratamento C e os tratamentos B e N mostraram, respectivamente, plantas com alturas 99% e 33% maiores do que as do tratamento C (fig 22). A análise estatística mostrou que a biomassa total de plantas tratadas com *Rhizobium* sp. ICB503 (B e BN) foi significativamente maior do que a biomassa total das plantas não tratadas com a bactéria (C e N) ($p=0.05$). Igualmente existe diferença significativa entre plantas tratadas ou não

com NO_3^- ($p<0.05$); apesar disso não foi detectado efeito de interação entre a bactéria e o nitrato ($p=0.112$).

Figura 22 - Efeito dos diferentes tratamentos na biomassa total das plantas durante dois meses de experimentos.



Valores médios (n=5); x efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

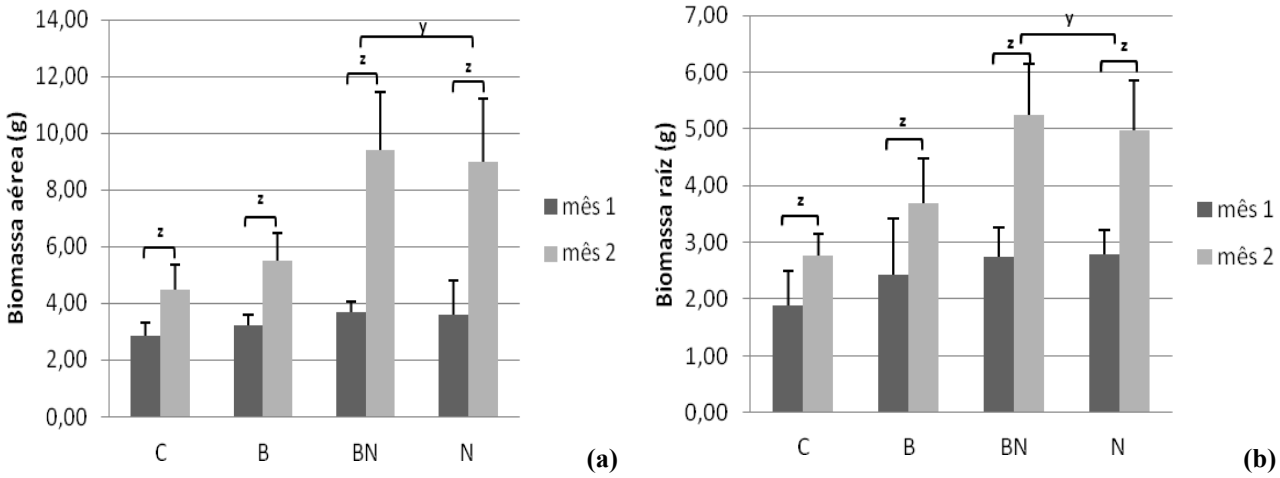
4.3.1.5 Biomassa aérea

No primeiro mês de experimentos as plantas submetidas aos diferentes tratamentos alcançaram valores médios de biomassa aérea muito próximos, variando entre 2,87 e 3,68 g (fig 23a). Já no segundo mês, houve um aumento significativo neste parâmetro ($p<0.05$) sendo as plantas do tratamento BN as que atingiram o maior valor (9,42 g) seguidas pelas plantas do tratamento N. As plantas do tratamento B atingiram uma biomassa aérea 22% maior do que das plantas do tratamento C. Não foram encontradas diferenças significativas entre plantas tratadas ou não com *Rhizobium* sp. ICB503, no entanto, plantas tratadas com NO_3^- (N e BN) foram significativamente maiores do que as plantas não tratadas (C e B) ($p<0.05$). Não foi detectado efeito de interação entre a bactéria e o nitrato ($p=0.564$).

4.3.1.6 Biomassa radicular

Durante o primeiro mês de crescimento os valores médios de biomassa radicular foram muito similares entre todos os tratamentos variando de 2,78 g nas plantas do tratamento N a 1,90 g nas plantas do tratamento C (fig 23b).

Figura 23 - Efeito dos diferentes tratamentos (a) na biomassa aérea e (b) na biomassa radicular das plantas durante dois meses de experimentos.



Valores médios (n=5); x: efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y: efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z: efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: RADA-MARTINEZ, 2012.

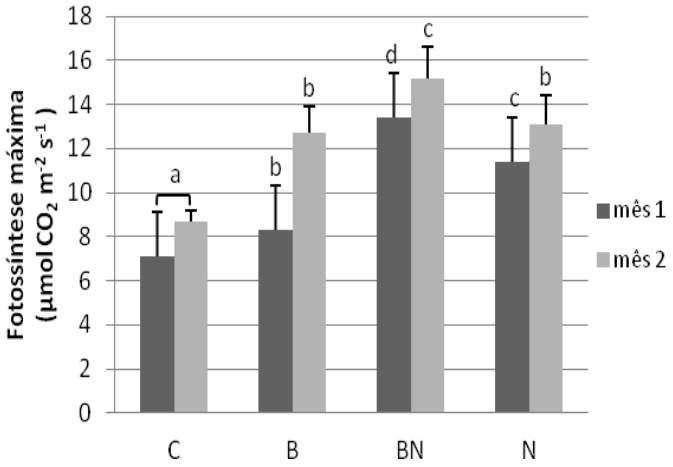
Do primeiro para o segundo mês houve um aumento significativo na biomassa radicular das plantas em todos os tratamentos ($p<0.05$). As plantas tratamento BN atingiram o maior valor com um peso médio de 5,25 g seguidas pelas plantas do tratamento N. As plantas do tratamento B foram 32% maiores do que as plantas do tratamento C, no entanto, não foram encontradas diferenças significativas entres plantas tratadas (B e BN) ou não (N e C) com a bactéria ($p=0.165$). Também não foi detectado efeito de interação entre a bactéria e o nitrato ($p=0.316$).

4.3.2 Assimilação líquida máxima do CO_2

Durante os dois meses de experimentos as plantas do tratamento BN apresentaram valores de assimilação máxima de CO_2 significativamente maiores que o restante dos tratamentos ($p<0.05$). Igualmente, as plantas nos tratamentos N e B exibiram valores médios significativamente maiores do que as plantas do tratamento C ($p<0.05$) (fig 24). No primeiro mês, as plantas do tratamento BN alcançaram um valor médio de 13,4µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} seguidas pelas plantas nos tratamentos N e B com valores de 11,4 e 8,3µmol CO_2 m^{-2} s^{-1} respectivamente. No segundo mês, as plantas do tratamento BN também atingiram um valor médio de assimilação de CO_2 significativamente maior do que os outros tratamentos (15,2 µmol m^{-2} s^{-1}) ($p<0.05$). Os

tratamentos B e N foram significativamente maiores do que o tratamento C, mas não foram encontradas diferenças significativas entre eles.

Figura 24 - Efeito dos diferentes tratamentos na assimilação máxima de CO_2 das plantas durante dois meses de experimentos.



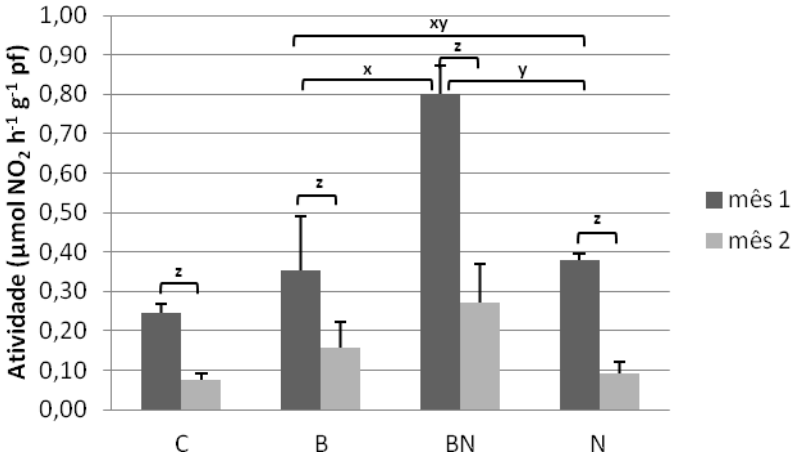
Valores médios (n=3); barras com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p<0.05$).
Fonte: RADA-MARTINEZ, 2012

4.3.3 Atividade da enzima nitrato redutase (NR) foliar

Os resultados obtidos de atividade da enzima NR foliar durante os dois meses de experimentos mostraram que tanto no primeiro quanto no segundo mês, as plantas do tratamento BN atingiram a maior atividade (fig 25). Em todos os tratamentos houve uma diminuição significativa da atividade da enzima do primeiro para o segundo mês ($p<0.05$). No primeiro mês as plantas do tratamento BN apresentaram uma atividade enzimática média de 0,407 µmol NO_2^- h^{-1} g^{-1} pf, seguidas pelas plantas dos tratamentos N e B que apresentaram atividades médias muito semelhantes.

A análise estatística mostrou que existem diferenças significativas entre plantas inoculadas (tratamentos B e BN) ou não com a bactéria (tratamentos C e N) ($p<0.05$); igualmente existem diferenças significativas entre plantas tratadas ou não com NO_3^- ($p<0.05$). Além disso, a análise detectou a existência de efeito de interação entre a bactéria e o NO_3^- ($p=0.05$).

Fig 25 - Efeito dos diferentes tratamentos na atividade da enzima nitrato redutase (NR) foliar das plantas durante dois meses de experimentos.



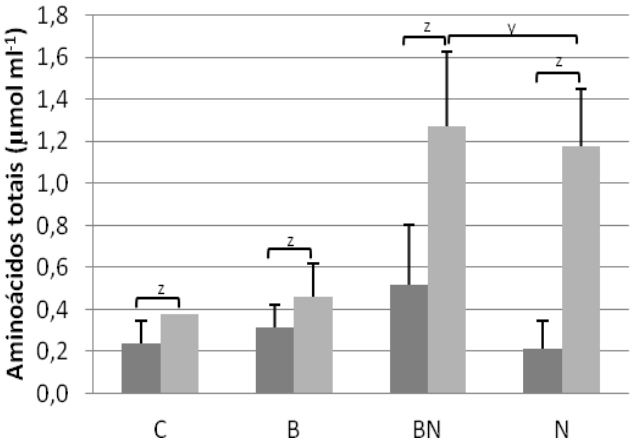
Valores médios (n=3); x: efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y: efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z: efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTÍNEZ, 2012)

4.3.4 *Análise dos aminoácidos contidos no fluido do xilema*.

Durante os dois meses de experimentos, os dados obtidos referentes ao conteúdo de aminoácidos presentes na seiva do xilema foram muito variáveis. A análise estatística mostrou que a quantidade de aminoácidos totais nos diferentes tratamentos foi influenciada significativamente pelo NO_3^- (tratamentos N e BN) apenas no segundo mês de experimentos ($p<0.05$) (fig 26). Quando analisados os dois meses em conjunto verificou-se um aumento significativo na quantidade de aminoácidos totais nos diferentes tratamentos do primeiro para o segundo mês ($p<0.05$).

Nos dois meses de experimentos foi encontrada prevalência dos aminoácidos Asp, Gln, Asn, Glu e Arg, sendo os três primeiros encontrados numa maior proporção. No segundo mês de experimentos as plantas do tratamento BN apresentaram maior quantidade de Glu do que o restante dos tratamentos (fig 27).

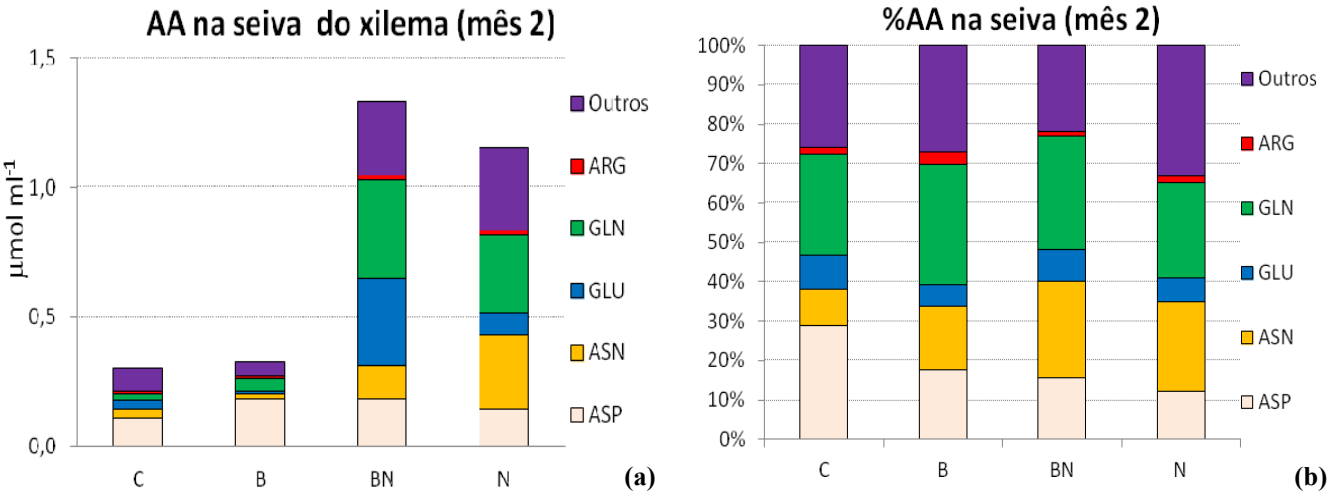
Figura 26 - Aminoácidos totais encontrados na seiva do xilema de plantas submetidas, durante dois meses, aos diferentes tratamentos.



Valores médios (n=3); x: efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y: efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z: efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

Já que as diferenças no conteúdo de aminoácidos na seiva entre os diferentes tratamentos foram mais evidentes no segundo mês, foram realizados gráficos de quantidade e porcentagem destes aminoácidos apenas daquele mês (fig 27).

Figura 27 - Aminoácidos encontrados na seiva do xilema das plantas durante o segundo mês de tratamentos. (a) Quantidade de aminoácidos (b) Porcentagem dos aminoácidos.

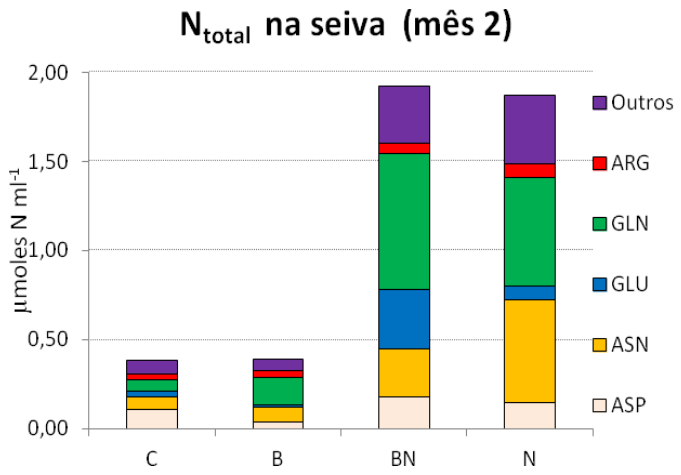


Valores médios (n=3).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

A quantidade de aminoácidos foi significativamente maior nas plantas tratadas com nitrato (fig 27a). Apesar disso a porcentagem total dos aminoácidos foi muito similar em todos os tratamentos (fig 27b).

Em concordância com os resultados nas figuras 27 e 28 as plantas do tratamento BN apresentaram a maior quantidade de nitrogênio total transportado pelos aminoácidos na seiva do xilema atingindo um valor de 1,92 µmol N ml^{-1}. Os tratamentos B e N apresentaram valores muito próximos, sendo maiores do que os atingidos pelas plantas controle (fig 28).

Figura 28 - Nitrogênio total (Ntotal) transportado por aminoácidos na seiva do xilema de plantas submetidas durante o segundo mês de tratamentos.



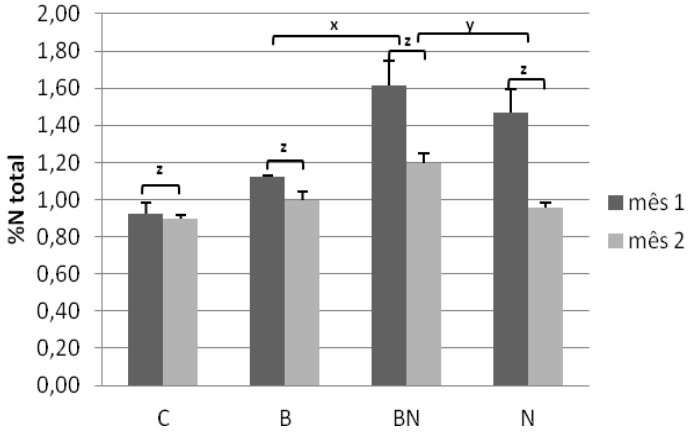
Valores médios (n=3).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012)

4.3.5 Análise elementar da porcentagem de nitrogênio (%N) em amostras de folhas e raízes

4.3.5.1 Porcentagem de nitrogênio (%N) total

Durante o primeiro mês de crescimento a porcentagem de nitrogênio total presente nos tecidos foi maior nas plantas do tratamento BN com um valor médio de 1,62%, seguida pelas plantas do tratamento N com um valor médio de 1,42% (fig 29). As plantas do tratamento B foram 21% maiores em conteúdo de N total que as plantas do tratamento C. Do primeiro para o segundo mês houve uma queda significativa na porcentagem de N total ($p<0.05$).

Figura 29 - Efeito dos diferentes tratamentos na porcentagem de nitrogênio (%N) total nas plantas durante dois meses de experimentos.

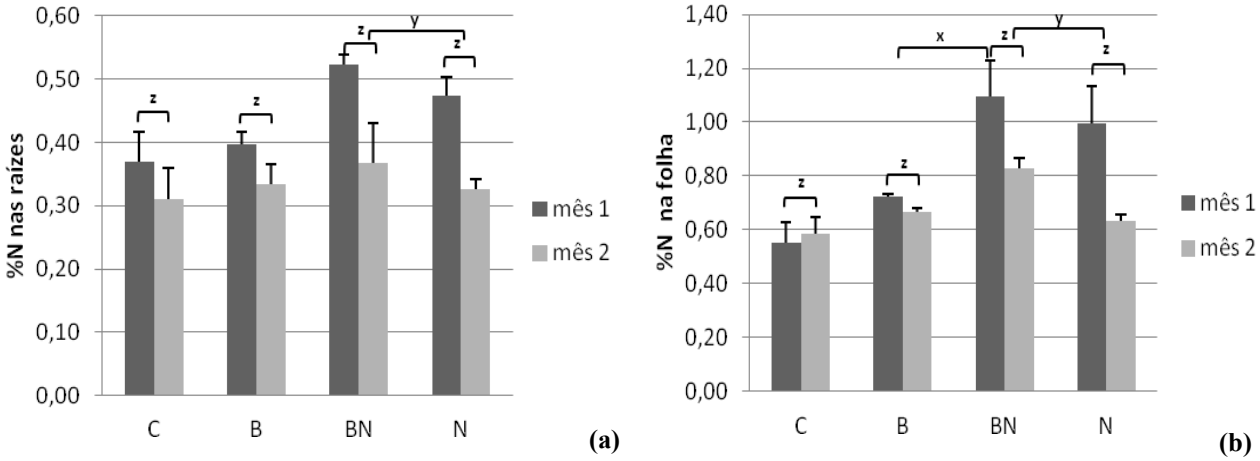


Valores médios (n=3); x: efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y: efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z: efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

4.3.5.2 Porcentagem de nitrogênio (%N) nas folhas e raízes

Similar aos resultados obtidos na planta inteira, analisando-se separadamente a porcentagem de nitrogênio nas folhas e raízes, encontrou-se que durante os dois meses de crescimento as plantas no tratamento BN acumularam maior quantidade de nitrogênio tanto nas folhas quanto nas raízes (fig 30).

Figura 30 - Efeito dos diferentes tratamentos na porcentagem de nitrogênio (%N) (a) nas folhas e (b) nas raízes das plantas durante dois meses de experimentos.



Valores médios (n=3); x: efeito da bactéria (B e BN ≠ C e N); y: efeito do nitrato (N e BN ≠ C e B); z: efeito do tempo (mês 1 ≠ mês 2) ; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: RADA-MARTINEZ, 2012.

As diferenças entre os diversos tratamentos foram mais evidentes no primeiro do que no segundo mês. As plantas no tratamento BN atingiram porcentagens médias de nitrogênio de 1,09% e 0,52% em folhas e raízes respectivamente, seguidas pelas plantas tratadas apenas com NO_3^-, que atingiram porcentagens de 1,0% na folha (fig 30a) e 0,47% na raiz (fig 30b). As plantas no tratamento B acumularam 30% e 8% de nitrogênio a mais nas folhas e raízes, respectivamente, do que as plantas controle.

Do primeiro para o segundo mês, houve uma queda significativa na porcentagem de nitrogênio em folhas e raízes de todos os tratamentos ($p<0.05$). Existem diferenças significativas na %N foliar entre plantas inoculadas (B e BN) ou não (N e C), sendo que a bactéria influencia o conteúdo de nitrogênio nesse órgão ($p<0.05$). Igualmente, existem diferenças entre plantas tratadas (N e BN) ou não (B e C) com nitrato, observando-se a influência deste nutriente no conteúdo de nitrogênio na folha. Não foram encontradas diferenças significativas entre a %N radicular em plantas inoculadas ou não com a bactéria ($p=0.07$).

4.3.6 Re-isolamento de Rhizobium sp. ICB 503

O inóculo inicial foi de $4,7x10^8$ UFC ml^{-1}. Após a inoculação, a bactéria foi recuperada apenas das raízes nos tratamentos B e BN, não sendo encontradas bactérias nas folhas. A população de *Rhizobium* sp. ICB503 nas raízes de plantas submetidas aos diferentes tratamentos ao longo do tempo é apresentada no quadro 3. Foi encontrado um aumento significativo na população 60 DAI nas plantas no tratamento B ($p<0.05$). Ao contrário, as plantas do tratamento BN exibiram uma queda significativa na população bacteriana após dois meses de experimentos ($p<0.05$).

Quadro 3 - Contagem de UFC g^{-1} de *Rhizobium* sp. ICB503 nas raízes das plantas do experimento 3

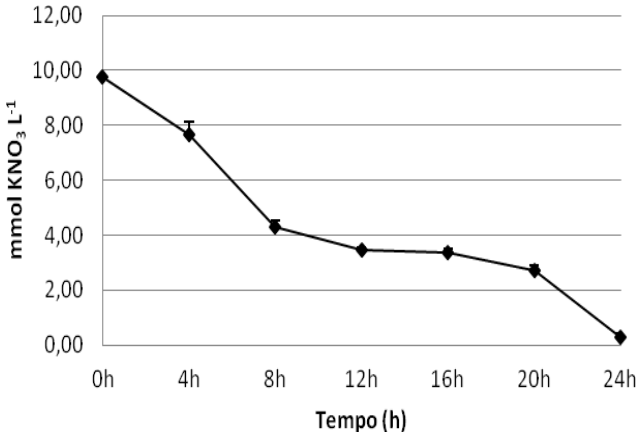
Tratamento	UFCg^{-1} 5DAI	UFCg^{-1} 30 DAÍ	UFCg^{-1} 60 DAÍ
B	$2,7x10^4$	$4,4x10^4$	$9,6x10^4$
BN	$2,7x10^4$	$3,2x10^4$	$1,0x10^4$
N	0	0	0
C	0	0	0

Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012)

4.4 Consumo de nitrato por *Rhizobium* sp. ICB503 em meio de cultura contendo KNO_3 como fonte de nitrogênio.

Rhizobium sp.ICB503 cresceu em meio de cultura contendo KNO_3^- como fonte de N-combinado, indicando que possui a enzima nitrato redutase assimilatoria ativa. Foi medida a concentração remanescente de KNO_3 no meio de cultura ao longo do tempo, partindo de uma concentração inicial de 9,77 mmol l^{-1}. Depois de 24 h de cultura a quantidade de KNO_3^- no meio era de 0,29 mmol l^{-1}. Os resultados obtidos mostraram que houve uma diminuição significativa na concentração de NO_3^- ao longo do tempo (fig 31).

Figura 31 - Curva do consumo de NO_3^-exibido pela cultura de *Rhizobium* sp.ICB 503 ao longo do tempo.



Valores médios (n=3).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012).

Um resumo dos parâmetros avaliados nos experimentos 2 e 3 e apresentado nos quadros 4 e 5. A visão geral dos dados permite realizar uma análise comparativa dos resultados obtidos nos dois experimentos.

No experimento 2 (quadro 4), realizado nos meses abril – junho, quando comparadas ao tratamento controle, as plantas do tratamento B apresentaram diferenças significativas em oito dos doze parâmetros avaliados: número de folhas, área foliar, biomassa de raiz, biomassa total, %N nas raízes, %N nas folhas, %N total e capacidade fotossintética máxima. Comparadas também ao controle, as plantas do tratamento N, apresentaram valores significativamente maiores em todos os parâmetros avaliados com exceção do comprimento radicular, biomassa radicular e

aminoácidos totais. O tratamento BN apresentou valores significativamente maiores comparados ao tratamento C em dez parâmetros, com exceção apenas do comprimento radicular e aminoácidos totais. Em todos esses parâmetros, as plantas do tratamento N apresentaram os maiores valores médios, mesmo assim, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos N, BN e B.

No experimento 3 (quadro 5), realizado nos meses novembro – janeiro, quando comparadas ao tratamento C, as plantas do tratamento B apresentaram diferenças significativas em dez dos treze parâmetros avaliados: número de folhas, altura, área foliar, biomassa da raiz, biomassa da folha, biomassa total, %N nas folhas, %N total, capacidade fotossintética máxima e nitrato redutase foliar. Igualmente, quando comparadas ao controle, as plantas nos tratamentos N e BN apresentaram valores significativamente maiores em doze dos treze parâmetros avaliados, com exceção apenas do comprimento radicular. Em todos esses parâmetros, as plantas do tratamento BN apresentaram os maiores valores médios, no entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos N, BN e B.

Verificando os valores obtidos nos dois experimentos, pode se observar que as plantas do experimento 2, não apresentaram um crescimento significativo do primeiro para o segundo mês. Ao contrario, as plantas do experimento 3, exibiram crescimento significativo em vários dos parâmetros avaliados entre os dois meses. Importante ressaltar que as plantas do experimento 2, começaram maiores do que as plantas do experimento 3, razão pela qual alguns dos valores do primeiro mês do experimento 2, foram maiores do que os valores do experimento 3 (quadros 4 e 5).

Quadro 4 - Resumo dos parâmetros medidos em plantas submetidas aos diferentes tratamentos durante os meses abril-junho.

EXPERIMENTO 2	CONTROLE (C)		BACTÉRIA (B)		BACTÉRIA + NO_3^- (BN)		NO_3^- (N)	
Parâmetro	**Mês 1**	**Mês 2**	**Mês1**	**Mês2**	**Mês1**	**Mês2**	**Mês1**	**Mês2**
No. FOLHAS [xy; y]	5,6 (0,55)	4,63 (0,52)	6,33 (1,13)	5,83 (0,41)	6,29 (1,12)	6,88 (0,64)	7,0 (0,74)	7,13 (0,35)
ALTURA (cm) [y; xy]	101,00 (7,25)	100,48 (15,16)	106,03(7,71)	106,40(3,93)	106,61 (6,95)	113,11 (6,23)	113,58 (4,87)	117,49 (12,16)
COMP. RAIZ (cm) [z]	67,60 (6,17)	86,41 (25,43)	59,87(15,64)	78,60(11,51)	59,64 (7,60)	77,21 (13,46)	60,66 (10,86)	74,73 (17,18)
ÁREA FOLIAR (cm^2) [y; xy]	235,28 (19,78)	204,73 (50,20)	328,11 (42,56)	267,76 (18,44)	286,68 (50,24)	307,83 (71,77)	347,11 (84,11)	364,43 (65,26)
BIOMASSA RAIZ (g) [x; z]	0,94 (0,21)	1,94 (0,58)	1,09 (0,32)	2,88 (0,65)	1,34 (0,14)	2,49 (0,57)	1,45 (0,19)	2,09 (0,54)
BIOMASSA AÉREA (g) [z; xy]	2,54 (0,40)	3,18 (0,94)	2,73 (0,55)	3,63 (1,04)	3,39 (0,55)	4,06 (0,76)	3,58 (0,24)	5,73 (1,41)
BIOMASSA TOTAL (g) [z; xy]	3,48(0,50)	5,11(0,85)	3,82(0,80)	6,52(1,35)	4,6(0,61)	6,55(1,10)	4,98(0,36)	7,81(1,70)
%N FOLHAS [x; y; z]	0,99(0,05)	0,62(0,06)	1,17(0,13)	0,85(0,21)	1,07(0,12)	1,18(0,20)	1,22(0,10)	0,87(0,05)
%N RAZES [x]	0,52(0,02)	0,43(0,03)	0,65(0,14)	0,54(0,08)	0,56(0,07)	0,59(0,05)	0,58(0,05)	0,54(0,06)
%N TOTAL [x; y;z]	1,51(0,05)	1,05(0,04)	1,81(0,25)	1,39(0,23)	1,63(0,07)	1,77(0,17)	1,8(0,14)	1,41(0,05)
AMINOÁCIDOS TOTAIS ($\mu mol\ ml^{-1}$)	0,33(0,08)	0,19(0,07)	0,38(0,01)	0,25(0,01)	0,27(0,04)	0,38(0,018)	0,23(0,1)	0,26(0,078)
Amax ($\mu mol\ CO_2\ m^{-2}\ s^{-1}$)	8,1(0,5)	NM	9,1 (0,5)	NM	8,8 (0,5)	NM	11,7 (0,5)	NM

Dados referentes aos valores médios das diferentes medidas com seu respectivo desvio padrão (entre parêntesis). Amax: assimilação máxima de CO_2; NM: não medido. As letras depois de cada parâmetro referem-se a: x: efeito da bactéria; y: efeito do nitrato; z: efeito do tempo; xy: interação nitrato-bactéria ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012)

Quadro 5 - Resumo dos parâmetros medidos em plantas submetidas aos diferentes tratamentos durante os meses novembro-janeiro.

EXPERIMENTO 3	CONTROLE (C)		BACTÉRIA (B)		BACTÉRIA + NO_3^- (BN)		NO_3^- (N)	
Parâmetro	**Mês 1**	**Mês 2**	**Mês1**	**Mês2**	**Mês1**	**Mês2**	**Mês1**	**Mês2**
No. FOLHAS [x; y]	5,00 (0,82)	5,33 (0,52)	6,75 (0,96)	6,17 (1,94)	8,25 (1,26)	7,13 (0,34)	7,25 (1,26)	7,43 (0,50)
ALTURA (cm) [x; y]	87,75 (6,00)	95,22(9,35)	91,30(7,33)	102,27(8,57)	109,65 (9,04)	134,94 (8,57)	107,20 (6,30)	124,27 (12,16)
COMP. RAÍZES (cm) [z]	68,63 (16,97)	86,34 (22,15)	81,48(12,07)	82,80(25,44)	58,68 (3,55)	100,08 (20,32)	68,70 (14,82)	93,06 (23,6)
ÁREA FOLIAR (cm^2) [x; y; z]	149,33 (34,7)	188,21 (34,25)	174,79 (17,89)	226,81 (36,51)	300,99 (27,63)	444,07 (91,35)	275,96 (47,43)	343,67 (100,7)
BIOMASSA RAIZ (g) [x;z]	1,92 (0,70)	2,78 (0,37)	2,02 (0,50)	3,69 (1,23)	2,75 (0,51)	5,25 (1,30)	2,78 (0,43)	4,98 (0,88)
BIOMASSA AÉREA (g) [y;z]	2,87 (0,42)	4,50 (0,85)	3,24 (0,36)	5,52 (0,95)	3,68 (0,38)	9,17 (2,23)	3,61 (1,17)	8,99 (2,21)
BIOMASSA TOTAL (g) [x; y; z]	4,77(0,81)	6,88(0,72)	5,66(1,07)	9,2(1,90)	6,42(0,41)	14,00(3,24)	6,39(1,53)	13,69(3,28)
%N FOLHAS [x; y; z]	0,55(0,07)	0,59(0,06)	0,72(0,01)	0,67(0,02)	1,09(0,14)	0,83(0,03)	1,00(0,14)	0,63(0,03)
%N RAÍZES [y;z]	0,37(0,05)	0,31(0,05)	0,4(0,02)	0,33(0,03)	0,52(0,02)	0,37(0,06)	0,47(0,07)	0,33(0,02)
%N TOTAL [x; y; z]	0,92(0,06)	0,9(0,02)	1,12(0,01)	1,00(0,05)	1,62(0,13)	1,2(0,05)	1,47(0,12)	0,96(0,03)
AMINÁCIDOS TOTAIS ($\mu mol\ ml^{-1}$)	0,24(0,10)	0,38(0,01)	0,31(0,10)	0,46(0,16)	0,52(0,28)	1,27(0,35)	0,21(0,13)	1,18(0,27)
Amax ($\mu mol\ CO_2\ m^{-2}\ s^{-1}$)	7,01(0,7)	8,70 (0,30)	8,3(0,6)	12,70 (0,50)	13,4(1,6)	15,20 (1,20)	11,4(1,3)	13,10(0,98)
NR FOLIAR ($\mu mol\ NO_2\ h^{-1}\ g^{-1}pf$) [x; y; z; xy]	0,244 (0,023)	0,076(0,016)	0,353(0,138)	0,157(0,066)	0,802(0,072)	0,272(0,098)	0,381(0,015)	0,093(0,029)

Dados referentes aos valores médios das diferentes medidas com seu respectivo desvio padrão (entre parêntesis). Amax: assimilação máxima de CO2; NR, nitrato redutase. As letras depois de cada parâmetro referem-se a: x: efeito da bactéria; y: efeito do nitrato; z: efeito do tempo; xy: interação bactéria-nitrato ($p<0.05$).
Fonte: (RADA-MARTINEZ, 2012

5 DISCUSSÃO

A retirada dos toletes antes do inicio dos tratamentos foi realizada com o objetivo de verificar se eles forneciam uma quantidade de nutrientes, dentre estes o nitrogênio, indesejável para a implantação dos experimentos. O trabalho de Kleingesinds (2010) mostrou que a reserva de nutrientes retardava sua absorção do ambiente e, consequentemente, a observação e avaliação de resultados das plantas submetidas aos diferentes tratamentos.

5.1 Preferência no uso de fontes de nitrogênio

A maioria das espécies vegetais é capaz de absorver e assimilar nitrato, amonia ou formas orgânicas de nitrogênio como ureia ou aminoácidos, mas, a resposta da planta a uma forma de nitrogênio, em particular, varia de espécie para espécie (CRAWFORD; GLASS, 1998; MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Em regiões aeróbias dos solos, o nitrato é a forma como o N é predominantemente absorvido. No entanto, existem grandes áreas florestais, arrozais e tundra ártica onde o NO_3^- é indetectável ou indisponível e o NH_4^+ ou os aminoácidos predominam; portanto, plantas nativas dessas regiões vão apresentar taxas de absorção maiores para as formas de nitrogênio preponderantes (GLASS, 2009; MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010).

Os resultados obtidos nas medidas dos diferentes parâmetros de crescimento: número de folhas, altura, comprimento das raízes, área foliar, biomassa (radicular e aérea) e assimilação líquida máxima do CO_2 demonstraram que a fonte de nitrogênio mais apropriada para o desenvolvemento de plantas de cana-de-açúcar, sob as condições avaliadas, é o nitrato. Com exeção do comprimento das raízes, o tratamento com NO_3^- foi significativamente superior comparado com os demais (quadro 1). Pesquisas realizadas por Robinson et al., 2011 e Glass, 2009 para determinar a preferência da fonte nitrogênio por uma planta, avaliaram apenas o balanço entre o influxo e o efluxo dos nutrientes nas raízes num periodo curto de tempo (horas ou días). Estas pesquisas seriam mais adequadas para outros fins e não para se avaliar a melhor fonte de N para a planta. Resultados similares aos obtidos no experimento 1 foram reportados em diversas espécies de plantas; nesses casos foi avaliada a resposta a diferentes formas ou concentrações de nitrogênio, medindo parâmetros de crescimento como altura, área foliar, biomassa radicular, biomassa foliar, capacidade fotossintética, rendimento de grãos, entre outros (ASHRAF et al., 2008; GARBIN; DILLENBURG, 2008; ROOSTA et al., 2009; ZHOU, 2011).

Neste trabalho demonstrou-se que o número de folhas, a altura, a área foliar e a biomassa das plantas tratadas com NO_3^-, foram significativamente maiores do que o restante dos tratamentos. Valores maiores em área foliar, número de folhas e altura traduziram-se em maior produção de biomassa aérea das plantas. Estes são parâmetros de crescimento vegetativo que podem ser resultado da disponibilidade, absorsão e assimilação de uma fonte apropriada de nitrogênio (BIGGS, 2003; RODRIGUES, 2005).

O sistema radicular da cana-de-açúcar é composto por três tipos de raízes: superficiais, de fixação e de corda. As primeiras visam a absorção de nutrientes e as outras duas têm função de âncora (DILLEWIJN, 1952 apud BIGGS, 2003; FARONI, 2004). O comprimento e volume das raízes têm sido associados à capacidade para absorver água e nutrientes (CHOPART et al., 2010). No entanto, raízes mais longas, não necessariamente significam maior capacidade de absorção (BIGGS, 2003). A conformação das raízes pode depender do local onde estejam os nutrientes necessarios para a planta crescer; se os nutrientes encontram-se apenas no topo do solo (até 50 cm), a absorção será maior nesta região (BIGGS, 2003; VERT; CHORI, 2009;). Na cana-de-açúcar, a captação de nutrientes depende, principalmente, de sua área de absorção no solo, fazendo com que a planta aumente a produção de raízes secundarias para melhor aproveita-los (FARONI, 2004). Em todos os tratamentos, o comprimento das raízes foi igual, porém, o número de raízes secundárias nas plantas tratadas com NO_3^- e na mistura foi maior. Este fato explicaria porque foi observado incremento da biomassa radicular nestes dois últimos tratamentos (fig 8).

Sendo a cana-de-açúcar uma planta de metabolismo fotossintético C_4, é considerada altamente eficiente na conversão de energia radiante em energia química (RODRIGUES, 1995), razão pela qual eram esperados altos valores de taxas fotossintéticas. A eficiência fotossintética pode ser influenciada pela intensidade luminosa, fato este refletido diretamente no comprimento e área das folhas. Com taxas de radiação elevadas, as folhas são mais longas e mais verdes (RODRIGUES, 1995). Outros fatores limitantes da capacidade fotossintética são a disponibilidade de nitrogênio (TURNBULL et al., 1995) e a falta de espaço (BIGGS, 2003; FARONI, 2004).

Considerando que os experimentos foram feitos no período de outubro-fevereiro, quando a intensidade luminosa é alta, não se pode atribuir a esta condição os baixos resultados de fotossíntese em todos os tratamentos. A baixa capacidade fotossintética apresentada pelo tratamento controle pode ser explicada pela carência de nitrogênio para a planta, tornando-a

ineficiente para realizar esse processo. A deficiência de nitrogênio causa redução na fotossíntese, na síntese de aminoácidos e na produção de energia necessária para o seu crescimento (FARONI, 2004). No entanto, plantas tratadas com as diferentes fontes de nitrogênio tiveram outras limitações. Depois do quarto mês de idade, as plantas de cana-de-açúcar começam a desenvolver um sistema de raízes mais aprofundado (raízes de fixação e raízes corda) (BIGGS, 2003); como o comprimento dos vasos era de, no máximo, 80 cm, as raízes não tinham mais espaço suficiente para crescer e tiveram seu desenvolvimento comprometido. Este fato pode ter influenciado direitamente o rendimento fotossintético da planta, pois provavelmente impediu um processo respiratório apropriado das raízes. A respiração aeróbia é o principal suprimento energético utilizado para absorção de nutrientes sendo que, para haver uma adequada aeração, as raízes necessitam 10% do volume de ar no solo (FARONI, 2004).

Os dados aqui apresentados mostraram que as taxas fotossintéticas de plantas tratadas com NO_3^- foram maiores do que as tratadas com NH_4^+ e com a mistura (NH_4^++ NO_3^-). Dados semelhantes foram descritos por Tischchenko et al., (1991) com plantas tratadas com NO_3^- que apresentavam maior crescimento e maior atividade da fosfoenol-piruvato carboxilase do que plantas tratadas com ureia (BIGGS, 2003). Estes resultados sugerem que o nitrato é uma melhor fonte de nitrogênio para a cana-de-açúcar sob as condições avaliadas.

Trabalhos que avaliaram a preferência de plantas de cana-de-açúcar por NO_3^-ou NH_4^+ como fonte de N apresentaram resultados destoantes, dependendo da variedade de cana-de-açúcar, concentração do nutriente, temperatura, entre outros fatores (BIGGS, 2003). Num dos primeiros trabalhos publicados a respeito, Dillewijn (1952) afirmou que plantas jovens de cana, quando cultivadas hidroponicamente, cresciam igualmente bem em NH_4^+ e NO_3^-, mas a eficiência no uso do nitrogênio era maior nas plantas submetidas a NO_3^- como fonte de nitrogênio. De forma similar, os resultados obtidos no experimento 1 do presente trabalho mostram melhor eficiência no uso do nitrogênio por plantas tratadas com NO_3^-, traduzida em maior crescimento e maiores valores de taxa fotossintética (quadro 1). No entanto, estes resultados contradizem aqueles reportados por Robinson et al., (2011). Dados destes autores mostraram que as plantas de cana-de-açúcar preferem o amônio sobre o nitrato. No entanto, os pesquisadores trabalharam com nitrato e amônio em conjunto e não separadamente, o que não permitiu verificar o efeito apenas do NO_3^- no desenvolvimento da planta. Por outro lado a preferência do amônio sobre o nitrato foi observada, somente, quando as plantas foram tratadas com nitrogênio em excesso (10 mM),

condição que pode ocasionar consequências negativas ao crescimento, uma vez que concentrações altas de NH_4^+ são tóxicas para a planta (BIGGS, 2003).

5.2 Experimentos de inoculação com *Rhizobium* sp. ICB503 (Experimentos 2 e 3)

Rhizobium sp. é uma bactéria conhecida por exercer efeito positivo no crescimento de plantas leguminosas através do estabelecimento de uma associação simbiótica (MEHBOOB; NAVEED; ZAHIR, 2009; RHIJN; VANDERLEYDEN, 1995). Rizóbios também foram isolados como endofíticos de plantas não leguminosas como arroz, trigo e milho. Nestas plantas, esses microrganismos desempenharam o papel de promotores de crescimento pela liberação de substâncias promotoras do crescimento vegetal (SPCV) (HÖFLICH, 2000; MEHBOOB; NAVEED; ZAHIR, 2009). No entanto, até o momento, não têm sido reportados trabalhos que avaliem os efeitos de *Rhizobium* sp. sobre o crescimento da cana-de-açúcar.

No presente trabalho foram realizados dois experimentos de inoculação com *Rhizobium* sp. ICB503 em duas estações climáticas diferentes: outono e verão.

O primeiro experimento (referido como experimento 2) foi realizado nos meses de abril, maio e junho, com dias mais curtos e temperaturas médias máximas mensais de 27,2 °C, 22,3 °C e 22,3 °C (IMET, 2012) respectivamente. Os resultados obtidos no primeiro e segundo mês, relacionados ao número de folhas, área foliar, biomassa da raiz, biomassa total, %N nas raízes e folhas e taxa fotossintética mostraram que as plantas do tratamento B apresentaram maiores valores médios comparados às plantas do tratamento C (quadro 4). Comparados ao tratamento C, foram observados maiores valores médios de número de folhas, área foliar, altura, biomassa aérea, %N nas raízes e folhas e taxa fotossintética em plantas submetidas ao tratamento N. O tratamento BN beneficiou as plantas em todos os parâmetros avaliados, com exceção do comprimento das raízes. No entanto, as dosagens de aminoácidos da seiva não mostraram diferenças nos diferentes tratamentos. Efeitos positivos sobre as plantas foram observados tanto com a inoculação da bactéria quanto o com o tratamento com nitrato. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos B, N e BN, mas foram encontradas diferenças significativas entre esses tratamentos e as plantas controle. Foi observado também que não houve crescimento significativo das plantas, em vários dos parâmetros avaliados, do primeiro para o segundo mês. Inclusive, as plantas C e as plantas B apresentaram diminuição no número de folhas, com uma consequente redução da área foliar (fig 10 e quadro 4). Estes resultados podem ser explicados

pelo fato da última coleta ter sido realizada no mês de junho, quando a temperatura não é a melhor para o crescimento para a cana-de-açúcar (BIGGS, 2003; MARCHIORI, 2004; OLIVEIRA, 2011).

O experimento 2 foi realizado com dois objetivos: avaliar o efeito da inoculação bacteriana e testar a resposta da planta à retirada de um maior volume do tolete (fig 4). Por esta razão, este ensaio foi realizado em meses que não são considerados os mais apropriados para o crescimento da cana-de-açúcar. Neste período as temperaturas são mais baixas e há menor índice de radiação solar. Temperaturas próximas a 30 °C são fundamentais nos primeiros estágios de crescimento da cana-de-açúcar. A luminosidade é fundamental para a realização do processo de fotossíntese e quando for baixa, reduz drasticamente a emissão de novos perfilhos (OLIVEIRA, 2011). No entanto, embora o crescimento das plantas do primeiro para o segundo mês não tenha sido significativo em vários dos parâmetros avaliados, os resultados demonstraram a existência de interação entre a bactéria e o NO_3^-, indicando que a microrganismo exerceu um efeito positivo no crescimento das plantas.

O experimento 3 foi realizado nos meses de novembro, dezembro e janeiro com temperaturas médias máximas mensais de 26 °C, 27,8 °C e 27 °C (IMET, 2012) respectivamente e dias mais longos, condições climáticas mais apropriadas para o crescimento da cana-de-açúcar (MARCHIORI, 2004; OLIVEIRA, 2011). Os resultados obtidos no primeiro e segundo meses, relacionados ao número de folhas, altura, área foliar, biomassa da raiz, biomassa aérea, biomassa total, %N nas folhas, %N total e taxa fotossintética mostraram que as plantas do tratamento B apresentaram maiores valores médios comparados às plantas to tratamento C (quadro 5). Foram observados maiores valores médios de número de folhas, altura, área foliar, biomassa aérea, biomassa das raízes e biomassa total, %N em raízes, %N folhas, %N total e taxa fotossintética quando plantas submetidas ao tratamento N foram comparadas com as plantas do tratamento C. O tratamento BN beneficiou as plantas em todos os parâmetros avaliados. As dosagens de aminoácidos da seiva foram significativamente mais elevadas nos tratamentos N e BN em relação aos demais tratamentos (quadro 5).

A análise estatística mostrou a existência de diferenças significativas entre plantas inoculadas ou não com *Rhizobium* sp. ICB503 (B e BN ≠ C e N) e entre plantas tratadas ou não com NO_3^- (BN e N ≠ B e C) nos parâmetros número de folhas, altura, área foliar, biomassa total e

capacidade fotossintética, havendo assim, efeito tanto da bactéria quanto do nitrato sobre o crescimento das plantas.

Apesar do escasso crescimento das plantas do primeiro para o segundo mês, as diferenças entre os tratamentos do experimento 2 foram mais evidentes no segundo mês. Os parâmetros área foliar e biomassa foram aqueles em que as plantas apresentaram as maiores diferenças comparadas com o controle. As folhas de plantas nos tratamentos N, BN e B foram respectivamente, 78%, 50% e 30% maiores do que as plantas controle. Uma maior área foliar exerce um papel importante na capacidade fotossintética da planta e deve ser conseqüência de melhor assimilação dos nutrientes pelas raízes (BIGGS, 2003; RODRIGUES, 1995;). Ratificando essa afirmação, o experimento mostrou que as plantas no tratamento N atingiram o maior valor em fotossíntese máxima, mostrando um aumento de 44% em relação às plantas controle.

Comparando estes resultados com os obtidos durante o experimento 3, observou-se que a área foliar das plantas no tratamento BN foi 135% maior do que nas plantas controle e 29% maior do que nas plantas do tratamento N. Assim, os maiores valores de fotossíntese máxima foram exibidos pelas plantas no tratamento BN, seguidas pelo tratamento N com aumentos de 74% e 50%, respectivamente em relação às plantas C. É importante ressaltar que nos experimentos 2 e 3, as plantas do tratamento B alcançaram áreas foliares com aumentos superiores a 20% quando comparadas com o tratamento C. Esses resultados também refletiram atividades fotossintéticas maiores. Durante o segundo mês do experimento 3, não foram detectadas diferenças significativas nos valores de fotossíntese máxima entre plantas dos tratamentos N e B (fig 24). Os valores de fotossíntese máxima nestes tratamentos foram 46% e 50% maiores do que os apresentados pelas plantas do tratamento C. Estes resultados sugerem um efeito positivo da bactéria, proporcionando à planta nitrogênio reduzido por fixação, uma vez que o substrato era desprovido de N-combinado. *Rhizobium* sp.ICB503 apresentou atividade da enzima nitrogenase *in vitro*, e foi detectada a presença do gene *nifH* (SOTO, 2008). Estes dados dão suporte à idéia da contribuição de N-fixado da bactéria para a planta.O nitrogênio é fundamental para a composição de várias biomoléculas e de processos metabólicos incluindo a fotossíntese. Resultados similares mostraram que plantas de arroz inoculadas com uma cepa de *Bradyrhizobium* sp., apresentavam folhas 20% maiores que as de plantas não inoculadas. Os autores propuseram, igualmente, que teria havido transferência de N-fixado pela bactéria, para a planta (CHAINTREUIL et al., 2000). Em outro trabalho realizado também em plantas de arroz, a

linhagem *Rhizobium* sp. IRBG74 aumentou significativamente, em ate 14%, a taxa fotossintética das plantas após 25 e 40 dias da emergência; os autores acreditam que não existe uma relação direta entre o aumento da capacidade fotossintética e a fixação biológica de N_2 já que não foram encontrados aumentos significativos no conteúdo de nitrogênio total nas folhas (PENG et al., 2002).

Neste trabalho não foram encontradas diferenças significativas no comprimento das raízes entre os diferentes tratamentos, em nenhum dos experimentos realizados. No entanto, em todos os experimentos, as raízes das plantas cresceram significativamente do primeiro para o segundo mês; este resultado era esperado pelo crescimento natural da planta. Efeitos positivos no sistema radicular poderiam ser melhor avaliados medindo-se parâmetros como volume ou biomassa das raízes (FARONI, 2004). Apesar de não ter medido o volume radicular, os resultados obtidos com os dados de biomassa, sugerem que a bactéria exerça um efeito positivo neste parâmetro.

Nos experimentos 2 e 3, os aumentos referentes à biomassa radicular e biomassa aérea, foram mais evidentes no segundo mês. No experimento 2, as plantas dos tratamentos B e BN foram as que apresentaram os maiores valores de biomassa radicular, com aumentos em relação às plantas controle de 48% e 28%, respectivamente. No experimento 3, os valores de biomassa radicular foram 32% e 88% maiores nos tratamentos B e BN, respectivamente, comparadas às plantas C. Valores altos em biomassa radicular podem proporcionar melhor absorção dos nutrientes, sendo que, como foi discutido anteriormente, este parâmetro pode ser produto de maior produção de raízes secundarias (FARONI, 2004). Estes resultados devem estar relacionados à produção de substancias promotoras de crescimento vegetal (SPCV) pela bactéria. *Rhizobium* sp. ICB503 é capaz de excretar de AIA *in vitro* na concentração de 12,5 $\mu g.ml^{-1}$ (FERRARA, 2010); esta auxina está implicada na emergência e crescimento de raízes primarias e secundarias. A criação rápida de raízes, seja por alongamento da raiz primária ou por proliferação de raízes secundarias, é vantajosa, uma vez que aumenta a capacidade do vegetal de ancorar-se ao solo e obter água e nutrientes, aumentando assim a suas chances de sobrevivência (PATTEN; GLICK, 2002). Em experimentos realizados em campo, Hoflich (2000) detectou que a linhagem R39 de *R. leguminosarum* promoveu a absorção de nutrientes através do aumento de biomassa radicular em plantas de milho, com consequente aumento na biomassa aérea. O pesquisador atribuiu os resultados obtidos à produção de fitohormônios por parte da bactéria, pois essa linhagem produzia citocininas e auxinas *in vitro*. O desenvolvimento apropriado do sistema

radicular traz como consequência o maior crescimento dos parâmetros da parte aérea (FARONI, 2004).

No experimento 2 o maior aumento em biomassa aérea foi atingido por plantas do tratamento N, obtendo um aumento do 80% no segundo mês, comparado com C. As plantas nos tratamentos B e BN também exibiram valores de biomassa aérea maiores que C. A análise estatística mostrou efeitos positivos tanto da bactéria, quanto do nitrato neste parâmetro. De forma similar, no segundo mês do experimento 3, os valores de biomassa aérea das plantas nos tratamentos BN, N e B foram respectivamente, 109%, 99% e 22% maiores do que as das plantas controle. Resultados similares foram reportados por Hossain e Martensson (2008) que obtiveram incrementos de 123,39% na biomassa radicular e de 130,43% na biomassa aérea de plantas de milho, 58 dias após terem sido inoculadas com a linhagem PAR-401 de *R. leguminosarium* bv. *viciae*. Aumentos em biomassa aérea e radicular atribuídos ao efeito de rizóbios em plantas não leguminosas, foram reportados por diversos autores, citando aumentos na biomassa, na área foliar, na altura e/ou atividade fotossintética (CHI et al., 2005; HOFLICH, 2000; KACI et al., 2005; PENG et al., 2002; SINGH et al, 2005).

Analisando-se os dados obtidos nos experimentos 2 e 3 verifica-se que as diferenças entre os tratamentos foram mais evidentes entre o tempo zero e o segundo mês. As plantas crescidas em temperatura mais baixa (experimento 2) não apresentaram crescimento significativo do primeiro para o segundo mês (quadro 4). O baixo crescimento das plantas pode ter mascarado o efeito das bactérias, pois, apesar destas estarem exercendo um efeito positivo, as condições de crescimento não foram as mais apropriadas para a planta. Num experimento realizado em plantas de cana-de-açúcar, em duas estações climáticas diferentes, uma fria (F) e uma quente (Q), Thaweenut et al., (2011) encontraram que, 100 dias após o transplante (DAT) a biomassa das plantas no experimento (F), foi menor do que aquela do experimento (Q), indicando que condições inadequadas de temperatura e luz foram as razões para o pouco crescimento da plantas.

Poder-se-ia considerar também que as baixas temperaturas tiveram efeito negativo nas bactérias, diminuindo a capacidade de colonização, produção de fitohormônios ou fixação de N_2, reduzindo assim uma contribuição para o crescimento da planta. No experimento de Thaweenut et al., (2011) foi descoberto que uma alta expressão de seqüências *nifH* em tecidos de cana-de-açúcar foi encontrada apenas na estação com alta temperatura. Os pesquisadores discutem que a baixa temperatura poderia ter reprimido a expressão de genes *nifH*, assim como a proliferação de

bactérias endofíticas fixadoras de N_2 e a colonização, pois não foi encontrada contribuição significativa de fixação do N_2 100 DAT na época de baixa temperatura. Sabe-se que a temperatura é uma restrição física que pode provocar diminuição da atividade da nitrogenase bactérias associadas a leguminosas (GILLER, 2001). As diferenças obtidas entre os dois experimentos referentes à capacidade fotossintética poderiam também ser explicadas pelas diferenças climáticas. No experimento 2, pôde ser realizada apenas a medida do fotossíntese no primeiro mês, mesmo assim foram obtidos valores de assimilação de CO_2 considerados baixos para cana-de-açúcar (BIGG, 2003). A capacidade catalítica da RuBisCO é modulada, por CO_2, magnésio e luz (SEEMAN et al., 1985), assim a baixa incidência de luz, própria dos meses abril-junho, pode ter influenciado negativamente a capacidade fotossintética das plantas.

Um resultado interessante, comum aos experimentos 2 e 3, foi a %N nas folhas e raízes. Em ambos houve aumento significativo na %N total das plantas tratadas com as bactérias. O efeito das bactérias foi mais evidente nas folhas do que nas raízes, sendo que, no segundo mês do experimento 2, as plantas do tratamento BN apresentaram uma quantidade de nitrogênio nas folhas 90% maior do que as plantas C e 35% maior do que nas plantas do tratamento N. As plantas do tratamento B aumentaram em 37% o conteúdo de nitrogênio nas folhas, comparado com o das plantas C (fig 19). Similar ao experimento 2, no experimento 3 as plantas do tratamento BN tiveram o maior aumento em conteúdo de nitrogênio nas folhas sendo 40% maior em relação às plantas C e 30% maior em relação às plantas do tratamento N (fig 30). Comparadas com as plantas controle, as plantas do tratamento B apresentaram um conteúdo de nitrogênio na folha 13% maior. Resultados similares foram reportados por Sabry et al., (1997) em plantas de trigo inoculadas com *A. caulinodans* cujo conteúdo de nitrogênio nas folhas e a biomassa aérea aumentaram quando comparadas com plantas não inoculadas. Os resultados de %N obtidos na folha poderiam explicar porque as plantas do tratamento B apresentaram uma capacidade fotossintética significativamente maior que as plantas C apesar de não ter sido fornecida fonte de nitrogênio combinado. Esses resultados foram observados nos experimentos 2 (fig 14) e 3 (fig 24). A capacidade fotossintética é fortemente influenciada pela quantidade de nitrogênio na folha (CHAPIN et al., 1987). Em folhas individuais, o nível da RuBisCO é controlado pela disponibilidade de nitrogênio durante o crescimento (EVANS, 1983). As plantas tratadas apenas com bactéria (B) apresentaram maior capacidade fotossintética em razão da maior quantidade de nitrogênio encontrado nas folhas. Sabendo-se que *Rhizobium* sp. ICB503 possui o gene *nifH,*

pode-se assumir que dentro da planta houve condições adequadas para que a nitrogenase ficasse ativa e que nitrogênio tenha sido fornecido à planta por fixação biológica. Resultados similares foram encontrados em plantas de arroz quando a linhagem RI-530 de *R. leguminosarum* aumentou significativamente a porcentagem de nitrogênio nas folhas, sendo esse aumento refletido significativamente na maior capacidade fotossintética comparada com plantas não inoculadas (CHI et al, 2005). A queda na %N nos tecidos, do primeiro para o segundo mês, exibida pelas plantas nos experimentos 2 e 3 pode ser explicada como um "efeito de diluição" deste nutriente pelo crescimento da planta (DAVIS, 2009). Este fato explicaria porque os valores de %N nas folhas e raízes foram maiores no experimento 2 (fig 19) do que no experimento 3 (fig 30). Conforme discutido anteriormente, as plantas do experimento 2 cresceram menos dos que as plantas no experimento 3, realizado em época mais quente. Assim, o efeito de diluição do nitrogênio nas plantas do experimento 2 deve ter sido menor, permitindo um maior acumulo de nitrogênio nos tecidos.

Nos dois ensaios, os resultados obtidos com a quantificação de aminoácidos presentes na seiva do xilema, permitiram observar que as bactérias não têm efeito nem na quantidade, nem na composição dos aminoácidos transportados. Os resultados da análise foram muito similares entre os dois experimentos. As plantas do tratamento BN apresentaram a maior quantidade de aminoácidos totais transportados no xilema, seguidas pelos tratamentos N e B. Foi encontrada diferença significativa entre plantas tratadas ou não com NO_3^- (N e BN $\neq$ B e C) apenas no experimento 3.

A análise qualitativa destes aminoácidos, nos dois experimentos, mostrou a prevalência de glutamina, asparagina e ácido aspártico. Arginina, ácido glutâmico foram encontrados numa menor proporção. Estes resultados condizem com os dados reportados na literatura, referentes à composição de aminoácidos no fluido xilemático de plantas de cana-de-açúcar. O aumento no suprimento de nitrogênio traz como resultado o incremento na quantidade de aminoácidos no suco de cana-de-açúcar, principalmente de asparagina e glutamina (CHAPMAN et al. 1996; PARISH, 1965; SUBASHINGHE, 2007). Tieshchenko (1959) encontrou uma quantidade de asparagina correspondente a 42% do totdal de aminoácidos de plantas tratadas em carência de nitrogênio. A aplicação de uréia à cultura aumentou esta porcentagem até 63%. Asn e Gln, aminoácidos diaminados, foram também reportados como os componentes principais da seiva do xilema (BIGGS, 2003; SODEK, 2008), corroborando com as informações de que são os

responsáveis pelo transporte de nitrogênio das raízes para a parte aérea da planta (MASCLAUX-DAUBRESS et al., 2010) e de estarem presentes nas folhas numa proporção maior do que outros aminoácidos como ácido aspártico e ácido glutâmico (PARISH, 1965). No presente trabalho, a prevalência dos aminoácidos Asn e Gln e a maior quantidade deles no tratamento BN trouxe como consequência uma maior quantidade de nitrogênio sendo transportado no xilema (fig 17 e fig 28).

A prevalência dos aminoácidos glutamina e asparagina e a menor quantidade de arginina encontrada no xilema das plantas, nos dois experimentos, permitiu confirmar que o tolete é uma fonte de nutrientes para a planta durante os primeiros meses de crescimento. Plantas de cana-de-açúcar propagadas por tolete, mostraram maior prevalência de arginina na seiva do xilema, durante os dois meses de análise (KLEINGESINDS, 2010). Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que a retirada do tolete é necessária para avaliar a origem do nitrogênio nas plantas, que, neste caso, foi através da contribuição da bactéria ou do nitrato.

A atividade da NR foliar foi medida apenas no experimento 3, devido às condições climáticas, já discutidas. A análise estatística mostrou que existe efeito das bactérias e do nitrato na atividade desta enzima. Durante os dois meses as plantas do tratamento BN apresentaram valores de atividade significativamente maiores em relação aos outros tratamentos. Os tratamentos B e N foram também significativamente maiores do que o controle, no entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre os dois. Foi verificada uma diminuição da atividade do primeiro para o segundo mês, que pode ser atribuída a diversos fatores, pois os valores de atividade da NR são muito variáveis (BIGGS, 2003). Têm sido reportados valores desde 0,125 até 7,2 μmol NO_2^- $h^{-1}g^{-1}$ pf (ARMAS et al., 1993; CHEREL et al., 1986). Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser considerados baixos, pois a maior atividade, atingida pelas plantas do tratamento BN, foi de apenas 0,80 μmol NO_2^- $h^{-1}g^{-1}$pf no primeiro mês. Observando-se uma diminuição para 0,27 μmol NO_2^- $h^{-1}g^{-1}$ pf no segundo mês. A variabilidade na atividade da NR é devida a fatores como temperatura, estágio de crescimento da planta ou variedade da cana-de-açúcar (BIGGS, 2003). Pode também ser influenciada positivamente por aumentos na aplicação de nitrogênio (principalmente NO_3^-), ou por inoculação bacteriana (ARMAS et al., 1993; EL-KOMY; HAMDIA; EL-BAKI, 2003).

Se a enzima é influenciada positivamente pela disponibilidade de nitrogênio, seriam esperados aumentos significativos na atividade da enzima de plantas tratadas com nitrato (N e

BN). Não se conseguiu uma razão coerente que explique o aumento significativo na atividade da enzima nas plantas do tratamento B. Diversos autores atribuem à inoculação bacteriana os aumentos na atividade da NR e no conteúdo de nitrogênio na folha. Comparando os efeitos da inoculação de plantas de arroz com *Azospirillum* sp. NR^+ e seu mutante NR^- encontrou-se que a bactéria com a NR ativa (NR^+) aumentava significativamente a NR radicular, entanto que a NR^- aumentava a NR foliar (BASHAN; LEVANONY, 1990; EL-KOMY et al., 2003). Os pesquisadores verificaram também que as plantas inoculadas com o mutante NR^- apresentaram menor produtividade e menor conteúdo de nitrogênio na folha do que as plantas inoculadas com a NR^+. Já que as duas bactérias eram fixadoras de nitrogênio, os autores atribuem esses aumentos a estímulos da bactéria aumentando a capacidade de assimilação de nitrogênio pela planta (BASHAN; LEVANONY, 1990). O maior valor de atividade alcançado pelo tratamento BN pode também estar relacionado à presença de *Rhizobium* sp. ICB503 nas folhas, já que, como foi mostrado, a bactéria possui a enzima NR assimilatória ativa (fig 31), e a atividade da NR bacteriana seria somada à foliar. No entanto, a bactéria não foi recuperada das folhas, por tal motivo, essa hipótese não pode ser confirmada.

Rhizobium sp. ICB503 foi isolado como endófito de cana-de-açúcar e nos experimentos 2 e 3 foi recuperada apenas das raízes. Nos dois experimentos, a medida do número de células viáveis 30 e 60 DAI, mostrou uma queda significativa na população bacteriana das plantas do tratamento BN ao longo do experimento (quadro 3). Já foram reportadas reduções nas populações endofíticas ao longo do tempo, como resultado da adubação nitrogenada (BODDEY et al., 2006; KLEINGESINDS, 2010). A queda na população bacteriana tem sido reportada por diversos autores. Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado, (2003) encontraram uma queda severa na população de *G. diazotrophicus* inoculada em cana-de-açúcar, ao longo de 170 DAI; esta queda variou conforme a variedade vegetal. Vários autores têm estudado o efeito da adubação nitrogenada na relação das bactérias diazotróficas com as plantas. Sabe-se que altas concentrações de N-mineral podem inibir a atividade da nitrogenase *in vitro*. Paralelamente foi observada *in vivo* a queda no número de bactérias, porém não se encontrou nenhuma explicação que justificasse a diminuição da população bacteriana (BODDEY et al., 2006; GLYAN'KO et al., 2009; SUMAN et al., 2008). Uma possível explicação seria que a própria planta diminuísse o tamanho da população bacteriana, pois, as células de *Rhizobium* sp. ICB503 tendo a nitrogenase inibida utilizariam o nitrato como fonte de nitrogênio, uma vez que essas bactérias apresentam atividade de NR

assimilatória. Esta condição implicaria numa competição entre planta e microrganismos pelo nutriente nitrogenado. Como o controle da população endofítica é feito pela planta, pode-se propor que a cana-de-açúcar tenha acionado seus mecanismos de defesa para diminuir o número de bactérias, atenuando assim a competição (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). Esse fato explicaria também, porque no experimento 3, foi encontrado um aumento significativo na população bacteriana das plantas submetidas ao tratamento B, 60 DAI. Na ausência de N-mineral no substrato, a nitrogenase seria ativada, e não haveria nitrato para competição. Neste caso, o aumento da população bacteriana seria muito positivo, pois significaria maior disponibilidade do N-fixado. Resultados similares foram reportados Oliveira et al., (2002) que detectaram aumento do número de *G. diazotrophicus* inoculada em cana-de-açúcar até 400 DAI.

No caso específico de *G.diazotrophicus,* outros autores sugerem que não existe uma relação negativa entre a presença da bactéria e altos níveis de nitrogênio, pois este microrganismo continua a fixar N_2 em meio de cultura contendo altas concentrações de NO_3^-(60 mM). Para esses pesquisadores, o nitrogênio pode alterar o estado fisiológico da planta, promovendo a ativação dos mecanismos de defesa, com a conseqüente diminuição da população bacteriana (MUTHUKUMARASAMY; REVATHI; LAKSHMINARASIMHAN, 1999).

Os resultados obtidos nos experimentos 2 e 3 mostraram que, na maioria dos parâmetros avaliados, não existem diferenças significativas nos tratamentos B, BN e N. Em todos os casos, as plantas no tratamento B apresentaram valores maiores do que as plantas controle, o que sugere a existência de algum tipo de contribuição da bactéria à planta.

Sugere-se que *Rhizobium* sp. ICB503 desempenhe um papel benéfico para a planta através da FBN, pois, as plantas inoculadas apresentaram desenvolvimento semelhante àquelas crescidas apenas com NO_3^-, e aumentaram significativamente a capacidade fotossintética máxima, %N na folha, parâmetros influenciados positivamente pela disponibilidade de nitrogênio. Estes resultados confirmariam a primeira das hipóteses propostas neste trabalho.

Os aumentos encontrados em parâmetros como área foliar, biomassa aérea, biomassa radicular e capacidade fotossintética, após a inoculação com *Rhizobium* sp. ICB503, podem ser resultado da produção e excreção SPCV por parte da bactéria. O estímulo do crescimento das plantas promovido pelas bactérias, ao longo dos experimentos, permite confirmar também a segunda hipótese proposta.

Contudo, o presente trabalho mostra que os melhores resultados obtidos no experimento 3, realizado nas condições apropriadas de temperatura e luminosidade, foram alcançados por plantas submetidas ao tratamento BN. Estes dados evidenciam que a bactéria por si só, não é capaz de suprir o nitrogênio necessário para um ótimo crescimento da cana-de-açúcar, sendo indispensável a utilização de adubos nitrogenados. Porém, fica claro que a aplicação de adubos nitrogenados juntamente com bactérias, acarretaria aumentos na produtividade com uma possível redução dos custos de produção e a consequente diminuição da poluição gerada pelo excesso desses adubos.

6 CONCLUSÕES

- A fonte de nitrogênio, em plantas não inoculadas, que promove o melhor desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar sob as condições avaliadas é o nitrato (NO_3^-).
- Com exceção do comprimento radicular, os parâmetros de crescimento avaliados foram influenciados positivamente tanto pela presença de *Rhizobium* sp.ICB503 como pela presença de nitrato.
- *Rhizobium* sp. ICB503 incrementou significativamente a assimilação líquida máxima de CO_2, sendo que as plantas apresentaram maiores valores quando tratadas juntamente com nitrato (BN).
- A porcentagem de nitrogênio nas folhas e raízes foi influenciada significativamente pela presença da bactéria e pela presença de nitrato. No entanto, os maiores valores foram alcançados pelas plantas inoculadas com bactérias (tratamentos B e BN).
- A quantidade de aminoácidos totais na seiva do xilema foi significativamente incrementada pela presença de nitrato. Aparentemente a presença de *Rhizobium* sp. ICB503 influencia a quantidade de Gln e Gln transportados no xilema.
- A atividade da enzima nitrato redutase foliar foi intensificada tanto pela presença da bactéria quanto pela adição de nitrato.
- *Rhizobium* sp. ICB503 conseguiu se estabelecer nas raízes das plantas até 60 dias após a inoculação, tendo ocorrido um decréscimo na população quando as plantas eram também tratadas com nitrato (BN).
- O tratamento BN apresentou os maiores resultados no experimento realizado na época mais apropriada para cultura de cana-de-açúcar. Sugerindo que a inoculação de bactérias juntamente com fertilização nitrogenada, beneficiaria a produtividade de plantas da variedade SP801816.

REFERÊNCIAS *

- ALBINO, J.; CRESTE, S.; FIGUEIRA, A. Mapeamento genético da cana-de-açúcar. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 36, p. 82-91. 2006.

- ALLEN, O. N. **Experiments in soil bacteriology**. Minneapolis: Burgess Publishing,1951. 127 p.

- ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, J. R.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in ictrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p.4906-4914. 2002.

- ARMAS DE, R., VALADIER, M.H., CHAMPIGNY, M.L., LAMAZE, T. Influence of ammonium and nitrate on the growth and photosynthesis of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**,v. 140, p. 531-535. 1992

- ARRUDA, P (a). Perspective of the Sugarcane Industry in Brazil. **Tropical Plant Biology**, v.4, p. 3–8. 2011.

- ARRUDA, P (b). Geneticalli modified sugarcane for bioenergy generation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 1-8. 2011.

- ASHRAF, M. Y.; HUSSAIN, F.; AKHTER, J.; GUL, A.; ROSS, M.; EBERT, G. Effect of different sources and rates of nitrogen and supra optimal level of potassium fertilization on growth, yield and nutrient uptake by sugarcane grown under saline conditions. **Pakistan Journal of Botany**, v. 40, n. 4, p. 1521-1531. 2008.

- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 20, p. 417-423. 2002.

- BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bactéria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 199-209. 2008.

- BELLONE, S. C.; BELLONE, C. H. Presence of endophytic diazotrophs in sugarcane juice. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 1065-1068. 2006.

- BIEDERBECK, V. O.; LUPWAYI, N. Z.; HANSON, K. G.; RICE, W. A. ZENTNER, R. P. Effect of long-term rotation with lentils on rhizosphere ecology and on endophytic rhizobia in wheat. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION, 17., 2000, Universite de Laval, Quebec: **Progarm and Abstracts**, Quebec: Agriculture and Agri-food Canadá, 2000. p. 80.

---

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS. **NBR 6023:** informação e documetação: referências elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BIGGS, I. M. **An investigation of sugarcane nitrogen physiology: sources, uptake and metabolism**. 2003. 139 p. [PhD Tesis] School of life Sciences, The University of Queensland, Brisbane, Austrália, 2003.

- BIRUR, D. K.; HERTEL, T. W.; TYNER, W. E. Impact of biofuel production on world agricultural markets: a computable general equilibrium analysis. **GTAP Working Paper**, v. 53, p. 1-63, 2008.

- BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. Biological nitrogen fixation in agroecosystems and in plant roots. In*:* UPHOFF, N. et al. (eds). **Biological approaches to sustainable soil systems**. Boca Ratón, Fla: CRC Press, 2006. cap 12, p. 77-189.

- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. M. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.

- BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. **Fertilizer Research**, v. 4, p. 1-10, 1995.

- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulation of nitrogen absortion and assimilation in plants. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 30, n. 2, p. 365-372, 2000.

- BURBANO, C. S.; LIU, Y.; RÖSNER, K. L.; REIS, V.; CABALLERO-MELLADO, J.; REINHOLD-HUREK, B.; HUREK., T. Predominant *nifH* transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 3, p. 383–389, 2011.

- CANUTO, E. L.; SALLES, J.; OLIVEIRA, A.; PERIN, L.; REIS, V.; BALDANI, J. I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 67-72, 2003.

- CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 345, p. 155-169, 2011.

- CHAINTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORGUIN, J.; BA, A.; GILLIS, M.; DE LAIUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5437–5447, 2000.

- CHAPIN III, F. S.; BLOOM, A . J.; FIELD, C. B.; WARING, R. H. Plant responses to multiple environmental factors. **BioScience**, v. 37, n. 1, p. 49-57, 1987.

- CHEREL, I.; MARION POLL, A.; MEYER, C.; ROUZE, P. Immunological comparisons of nitrate reductases of different plant species using monoclonal antibodies. **Plant Physiology**, v. 81, p. 376-378, 1986.

- CHOPART, J. L.; AZEVEDO, M.; LE ME´ZO, L.; MARION, D. Functional relationship between sugarcane root biomass and length for cropping system applications. **Sugar Technology**, v. 2, n. 3/4, p. 317–321, 2010.

- CHI, F.; SHEN, S. H.; CHENG H. P.; JING, Y. X.; YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7271–7278, 2009.

- CONTRERAS, A.; ROSA, E.; PÉREZ, M.; VAN LANGENHOVE, H.; DEWULF, J. Comparative life cycle assessment of four alternatives for using by-products of cane sugar production. **Journal of Cleaner Production**, v. 17, p. 772-779, 2009.

- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira.** cana-de-açúcar. safra 2012/2013. primeiro levantamento. abril /2012. Disponível em: <www.conab.gov.br>. Acesso em: Maio 2012.

- CRAWFORD, N.; GLASS, A. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 10, p. 389-385, 1998.

- DALTON, D.; KRAMER, S. Nitrogen-fixing bacteria in non-legumes. In: GNANAMANICKAM, S. S. (ed). **Plant-associated bacteria**. The Netherlands: Springer, 2006. cap 3. p. 105-130.

- DAVIS, D. R. Declining fruit and vegetable nutrient composition: What is the evidence? **Horticultrual Science**, v. 44, n. 1, p. 15-19, 2009.

- DEAN, J. **Natural nitrogen-fixing bacteria protect soybeans from aphids**. Penn State University, 2009. Disponível em: <www.physorg.com>. Acesso em: Outubro 2011

- DILLEWJIN, V. C. **Botany of sugarcane**. Waltham, Mass: Chronica botânica, 1952, 371p.

- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRIK I. et al (eds). ***Azospirillum* VI and related microorganisms**. genetics- physiology- ecology. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, 1995. p 3-14.

- EL-KOMY,H. M.; HAMDIA, M. A.; EL-BAKI, G. K. A. Nitrate reductase in wheat plants grown under water stress and inoculated with *Azospirillum* spp. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 2, p. 281-287, 2003.

- EMBRAPA. **Embrapa e UFPR desenvolvem primeiro inoculante para milho e trigo**. Imprensa Noticias, agosto de 2009. Disponível em: <www.embrapa.com.br>. Acesso em: Outubro 2011.

- EMBRAPA AGROBIOLOGIA. **Empresas vão começar a produzir inoculante para cana-de-açúcar**. Imprensa, Noticias, outubro 2008. Disponível em: <www.cnpab.embrapa.com.br>. Acesso em: Outubro 2011.

- EVANS, J. R. Nitrogen and photosynthesis in the flag leaf of wheat (*Triticum aesti- vum* L.) **Plant Physiology**, v. 72, p. 297-302, 1983.

- FAS. 2011. Foreing Agricultural Service. United States Department of Agriculture (USDA). Disponível em: <www.fas.usda.gov> Acesso em: Agosto 2011.

- FARONI, C. **Sistema radicular de cana-de-açúcar e identificação de raízes metabolicamente ativas**. 2004, 125 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP, 2004.

- FERRARA, F. I. S. **Influência do tipo de adubação na produção de aminoácidos e de ácido indol-3-acético, etileno e poliaminas por bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.)**. 2010, 166 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

- FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAÚJO.; 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 characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil**. DOI 10.1007/s11104-011-0812-0. In press. 2011.

- FORD, R.; TOBY, E. Why are most rhizobia beneficial to their plant host, rather than parasitic? **Microbes and Infection**, v. 6, p. 1235-1239, 2004.

- GAGE, D. Infection and invasion of roots by symbiotic, Nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes**. Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 280-300, 2004.

- GARBIN, M. L.; DILLENBURG, L. R. Effects of different nitrogen sources on growth, chlorophyll concentration, nitrate reductase activity and carbon and nitrogen distribution in *Araucaria angustifolia*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 4, p. 295-303, 2008.

- GILLER, K. E. **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**. 2 ed. London: CABI, 2001. 352 p.

- GLASS, A. Nitrate uptake by plant roots a Minireview. **Botany**, v. 87, p. 659–667, 2009.

- GLYAN'KO, A. K.; VASIL'EVA, G. G.; MITANOVA, N. B.; ISHCHENKO A. A. The influence of mineral nitrogen on legume-*Rhizobium* symbiosis. **Biology Bulletin**, v. 36, n. 3, p. 250–258, 2009.

- GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **Fems Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 1-7, 2005.

- GOOD, A. G.; SHRAWAT, A. K.; MUENCH, D. G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 12, p. 597- 605, 2004.

- GUTIERREZ-ZAMORA, M. L.; MARTINEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 117-126, 2001

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

- HIBBERD, J. M.; COVSHOFF, S. The regulation of gene expression required for C4 photosynthesis. **Annual Reviews in Plant Biology**, v. 61, p. 181–207, 2010.

- HIBBERD, J. M.; SHEEHY, J. E.; LANGDALE, J. A. Using C_4 photosynthesis to increase the yield of rice-rationale and feasibility. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, p. 228–231, 2008.

- HOAGLAND, D. R., ARNON, I. The water culture for growing plants without soil. **California Agricultural Export. Station Circular**, n. 347, 1-3, 1950.

- HÖFLICH, G. Colonization and growth promotion of non-legumes by *Rhizobium* bactéria. Plant-microbe interactions - microbial biosystems- new frontiers In: BELL, C. R, et al (eds). Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology **(Proceedings)** Halifax, Canada: Kentville N.S: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, 2000. 939 p.

- HOSSAIN, M. D. S.; MARTENSSON, A. Potential use of *Rhizobium* spp. to improve fitness of non-nitrogen-fixing plants. **Soil and Plant Science**, v. 58, p. 352-358, 2008.

- HUANG, J. Ultrasstructure of bacterial penetration in plants**. Annal Reviews in Phytopathology**, v. 24, p.141-157, 1986.

- IMET. Fonte dados da rede do IMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <www.imet.gov.br> Acceso em: Junho 2012.

- JAGGER, A. Brazilian ethanol: an attractive proposition. **Biofuels, Bioproduction e Biorefinery**, v. 4, p. 480–483, 2010.

- JAIN, V.; GUPTA, K. The flavonoid naringenin enhances intercellular colonization of rice roots by *Azorhizobium caulinodans*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, p. 119-123, 2003.

- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; DE OLIVEIRA, A. L. M.; DOS REIS Jr., F. B.; DA SILVA, L. G.; REIS, V. M. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 357, p. 747-760, 2001.

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

- KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): Characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 522–531, 2005.

- KEYEO, F.; NOOR-AISHAH, O.; AMIR, H. G. The effects of nitrogen fixation activity and phytohormone production of diazotroph in promoting growth of rice seedlings. **Biotechnology**, p. 2-7, 2011.

- KLEINSGESINDS, C. **Efeito da bactéria endofítica fixadora de nitrogênio *Acinetobacter* ICB117 no desenvolvimento de cana-de-açúcar**. 2010, 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

- KOOMNOK, C.; TEAUMROONG, N.; RERKASEM, B.; LUMYONG, S. Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. **ScienceAsia** v. 33, p. 429-435, 2007.

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

- LEE, T. S. G.; BRESSAN, E. A. The potential of ethanol production from sugar cane in Brazil. **Sugar Technology**, v. 8, p. 195-198, 2006.

- LIMA, F. S.; STAMFORD, N. P.; SOUSA, C. S.; LIRA JUNIOR, M. A.; MALHEIROS, S. M. M.; VAN STRAATEN, P. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1769–1775, 2010.

- LUPWAYI, N. Z.; CLAYTON, G. W.; HANSON, G. K. RICE, W. A.; BIEDERBECK V. O. Endophytic rhizobia in barley, wheat and canola roots. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 84, n.1, p. 37-45, 2004

- MAGALHÃES, D.; BRUNS, R. E.; VASCONCELLOS, P. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como traçadores da queima de cana-de-açúcar: uma abordagem estatística. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 577-581. 2007.

- MAGALHÃES., P. S. G.; CERRI., D. G. P. Yield monitoring of sugar cane. **Biosystems Engineering**, v. 96, n. 1, p. 1-6, 2007.

- MARCHIORI, L. F. S. **Influência da época de plantio e corte na produtividade da cana-de-açúcar**. 2004, 273 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2004.

- MARQUES, F. Vias para avançar como líder do etanol. **Ciência e Tecnologia no Brasil**. Divisão Cientifica FAPESP, v. 149, p. 20-25, 2008.

- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. Review: Part of a special issue on plant nutrition. **Annals of Botany**, v. 105, p. 1141–1157, 2010.

- MASSON-BOIVIN, C.; GIRAUD, E.; PERRET, X.; BATUT, J. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 458-466, 2009.

- MEHBOOB, I.; NAVEED, M.; ZAHIR, Z. M. Rhizobial association with non-legumes: mechanisms and applications. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 28, p. 432–456, 2009.

- MEHNAZ, S.; BAIG, D.; LAZAROVITS, G. Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. **Journal of Microbiology and. Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 1614–1623, 2010.

- MELLO, S. Q. S.; FRANÇA, A. F. S.; LIMA, M. L. M.; RIBERO, D.; MIYAGI, E.; REIS J. G. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 373-380, 2006.

- MEYER, C.; STITT, M. Nitrate reductase and signalling**.** In: LEA P. J, et al (eds). **Plant nitrogen**. New York: Springer, 2001. p 37–59.

- MOMOSE, A.; OHTAKE, N.; SUEYOSHI, K.; SATO, T.; NAKANISHI, Y.; AKAO, S.; OHYAMA, T. Nitrogen fixation and translocation in young sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants associated with endophytic nitrogen-fixing bacteria. **Microbes and Environments**, v. 24, n. 3, p. 224-230, 2009.

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

- MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29 p. 157–164, 1999.

- NEWTON, W.; FISHER, K. Nitrogen Fixation – A general overview in nitrogen fixation at the millennium. In: LEIGH, J. G. (ed). **Nitrogen fixation at the millennium**. Brighton: Elseiver Publications, 2002. p.1-34

- OLIVEIRA, F. **Avaliação das características agrotecnológicas de duas variedades de cana-de-açúcar influenciadas por diferentes épocas de supressão de irrigação e níveis de adubação**. 2011, 110 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido). Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba- MG, 2011.

- 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**, v. 242, n. 2, p. 205-215, 2002.

  OLIVEIRA DE, Z. M.; FLOH, E. I. S.; FERRARA, F. I. S.; BARBOSA, H. R. Diazotrophyc rhizobacteria isolated from sugarcane can release amino acids in a synthetic culture medium. **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, n. 8, p. 957-962, 2011.

- PARIONA-LLANOS, R. **Isolamento de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio de cana-de-açúcar submetida à adubação orgânica ou fertilizada com N-mineral ou sem adubação.** 2007, 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

- PARIONA-LLANOS, R.; FERRARA, F. I. S.; SOTO-GONZALES, H.; BARBOSA, H. R. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, n. 6, p. 387-393, 2010.

- PATTEN, C.; GLICK, B. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3795–3801, 2002.

- PENG, S.; BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; GYANESHWAR, P.; CHEN, Y. Influence of rhizobial inoculation on photosynthesis and grain yield of rice. **Agronomy Journal**, v. 94, p. 925–929, 2002.

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

- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside the plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 435–443, 2011.

- REIS, V.; LEE, S.; KENNEDY, C. Biological nitrogen fixation in sugarcane. In: NEWTON, W. E. (ed). **Nitrogen fixation: origins, applications and research progress**. The Netherlands: Springer, 2007.p. 213-232

- RHIJN, P.; VANDERLEYDEN, J. The *Rhizobium*-plant symbiosis. **Microbiological Reviews**, p. 124–142, 1995.

- RIGGS, P. J.; CHELIUS, M. K.; INIGUEZ, A. L.; KAEPPLER, S. M.; TRIPLETT, E. W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 829–836, 2001.

- ROBINSON, N., BRACKIN, R., VINALL, K., SOPER, F., HOLST, J. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLoS one**, v. 6, n.4, 2011.

- RODRIGUES, M. C.; MEGALERI, S.; TAKASHI, P. Potential and costs for the production of electrolytic hydrogen in alcohol and sugar cane plants in the central and south regions of **Brazilian International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 6858-6864, 2008.

- RODRIGUES, J. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, 1995. 101 p.

- ROOSTA, H.; SAJJADINIA, A.; RAHIMI, A.; SCHJOERRING, J. K. Responses of cucumber plant to NH_4^+ and NO_3^- nutrition: The relative addition rate technique vs. cultivation at constant nitrogen concentration. **Scientia Horticulturae**, v. 121, p. 397–403, 2009.

- SABRY, R. S.; SALEH, S. A.; BATCHELOR, C. A.; JONES, J.; JOTHAM, J.; WEBSTER, G.; KOTHARI, S. L.; DAVEY, M. R.; COCKING, E. C. Endophytic establishment of *Azorhizobium caulinodans* in wheat. **Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences**, v. 264, p. 341–346, 1997.

- SAGE, R. F. The evolution of C_4 photosynthesis. **New Physiologist**, v. 278, p. 341-370, 2004.

- SEGATO, S. V.; PINTO, A.; JENDIROBA, E.; NOBREGA, J. C. M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006. 415 p.

- SEEMAN, S. J. R.; BERRY, J. A.; FREAS, S. M.; KRUMP, M. A. Regulation of ribulose bisphosphate carboxylase activity *in vivo* by a light modulated inhibitor of catalysis. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A**., v. 82, p. 8024-8028, 1985.

- SEVILLA, M.; KENNEDY, C. Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. In: TRIPLETT, E. W. (ed). **Prokaryotic nitrogen fixation:** a model system for analysis of a biological process. Norwich: Horizon Scientific,2000. p.737–760.

- SINGH, R. K.; MISHRA, R. P. N.; JAISWAL, H. K. Role of rhizobial endophytes as nitrogen fixer in promoting plant growth and productivity of indian cultivated upland rice (*Oryza sativa L.*) plants. In: WANG ,Y.P. **Biological nitrogen fixation, sustainable agriculture and the environment**. The Netherlands: Springer, 2005. p. 289–291.

- SODEK, L. Metabolismo do nitrogênio. In: KERBAUI, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 65-81.

- SOTO, H. H. **Caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio endofíticas isoladas de *Saccharum* sp. (Cana-de-açúcar) cultivadas sob adubação orgânica ou fertilizante nitrogenado sem adubação**. 2009. 150 f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

- SOTO-URZÚA, L.; BACA, B. E. Mecanismos de protección de la nitrogenasa a la inactivación por oxígeno. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, n. 43, p. 37-49, 2001.

- SPRENT, J.I.; DE FARIA, S.M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms**. Plant Soil**, v. 110, p. 157-165, 1988.

- STEWART, G. R.; POPP, M.; HOLZAPFEL, I.; STEWART, J. A.; DICKIE-SKEW, A. Localization of nitrate reduction in ferns and its relationship to environment and physiological characteristics. **New Physiologist**, v. 104, p. 373-384, 1986.

- STOLLER. **Inoculante Masterfix Gramíneas comprova eficiência e sustentabilidade**. Imprensa, Notícias, setembro 2011. Disponível em: <www.stoller.com.br>. Acesso em: Outubro 2011.

- SUBASHINGHE, R. Effect of external nitrogen and potassium supply on xylem sap composition of sugarcane. **Journal of Plant Nutrition**, v. 30, p. 187-201, 2007.

- SUGITHA, T. C. K.; KUMAR, K. Identification of nif genes of heterotrophic and endophytic diazotrophs associated with rice (*Oryza sativa* L.,) by targeted DNA finger printing. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22. p. 6249-6252, 2011.

- SUMAN, A.; SHRIVASTAVA., E. A. K.; ASHA GAUR, E.; PUSHPA SINGH, E.; 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**, v. 54, p. 1–11, 2008.

- TSAY, Y. F.; CHIU, C. C.; TSAI, C. B.; CH, H. O.; HSU, P. K. Nitrate transporters and peptide transporters. **Febs Letters**, v. 581, p. 2290–2300, 2007.

- THAWEENUT, N.; HACHISUKA, Y.; ANDO, S.; YANAGISAWA, S.; YONEYAMA, T. Two seasons' study on *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. **Plant and Soil**, v. 338, p. 435–449, 2011.

- THULER., D. S.; FLOH, E. I. S.; HANDROAND,W.; BARBOSA, H. R. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 174–178, 2003.

- TURNBULL, M.; SCHMIDT, S.; ERSKINE, P.; RICHARDS, S.; STEWART, G. Root adaptation and nitrogen source acquisition in natural ecosystems. **Tree Physiology**, v. 16, p. 941-948, 1996.

- UNICA. União da Indústria de Cana de Açúcar. **Estimativa da safra 2012/2013**. Disponível em: <www.unica.com.br> Acesso em: Maio 2012.

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

- VERT, G.; CHORY, J. A toggle switch in plant nitrate uptake. **Cell**, v. 138, p. 1064-1066, 2009.

- YANNI, Y. G.; RIZK, G. S.; EL-FATTAH, F. K. A.; SQUARTINI, A.; CORICH, V. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 845-870, 2001.

- ZHOU, Y. H.; ZHANG, Y. L.; WANG, X. M, CUI, J. X; XIA, X. I.; KAI SHI, K.;YU, J. Q. Effects of nitrogen form on growth, CO_2 assimilation, chlorophyll fluorescence, and photosynthetic electron allocation in cucumber and rice plants. **Journal of Zhejiang University-Science B**, v. 12, n. 2, p. 126-134, 2011.