CAROLINA KREBS KLEINGESINDS

“Efeito da inoculação de uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio (*Acinetobacter* sp. ICB117) no desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. variedade SP791011)”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2010

CAROLINA KREBS KLEINGESINDS

“Efeito da inoculação de uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio (*Acinetobacter* sp. ICB117) no desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. variedade SP791011)”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora:
Dra. Heloiza Ramos Barbosa

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Kleingesinds, Carolina Krebs.

Efeito da inoculação de uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio (*Acinetobacter* sp. ICB117) no desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. variedade SP791011) / Carolina Krebs Kleingesinds. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Heloiza Ramos Barbosa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Interação de bactérias diazotróficas com cana-de-açúcar.

Versão do título para o inglês: Effect of a nitrogen-fixing endophytic bacterium (*Acinetobacter* sp.) in sugarcane (*Saccharum* sp.) growth.

Descritores: 1. Bactéria endofítica 2. Bactéria diazotrófica 3. Cana-de-açúcar 4. Inoculação 5. Nitrato I. Barbosa, Heloiza Ramos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0198/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Carolina Krebs Kleingesinds.

Título da Dissertação: Efeito da inoculação de uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio (*Acinetobacter* sp. ICB117) no desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. Variedade SP791011).

Orientador(a): 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) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 402/10 referente ao projeto intitulado: *“Efeito da inoculação de uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio (Acinetobacter sp. ICB117) no desenvolvimento da cana-de-açúcar (Saccharum sp. variedade SP791011)”* sob a responsabilidade de **Carolina Krebs Kleingesinds**, 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, 21 de junho de 2010.

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

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

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que me auxiliaram na realização deste trabalho:

- À Dra. Heloiza Ramos Barbosa pela oportunidade de desenvolvimento deste projeto, orientação e confiança;
- Ao Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar pela orientação, incentivo, animação, críticas e pelos ensinamentos sobre plantas;
- Ao Dr. Marcos Silveira Buckeridge por permitir a utilização de espaço e equipamentos na casa de vegetação (LAFIECO/IB-USP) nas etapas iniciais deste trabalho;
- Aos pesquisadores Dra. Helenice Mercier, Dr. José Gregório Cabrera Gomez e Dr. Marcos Silveira Buckeridge pelas sugestões dadas na banca de qualificação;
- A Dra. Marilis do Valle Marques pela gentileza de permitir que utilizasse equipamentos do Laboratório de Fisiologia de Microorganismos do Depto de Microbiologia, ICB, USP.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de São Paulo;
- Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida;
- Ao Projeto BIOEN/FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa;
- Ao Centro de Tecnologia Canavieira pelo fornecimento das plantas e à Sabrina Moutinho Chabregas;
- Aos secretários Eliane, Fábiana e Marcos, pela atenção e auxílio com a documentação necessária durante o curso;
- Aos técnicos Íris, Zé, Leonor, Danilo, Helena e Mari por sempre terem sido tão atenciosos e dispostos a ajudar;
- À Rosana Duarte Prisco pelo auxílio com a realização da estatística e por ter sido sempre tão atenciosa;
- Aos bibliotecários do ICB/ USP - Mônica, André e Eva, pela atenção e auxílio com questões sobre normas para elaboração da presente dissertação;

- Aos funcionários do ICB/ USP – Zelma, Aninha, Naíde e ao pessoal responsável pelo transporte.

- A todos os alunos da Dra. Heloiza, especialmente a Tânia Regina dos Santos, Felipe Ibañez de Santi Ferrara e Zilda Machado de Oliveira, por sempre terem me ajudado quando precisei e pelos ensinamentos em várias áreas para a minha vida;

- À Ingrid Natalie Leão pela ajuda com preparo e transporte de materiais para desenvolvimento da experimentação;

- Aos pós-graduandos do departamento de microbiologia: Carolina Antunes P. T. da Silva e Thatiane Teixeira Mendonça, agradeço a ajuda com a biologia molecular e ao Marco Antônio e Daniela Carolina Licio, agradeço pelas horas de auxílio com as plantas na véspera do natal.

- À Priscilla Rossetto pela gentileza e atenção na etapa de desenvolvimento da metodologia de inoculação.

- À Amanda Pereira de Souza por toda ajuda com o cultivo da cana-de-açúcar, com as primeiras coletas, com as fotos e por, sempre que precisei, ter me ajudado ao longo de todo o meu mestrado.

- À Adriana Grandis, Adriana Yepes, Bruna Arenque, Maraba, Ivan Salles Santos e a todos do LAFIECO/IB-USP pela gentileza, atenção e sugestões.

- Ao Instituto de Botânica de São Paulo e aos alunos e funcionários da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas da referida instituição, por terem me recebido tão bem. Ao Dr. Marco Tiné e aos alunos do Dr. Marcos Pereira Marinho Aidar: Janaína Gomes da Silva, Giampiero Bini Cano, Nidia Mara Marchiori, Mariana Passananti Baptistella, Alexandre Domeneghetti Nicotelli, Sabrina Latansio Costa Ribeiro, Fernanda Lopes de Macedo e Giseli Areias Nóbrega; sou grata pela ajuda e dedicação com as coletas, análises e auxílio com protocolos metodológicos.

- À Renata Assis Castro e Diogo Manzano Galdeano pelas valiosas discussões que tivemos sobre diferentes temas relacionados aos nossos projetos de pesquisa;

- À Maria Theresa de Oliveira e à Luciana Guidon Coelho pelas sugestões e pelas oportunidades que me proporcionaram.

- Aos meus pais por sempre terem priorizado à educação de seus filhos e ao meu irmão pelo apoio e compreensão.

Mais importante para a ciência do que a
descoberta de novos fatos é a busca de novas
formas de pensar sobre eles.

(SIR WILLIAM BRAGG)

RESUMO

KLEINGESINDS, C. K. **Efeito da inoculação de uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio (*Acinetobacter* sp. ICB117) no desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. variedade SP791011).** 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Acinetobacter sp. ICB117 é uma bactéria emdofítica fixadora de nitrogênio, isolada de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. variedade SP791011). Em ensaios *in vitro* esse microrganismo liberou aminoácidos, poliaminas e ácido indolilacético (AIA). O presente estudo teve por objetivo analisar os efeitos da inoculação de *Acinetobacter* sp. ICB117 no desenvolvimento da cana-de-açúcar variedade SP791011. As plantas foram cultivadas a partir de toletes com uma gema e fornecidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). Aos 30 dias de idade, foram submetidas aos seguintes tratamentos: **controle (C)** – sem inoculação e solução de Hoagland sem nitrogênio; **nitrato (N)** – sem inoculação e solução de Hoagland com nitrato (15 mM); **bactéria (B)** – inoculação bacteriana e solução de Hoagland sem nitrogênio; **bactéria + nitrato (BN)** – inoculação bacteriana e solução de Hoagland com nitrato (15 mM). Antes da realização do procedimento de inoculação, foi inserido em ICB117 um plasmídeo que contém um gene de expressão para proteína de fluorescência verde (GFP). O material vegetal foi coletado mensalmente (2 coletas), sendo os seguintes parâmetros analisados: altura, número de folhas, massa seca, composição de aminoácidos na seiva xilemática, razão carbono nitrogênio (C/N) das raízes e folhas, atividade da nitrato redutase foliar, assimilação máxima líquida de CO₂ e estimativa da população endofítica de ICB117. Os resultados mostraram um padrão similar nos dois meses de experimentação: a inoculação de *Acinetobacter* sp. ICB117 elevou a massa seca total das plantas (evidenciada pelas raízes), número de folhas e assimilação máxima líquida de CO₂, mas não influenciou significativamente a altura, massa seca da parte aérea das plantas e a atividade da enzima nitrato redutase foliar. A população endofítica de ICB117 foi maior nas plantas tratadas sem nitrato em relação às plantas tratadas com nitrato. Houve predomínio de arginina na seiva xilemática em todos os tratamentos. Nas raízes, a razão C/N foi menor nas plantas tratadas com nitrato (N e BN); nas folhas, a razão C/N foi menor somente nas plantas tratadas com nitrato e não inoculadas (N). A utilização de inoculantes bacterianos promotores de crescimento em conjunto com o nitrato é uma possível forma de elevação da produtividade da cultura canavieira.

Palavras-chave: Bactéria endofítica. Bactéria diazotrófica. Cana-de-açúcar. Inoculação. Nitrato.

ABSTRACT

KLEINGESINDS, C. K. **Effect of a nitrogen-fixing endophytic bacterium (*Acinetobacter* sp.) in sugarcane (*Saccharum* sp.) growth.** 2010. 77 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Acinetobacter sp. ICB117 is a nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian sugarcane (*Saccharum* sp. variety SP791011) which releases amino acids, polyamines and indole-3-acetic acid (IAA) when grown *in vitro*. The present study aimed to evaluate the effects of *Acinetobacter* sp. ICB117 (a diazotrophic endophytic bacterium) inoculation on the growth of *Saccharum* sp. variety SP791011 (sugarcane). Sugarcane plants were obtained from stools with one bud, provided by CTC (Centro de Tecnologia Canavieira). Plants with 30 days old were submitted to the following treatments: **control (C)** - no bacterium inoculation and Hoagland solution without nitrogen; **nitrate (N)** - no bacterium inoculation and Hoagland solution with nitrate (15 mM); **bacteria (B)** - bacterium inoculation and Hoagland solution without nitrogen; **Bacteria + nitrate (BN)** - bacterial inoculation and Hoagland solution with nitrate (15 mM). Previously to the inoculation procedure, *Acinetobacter* sp. ICB117 was transformed with plasmid containing a gene that expresses the Green Fluorescent Protein (GFP). Plant material were sampled monthly (2 sampling times) in order to evaluate the following parameters: height, number of leaves, dry mass, amino acids composition on xylem sap, leaf and root nitrogen and carbon content, leaf nitrate reductase activity, photosynthetic CO₂ assimilation and ICB117 endophytic population estimative. The results showed a very similar pattern along experimental period: inoculation with bacterium increased plant total dry mass (evidenced by roots), number of leaves and the assimilation of CO₂, but it did not influence significantly the shoot size of the plants and the leaf nitrate reductase activity. The endophytic ICB117 population was larger in plants treated without nitrate than in plants with nitrate inputs. Among the different treatments, alterations were not verified in the amino acids composition on xylem sap prevailing arginine in the sap of all the plants. In the roots, the carbon nitrogen (C/N) ratio was smaller in the plants treated with nitrate (N and BN); in the leaves, the C/N ratio was smaller only in the plants treated with nitrate without inoculation (N).

Keywords: Endophytic bacterium. Diazotrophic bacterium. Sugarcane. Inoculation. Nitrate.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de folhas, média e desvio padrão do número de folhas presentes nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos no 1º mês -----	40
Tabela 2 - Número de folhas, média e desvio padrão do número de folhas presentes nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos no 2º mês -----	41
Tabela 3 - Razão raiz: parte aérea das plantas submetidas aos diferentes tratamentos ao longo dos meses de estudo -----	44
Tabela 4 - Assimilação máxima líquida média de CO ₂ ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (A liq máx) e desvio padrão da A liq máx no 1º e 2º mês de estudo -----	46
Tabela 5 - Concentrações médias dos aminoácidos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e desvio padrão das concentrações dos aminoácidos presentes na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no 1º mês de estudo -----	51
Tabela 6 - Concentrações médias dos aminoácidos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e desvio padrão das concentrações dos aminoácidos presentes na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no 2º mês de estudo -----	51
Tabela 7 - Concentração em porcentagem média e desvio padrão das porcentagens de aminoácidos encontrados na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no 1º mês de estudo -----	52
Tabela 8 - Concentração em porcentagem média e desvio padrão das porcentagens de aminoácidos encontrados na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no 2º mês de estudo -----	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação de Bactérias Endofíticas -----	18
Figura 2. Desenvolvimento de cana-de-açúcar a partir de tolete -----	22
Figura 3. Esquematização da via metabólica C ₄ -----	24
Figura 4. Esquematização procedimento de inoculação bacteriana e plantio -----	31
Figura 5. Altura (cm) inicial das plantas distribuídas para receberem diferentes tratamentos -----	39
Figura 6. Altura (cm) das plantas submetidas aos diferentes tratamentos ao longo dos meses de estudo -----	39
Figura 7. Massa seca (g) radicular das plantas submetidas aos diferentes tratamentos ao longo dos meses de estudo -----	42
Figura 8. Raízes das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no 2º mês de experimentação -----	42
Figura 9. Massa seca (g) da parte aérea das plantas submetidas aos diferentes tratamentos ao longo dos meses de estudo -----	43
Figura 10. Massa seca (g) total das plantas submetidas aos diferentes tratamentos ao longo dos meses de estudo -----	44
Figura 11. Atividade da nitrato redutase foliar das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. 1º e 2º mês analisados em conjunto -----	45
Figura 12. UFC g ⁻¹ (de tecido fresco) com expressão de fluorescência verde, isoladas do interior do tecido radicular após 1 e 2 meses da inoculação -----	46
Figura 13. Valor absoluto de ¹⁵ N nas raízes das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Dados referentes ao mês 2 -----	47

Figura 14. Porcentagem de nitrogênio nas raízes das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Dados referentes ao mês 2 -----	48
Figura 15. Razão Carbono/ Nitrogênio nas raízes das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Dados referentes ao mês 2 -----	48
Figura 16. Valor absoluto de ^{15}N nas folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Dados referentes ao mês 2 -----	49
Figura 17. Porcentagem de nitrogênio nas folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Dados referentes ao mês 2 -----	49
Figura 18. Razão Carbono/ Nitrogênio nas folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Dados referentes ao mês 2 -----	50
Figura 19. Porcentagem de aminoácidos encontrados na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no 1º mês de estudo -----	53
Figura 20. Porcentagem de aminoácidos encontrados na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no 2º mês de estudo -----	53

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	15
1.1 Interação entre microorganismos e plantas	15
1.1.1 <i>Microorganismos no solo</i>	15
1.1.2 <i>Bactérias habitantes da rizosfera e bactérias endofíticas</i>	15
1.1.3 <i>Bactérias Fixadoras de Nitrogênio utilizadas em estudos de inoculações em plantas</i>	18
1.2 Desenvolvimento de inoculantes bacterianos comerciais	20
1.3 Importância da cana-de-açúcar para o Brasil	21
1.4 Cana-de-açúcar	21
1.5 Metabolismo de nitrogênio em plantas	25
1.5.1 <i>Metabolismo de nitrogênio em cana-de-açúcar</i>	26
1.6 Hipóteses iniciais	27
<u>2 OBJETIVOS</u>	28
<u>3 MATERIAL E MÉTODOS</u>	29
3.1 Material	29
3.1.1 <i>Material biológico</i>	29
3.1.2 <i>Soluções com nutrientes</i>	29
3.2 Métodos	29
3.2.1 <i>Cultivo das plantas e procedimento de inoculação</i>	29
3.2.2 <i>Cultivo de Acinetobacter sp. ICB117 para inoculação em cana-de-açúcar</i>	31
3.2.3 <i>Coleta do Material Vegetal</i>	32
3.2.4 <i>Isolamento de Acinetobacter sp. ICB117 inoculado previamente nas plantas de cana-de-açúcar</i>	35
3.2.5 <i>Análises estatísticas</i>	36
<u>4 RESULTADOS</u>	37
4.1 Padronização da metodologia de inoculação	37
4.2 Parâmetros de crescimento	38
4.2.1 <i>Altura</i>	38

4.2.2 Número de folhas -----	40
4.2.3 Perfilhos -----	41
4.2.4 Biomassa -----	41
4.3 Atividade Nitrato Redutase Foliar -----	45
4.4 Assimilação líquida máxima de CO₂ e respiração (no escuro) -----	45
4.5 Densidade populacional endofítica de <i>Acinetobacter</i> sp. ICB117 -----	46
4.6 Proporções Carbono e Nitrogênio -----	47
4.7 Aminoácidos presentes na seiva -----	50
<u>5 DISCUSSÃO</u> -----	54
<u>6 CONCLUSÕES</u> -----	64
<u>REFERÊNCIAS</u> -----	66
ANEXO A – Composições das soluções com nutrientes -----	75
<i>ANEXO A.1 - Composição Meio de cultura microorganismo -----</i>	<i>75</i>
<i>ANEXO A.2 - Composição solução nutritiva plantas -----</i>	<i>76</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Interação entre microorganismos e plantas

1.1.1 Microorganismos no solo

Há uma diversidade microbiana muito grande no planeta Terra devido à possibilidade desse grupo ocupar os mais diferentes habitats. Assim, há grande variação nas estimativas sobre número de espécies existentes. Estudos de diversidade microbiana estimaram em 1g de solo de 6.000 a 50.000 espécies bacterianas (VAN DER HEIJDEN et al., 2008).

Na região do solo em que há influência das raízes (rizosfera), o número de microorganismos encontrados é de 10 a 100 vezes maior em relação às outras regiões do solo (DOBBELAERE et al., 2003). Em particular, as plantas constituem um verdadeiro ecossistema microbiano (MAGNANI, 2005): os microorganismos são atraídos pelos exudatos das raízes, secreções e deposição de material vegetal, podendo interagir com a planta, colonizando-a. No entanto, nem todos os microorganismos conseguem se estabelecer no interior ou mesmo exterior das plantas em função da variedade de compostos antimicrobianos presentes (HARDOIM et al., 2008). Os microorganismos podem estabelecer diferentes graus de relações com as plantas: podem ser neutros, benéficos ou patogênicos (DOBBELAERE et al., 2003).

1.1.2 Bactérias habitantes da rizosfera e bactérias endofíticas

Bactérias podem viver livremente no solo, colonizar superfícies de raízes e folhas e/ ou colonizar o interior dos tecidos vegetais. Existem diferentes terminologias didáticas na literatura para classificar os microorganismos que vivem no interior e ao redor das plantas (AZEVEDO et al., 2000; STURZ et al., 2000). O termo rizobactéria é aplicado às bactérias que vivem na raiz ou região do solo onde a raiz exerce influência (DOBBELAERE et al., 2003), no entanto Sturz et al. (2000) questionam se esse termo pode ser considerado apenas para bactérias colonizadoras da superfície da raiz ou se não seria também adequado para as bactérias colonizadoras do interior

das raízes. O presente trabalho considera bactérias habitantes da rizosfera, aquelas que habitam a superfície externa da raiz e região do solo sob influência desse órgão.

Existem autores que consideram bactérias endofíticas todas aquelas que habitam o interior de tecidos vegetais, inclusive as bactérias patogênicas (LODEWYCKX et al., 2002). Assim como muitos outros autores, o presente estudo sustenta o conceito de que bactérias endofíticas, em pelo menos parte do seu ciclo de vida, habitam o interior de tecidos vegetais sem causar danos visíveis às plantas (AZEVEDO et al., 2000; HALLMANN et al., 1997; HARDOIM et al., 2008; RYAN et al., 2008). Há muitos estudos com fungos endofíticos (LODEWYCKX et al., 2002). Bactérias fixadoras de nitrogênio que habitam o interior de nódulos de leguminosas e micorrizas também poderiam ser consideradas como microorganismos endofíticos, no entanto, esses grupos são classificados como simbioses, além do fato de alguns autores considerarem o nódulo e hifas como estruturas externas à planta (AZEVEDO et al., 2000).

As espécies bacterianas encontradas dentro dos tecidos vegetais são frequentemente as mesmas encontradas nas zonas do solo adjacentes às raízes dando suporte à idéia de que o solo é a principal origem das bactérias endofíticas (STURZ et al., 2000). Estas bactérias podem penetrar nos tecidos vegetais via áreas de emergência de raízes, feridas, lenticelas e estômatos (HUANG, 1986; SPRENT e DE FARIA, 1988) ou por penetração ativa na epiderme da raiz com secreção de enzimas hidrolíticas (como pectinases e celulasas) (HALMANN et al., 1997). Colonizam a planta de forma local ou sistêmica. As bactérias endofíticas podem ser classificadas em: passageiras, oportunistas e competentes. As passageiras habitam o solo e eventualmente conseguem entrar na planta por feridas, por exemplo. Ao entrar pela raiz, ficam restritas ao córtex. As oportunistas são bactérias que estabelecem uma troca de sinais químicos com a planta e geralmente colonizam o exterior da raiz. Por uma oportunidade, podem entrar na raiz, ficando geralmente restritas ao córtex assim como as passageiras. As competentes são aquelas que respondem aos sinais químicos das raízes, se adaptando muito bem ao ambiente interno da planta. Conseguem colonizar, além do córtex, outros tecidos da raiz, tecidos vasculares, podendo colonizar toda a planta (HARDOIM et al., 2008) (Figura 1).

O possível potencial dos microorganismos endofíticos começou a receber atenção nos anos 80, quando sua capacidade de proteger seus hospedeiros contra insetos, patógenos e até mesmo animais domésticos foi reconhecido (AZEVEDO et al., 2000). Além das bactérias endofíticas serem potenciais agentes de biocontrole, por apresentarem um nicho ecológico

similar a fitopatógenos (RYAN, 2008) e muitas produzem compostos antimicrobianos (DOBBELAERE et al., 2003), podem trazer muitos outros benefícios às plantas: liberação de fitormônios como ácido indolilacético (AIA), citocininas e giberelinas (BHATTACHARJEE et al., 2008), incremento na tomada de nutrientes, aumento de resistência a estresse hídrico e osmótico e indução de resistência sistêmica na planta (DOBBELAERE et al., 2003). Há bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio que sintetizam a enzima nitrogenase, que catalisa a redução de N_2 a NH_4^+ , disponibilizando nitrogênio combinado para a planta (BHATTACHARJEE et al., 2008). A nitrogenase é sensível ao oxigênio e o processo de fixação de nitrogênio atmosférico despende grande quantidade de energia (POSTGATE, 1998). Sendo assim, a fixação biológica do nitrogênio é altamente regulada em nível de transcrição, em resposta à disponibilidade de nitrogênio fixado (DIXON e KAHN, 2004).

Pouco se sabe sobre como se dá a transferência do nitrogênio fixado para as plantas (CANUTO et al. 2003). Thuler et al. (2003) verificaram (*in vitro*) que bactérias fixadoras de nitrogênio, podem produzir e liberar aminoácidos, poliaminas (substâncias nitrogenadas de regulação do metabolismo celular) e AIA, possíveis formas de transferência de nitrogênio fixado.

Bactérias habitantes da rizosfera também acarretam esses benefícios para a planta. No entanto, freqüentemente, as bactérias endofíticas trazem mais benefícios para o seu hospedeiro em relação às de rizosfera (HARDOIM et al., 2008). Habitar o interior do tecido vegetal é mais interessante para a bactéria por ela estar menos vulnerável a competir com outros microorganismos do solo e estar protegida de muitos fatores desfavoráveis (bióticos e abióticos) (BHATTACHARJEE et al., 2008).

Figura 1. Classificação de Bactérias Endofíticas: passageiras (vermelho), oportunistas (azul) e competentes (amarelo).

Fonte: Hardoim et al. (2008).

1.1.3 Bactérias Fixadoras de Nitrogênio utilizadas em estudos de inoculações em plantas

Estudos têm sido realizados com inoculações de bactérias fixadoras de nitrogênio em diferentes plantas. Proteínas autofluorescentes são ferramentas muito utilizadas nesses estudos para acompanhamento da colonização da planta pelas bactérias inoculadas, tanto em superfícies como no interior dos tecidos vegetais. O gene GFP (Green Fluorescent Protein) é muito utilizado porque não requer nenhum substrato ou co-fator para expressar fluorescência (RYAN et al., 2008).

Muitas pesquisas sobre interação de bactérias fixadoras de nitrogênio com plantas têm utilizado o gênero bacteriano *Azospirillum* (DOBBELAERE et al., 2003). Além do referido gênero, os principais relatos de bactérias endofíticas de plantas utilizadas na agricultura como milho, arroz e cana-de-açúcar são dos gêneros *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Pseudomonas*.

(LODEWYCKX et al., 2002; LOIRET et al., 2004). O estudo do potencial de outras bactérias também isoladas de plantas cultiváveis é fundamental para a agricultura (LOIRET et al., 2004).

Mesmo com aplicação de fertilizantes nitrogenados, um cultivo contínuo de cana-de-açúcar poderia levar ao esgotamento de nitrogênio no solo e a uma queda da produção dessa cultura. No entanto, essa diminuição não tem sido verificada no Brasil, o que levou a se sugerir a possibilidade da cana-de-açúcar receber contribuições significativas de nitrogênio combinado de organismos fixadores de nitrogênio (LIMA; BODDEY; DÖBEREINER, 1986). A partir dessas observações, tem sido crescente o interesse em trabalhos com inoculações de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. Entretanto, no Brasil, estudos com inoculações de bactérias fixadoras de nitrogênio em cana-de-açúcar têm sido realizados priorizando a verificação de incremento de produtividade agrônômica e economia no uso de fertilizantes nitrogenados (PEREIRA et al., 2010; SCHULTZ et al., 2010; CANUTO et al., 2003; LIMA; BODDEY; DÖBEREINER, 1986). Menor atenção tem sido dada à pesquisa do efeito da inoculação de bactérias diazotróficas na fisiologia da cana-de-açúcar. Trabalhos nessa área podem trazer uma melhor compreensão do efeito ocasionado às plantas com a inoculação bacteriana e serem úteis para fundamentar as pesquisas voltadas a produtividade agrônômica.

O presente trabalho realizou um estudo do efeito da inoculação de uma bactéria endofítica fixadora de nitrogênio no desenvolvimento da cana-de-açúcar, com pesquisa das implicações em algumas características fisiológicas da planta. Foi selecionada, dentre uma coleção de bactérias fixadoras de nitrogênio, isoladas de cana-de-açúcar pelo grupo de pesquisadores alocados ao Laboratório de Fisiologia de microorganismos – departamento de microbiologia – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, a linhagem *Acinetobacter* sp. ICB117. Essa bactéria foi isolada do colmo da cana-de-açúcar, o que indica ser uma endofítica competente para a linhagem de cana-de-açúcar da qual foi isolada. Além disso, foi inoculada em outra variedade de cana-de-açúcar (SP803280) e foi re-isolada do interior dos tecidos da raiz e parte aérea (GONZALES, 2008). Outros trabalhos realizados pelo mesmo grupo mostraram que esse microrganismo liberou aminoácido (ácido aspártico, 75 ng/ml), poliamina (putrescina, 0,60 µg/mL) e AIA (7 µg/mL) em testes *in vitro* (FERRARA, 2010) e quando submetido à co-culturas com células indiferenciadas de cana-de-açúcar, elevou em 70% o teor protéico das células vegetais (MARTINS, R. C. R., 2007).

Acinetobacter faz parte da classe Gamma de *Proteobacteria* (RAINEY; LANG; STACKEBRANDT, 1994). Esse gênero é muito estudado na área de microbiologia clínica, no entanto, poucos são os estudos dessa bactéria como potencial promotora de crescimento vegetal. Há trabalhos que descrevem *Acinetobacter* sp. presente na rizosfera de trigo (SACHDEV et al., 2010), em soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004) e na seiva apoplástica do parênquima medular de colmo de cana-de-açúcar (VELÁZQUEZ et al., 2008).

Com base nos dados relatados por nosso grupo de trabalho e por não existirem muitos estudos sobre a relação estabelecida entre esse gênero e plantas, optou-se por estudar essa linhagem.

1.2 Desenvolvimento de inoculantes bacterianos comerciais

Já está sendo comercializado um inoculante com *Azospirillum brasilense* para milho e para trigo que foi desenvolvido pela Embrapa Soja e pela Universidade Federal do Paraná, em parceria com a iniciativa privada. “Ensaio conduzidos em cinco anos mostraram incrementos médios de 25% a 30% no rendimento do milho e de 8% a 11% no rendimento do trigo” (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2009a).

Atualmente, inoculantes para cana-de-açúcar feitos a base de bactérias fixadoras de nitrogênio estão sendo produzidos por quatro empresas (Stoller do Brasil, Turfal Indústria e Comércio de Produtos Biológicos Ltda, Fish Indústria e Comércio de Fertilizantes Ltda e Agrolatino Fertilizantes Especiais), as quais receberam orientações da Embrapa Agrobiologia e as linhagens bacterianas: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*. A previsão é de que em 2011 o produto já esteja disponível no mercado. A produção e utilização do inoculante são de baixo custo, cada dose do inoculante deve custar de 15 a 25 reais (EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 2008; EMBRAPA, 2009b).

1.3 Importância da cana-de-açúcar para o Brasil

O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de açúcar (PAULA et al., 2009), representando 40% do comércio internacional (SEGATO et al., 2006) e segundo maior produtor de etanol, com 36% da produção mundial, similar aos EUA que tem representatividade de 37% no mercado (BIRUR et al., 2008).

O crescimento no setor da cana-de-açúcar está gerando 1 milhão de empregos, investimentos de US\$ 30 bilhões até 2012 e existe a possibilidade de se gerar com o bagaço e palha uma vez e meia o equivalente ao gerado em eletricidade pela hidrelétrica Itaipu (JANK, 2008).

O álcool é a alternativa energética para substituição ao petróleo mais apropriada por ser renovável e poluir menos (SEGATO et al., 2006). O Brasil é dotado de território e clima apropriado ao plantio da cana-de-açúcar, que tem maior eficiência energética em relação ao milho utilizado pelos EUA para produção de etanol (BIRUR et al., 2008). No entanto, nos últimos anos tem surgido críticas negativas à política de substituição do petróleo por biocombustíveis por se afirmarem que há necessidade de se avançar em áreas agrícolas destinadas a produção de alimentos e que o Brasil direta ou indiretamente está desmatando a floresta amazônica para aumentar a produção de etanol (JANK, 2008). Mesmo que essas acusações não sejam verdadeiras, há necessidade de se provar para o mercado externo que é possível aumentar a produção de etanol e demais produtos da cana-de-açúcar sem causar esses prejuízos. Para se fazer isso, o desenvolvimento de inoculantes e de outras biotecnologias para diminuir os custos de produção e aumentar a produtividade da cultura de cana-de-açúcar são fundamentais.

1.4 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, pertencente à família Poaceae, é típica de climas tropicais e subtropicais (SEGATO et al., 2006). Atualmente, a cana para comércio é um híbrido de *Saccharum officinarum* com outras espécies, apresentando características agrônômicas de resistência a doenças (BALDANI et al., 2002).

Na prática, a cana-de-açúcar é propagada assexuadamente por secções dos colmos (toletes) contendo uma ou mais gemas (MALAVOLTA e HAAG, 1964). Cada gema pode desenvolver um colmo primário e esse pode formar colmos secundários, que por sua vez podem formar colmos terciários (VAN DILLEWIJN, 1952) (Figura 2). Esse desenvolvimento de colmos secundários e terciários é denominado perfilhamento, processo esse que garante número apropriado de colmos para uma alta colheita (MALAVOLTA e HAAG, 1964). Dois tipos de raízes se desenvolvem: 1) raízes originadas do tolete são finas e muito ramificadas; 2) raízes originadas a partir do colmo são grossas, brancas e menos ramificadas (VAN DILLEWIJN, 1952) (Figura 2).

Figura 2. Desenvolvimento de cana-de-açúcar a partir de tolete.
Fonte: Van Dillewijn (1952).

A cana-de-açúcar, por ser uma planta de metabolismo C_4 , apresenta uma série de modificações bioquímicas e anatômicas que permitem maior concentração de CO_2 nos tecidos (SAGE, 2004). Essa maior concentração possibilita a cana de açúcar desempenhar altas taxas de assimilação do CO_2 .

A enzima 1,5-bisfosfato carboxilase/ oxigenase (também denominada rubisco, é responsável pela fixação do CO_2 no ciclo de Calvin) atua como carboxilase e oxigenase. O predomínio de uma dessas atividades depende das concentrações relativas de CO_2 e O_2 . Essas moléculas competem como segundos substratos pela rubisco (primeiro substrato é a ribulose 1,5-

bisfosfato). Quando o oxigênio é utilizado como substrato, os produtos da reação são 2 moléculas: 2-Fosfoglicolato e 3-Fosfoglicerato. O primeiro produto passa por uma série de reações que envolvem consumo de O_2 e produção de CO_2 , razão pela qual a via é denominada fotorrespiração. Além disso, nessa via há consumo de ATP e NADPH (MARZZOCO e TORRES, 2007). Nas plantas C_4 , a rubisco está localizada onde as concentrações de CO_2 são suficientemente elevadas para a fotorrespiração ser tão baixa que praticamente não é detectada (MAJEROWICZ, 2008).

A Figura 3 esquematiza as reações bioquímicas (para assimilação do CO_2) que ocorrem nas plantas C_4 . Essas plantas desenvolveram dois tipos de células onde ocorre a fixação do carbono inorgânico. Em um grupo de células mais externas (células do mesófilo), o ciclo tem início com a PEP carboxilase (SAGE, 2004). Essa enzima se distribui em todas as células vegetais, mas em plantas C_4 , assume um papel especial na fotossíntese (MAJEROWICZ, 2008). A PEP carboxilase catalisa a carboxilação do fosfoenolpiruvato (PEP) na presença de bicarbonato para produzir oxaloacetato e Pi (LEPINIEC et al., 1994). O oxaloacetato pode ser reduzido a malato ou sofrer uma transaminação, dando origem ao aspartato (MAJEROWICZ, 2008).

O composto com 4 carbonos (malato ou aspartato) segue para um compartimento mais interno (células da bainha perivascular), onde é submetido a reações de descarboxilação, com liberação de CO_2 . As células que compõem esse compartimento têm paredes espessas e conseqüentemente, reduzidas perdas por difusão do CO_2 . A enzima Rubisco está localizada nesse grupo de células (MAJEROWICZ, 2008; SAGE, 2004).

A etapa de carboxilação é comum a todas as plantas C_4 , no entanto, existem variações bioquímicas na descarboxilação (SAGE, 2004). As plantas C_4 são divididas em pelo menos 3 grupos de acordo com a enzima que participa do processo de descarboxilação: a) Enzima málica dependente de NAD^+ ($NAD:ME$); b) Enzima málica dependente de $NADP^+$ ($NADP:ME$); c) Fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). Costumava-se acreditar que a cana-de-açúcar descarboxila o malato com auxílio da enzima $NADP:ME$, no entanto, há evidências de que a cana-de-açúcar tenha dois tipos de descarboxilação: $NADP:ME$ e PEPCK (CALSA JR e FIGUEIRA, 2007). Ainda não se sabe quais são as implicações fisiológicas da presença de ambas as vias e como elas podem ser exploradas para elevar a produção da cana-de-açúcar (HOTTA et al., 2010).

As moléculas de CO_2 geradas pelas reações de descarboxilação são incorporadas ao ciclo de Calvin-Benson (ciclo C_3) resultando em um produto de 3 carbonos (MAJEROWICZ, 2008), que retorna ao compartimento onde está localizada a PEP carboxilase. Se necessário, o ácido de 3 carbonos, é convertido em piruvato e fosforilado, regenerando o fosfoenolpiruvato (PEP, molécula primária que reage com o CO_2 atmosférico) (SAGE, 2004).

A regeneração do PEP consome duas ligações fosfato do ATP. A manutenção do ciclo C_4 exige, portanto, um gasto adicional de duas moléculas de ATP por molécula de CO_2 fixada (MAJEROWICZ, 2008). Contudo, esse custo energético pode ser compensado pela redução nas taxas de fotorrespiração (HOTTA et al., 2010).

Figura 3. Esquemática da via metabólica C_4 . O CO_2 é “bombeado” da atmosfera para o ciclo de Calvin. A regeneração de cada molécula de PEP, a partir do piruvato, exige o gasto de duas moléculas de ATP.

Fonte: Majerowicz (2008).

1.5 Metabolismo de nitrogênio em plantas

O nitrogênio é o nutriente mais importante adquirido do solo pelas plantas (PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2008) e sua disponibilidade é o principal fator limitante para o crescimento vegetal. Por essa razão, vários mecanismos importantes estão envolvidos nas plantas para captura eficiente (ZHANG; HONGLIN; PILBEAM, 2007) e utilização desse nutriente. As estratégias desenvolvidas pelas plantas vão desde uma absorção e assimilação eficiente de nitrato, estabelecimento de associações com bactérias fixadoras de nitrogênio até carnivorismo (CRAWFORD e GLASS, 1998).

As plantas absorvem o nitrogênio do solo principalmente na forma de NO_3^- ou NH_4^+ (BIGGS, 2003). Também podem absorver nitrogênio na forma orgânica como aminoácidos (NÄSHOLM et al., 2009) e até mesmo proteínas (PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2008). Contudo, a significância ecológica da captação de nitrogênio orgânico para nutrição da planta é ainda um assunto de ampla discussão (NÄSHOLM et al., 2009).

A resposta a cada uma dessas substâncias nitrogenadas varia entre as espécies vegetais (CRAWFORD e GLASS, 1998). Há aquelas que se desenvolvem melhor na presença de NO_3^- enquanto outras se desenvolvem melhor na presença de NH_4^+ . A fonte que a planta utiliza depende de três fatores: disponibilidade dos compostos nitrogenados, sistema regulado de captação que a planta expressa e presença de metabolismo endógeno que permita a assimilação do composto nitrogenado absorvido (NÄSHOLM et al., 2009).

Em ambientes com baixas concentrações de NH_4^+ as raízes absorvem esse íon por processo ativo, em altas concentrações por processo passivo, sendo o acúmulo desse íon prejudicial à planta. O NO_3^- é absorvido somente por processo ativo, uma vez sido captado, pode ser: acumulado em vacúolos, reduzido e assimilado na própria raiz ou transportado para as folhas (SODEK, 2008). Em muitas espécies vegetais, as folhas são o principal ponto de assimilação de NO_3^- porque a fotossíntese proporciona fonte de energia e a luminosidade é um fator de regulação da enzima nitrato redutase (FOYER e NOCTOR¹, apud BIGGS, 2003). O NO_3^- é reduzido a nitrito pela enzima nitrato redutase e o nitrito é reduzido a NH_4^+ pela nitrito redutase (ORSEL et al., 2002). NH_4^+ é incorporada na forma orgânica pelas enzimas Glutamina Sintetase (GS) e Glutamato Sintase (GOGAT). A enzima Glutamato Desidrogenase (GDH) também é capaz de realizar essa incorporação, no entanto, tem baixa afinidade pelo íon NH_4^+ . Sendo assim, as

¹FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Photosynthetic nitrogen assimilation: inter-pathway control and signaling. 2002.

primeiras moléculas nitrogenadas orgânicas sintetizadas são glutamina e glutamato e os demais aminoácidos são formados por reações de transferências do grupo amino (SODEK, 2008).

A forma como o nitrogênio assimilado na raiz é transportado para parte aérea varia nas diferentes espécies e estágios de desenvolvimento vegetal. Por exemplo, segundo Schubert (1986) as leguminosas costumam transportar o nitrogênio orgânico na forma de amidas (asparagina, glutamina e 4-Metilenoglutamina) e/ ou ureídeos (alantoína, ácido alantóico e citrulina), geralmente havendo presença dos dois tipos, com predomínio de um grupo. O transporte na forma de ureídeos é mais eficiente em termos de mols de carbono utilizados (THOMAS & SCHRADER, 1981), predominando, em geral, em leguminosas noduladas de regiões tropicais (SCHUBERT, 1986).

1.5.1 Metabolismo de nitrogênio em cana-de-açúcar

Apesar de o nitrogênio contribuir em média com 1% na massa seca total da cana-de-açúcar, seu papel é tão importante quanto ao do carbono, hidrogênio e oxigênio, que constituem juntos mais de 90% da matéria seca (CARNEIRO; TRIVELIN; VICTORIA, 1995).

Existem muitas pesquisas relativas ao uso de fertilização nitrogenada para cana-de-açúcar, no entanto, poucos estudos referentes ao metabolismo de nitrogênio foram realizados para essa planta.

Em um desses estudos, verificou-se que diferentes variedades de cana-de-açúcar se desenvolveram igualmente bem ao receber NH_4^+ ou NO_3^- na solução nutritiva, embora altas concentrações de NH_4^+ foram muito prejudiciais à cana-de-açúcar (BIGGS, 2003). O autor afirma que suas conclusões diferem de alguns estudos anteriores que indicaram um crescimento ligeiramente maior da cana-de-açúcar na presença de NH_4^+ .

Donato et al. (2004) verificaram atividade da nitrato redutase foliar significativa em todas as diferentes linhagens de cana-de-açúcar que estudaram, inclusive em plantas que foram cultivadas na ausência de nitrato. Assim como esse trabalho, outros estudos de atividade da nitrato redutase de cana-de-açúcar foram realizados somente em folhas, não sendo medida a atividade da referida enzima em raízes (BIGGS, 2003) dificultando o conhecimento sobre o local em que ocorre preferencialmente a redução do NO_3^- .

Em gramíneas, em geral, há predomínio na seiva xilemática de glutamina estando a asparagina em menores concentrações (SODEK, 2008). Diferente dessa afirmação, Biggs (2003) encontrou predomínio de asparagina na seiva xilemática de cana-de-açúcar. Subasinghe (2007) encontrou serina, alanina, lisina, arginina, valina e treolina na seiva xilemática de duas linhagens de cana-de-açúcar como principais aminoácidos constituintes, e em menor concentração ácido aspártico e ácido glutâmico.

1.6 Hipóteses iniciais

O presente trabalho propôs duas hipóteses iniciais:

- 1) *Acinetobacter* sp. ICB117, no interior de tecidos da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), fixa nitrogênio atmosférico e o disponibiliza para a planta.
- 2) Independente do fato de fixar nitrogênio, *Acinetobacter* sp. ICB117 promove crescimento da cana-de-açúcar.

2 OBJETIVOS

a) Objetivo geral: Analisar a influência de *Acinetobacter* sp. ICB117, uma Bactéria Endofítica Fixadora de Nitrogênio (BEFN), no desenvolvimento da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.).

b) Objetivos específicos: Em plantas inoculadas com *Acinetobacter* sp. ICB117 e não inoculadas, pretende-se:

- verificar a capacidade de re-colonização da cana-de-açúcar pela bactéria;
- acompanhar crescimento do vegetal com medidas de altura, contagem de número de folhas, presença de perfilhamento e determinação de massa seca;
- analisar composição da seiva quanto a aminoácidos;
- determinar a relação C/N na parte aérea e na parte radicular;
- medir atividade da nitrato redutase foliar;
- medir assimilação líquida máxima de CO₂;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material biológico

a) Microorganismo: *Acinetobacter* sp. ICB117 (Bactéria Endofítica fixadora de nitrogênio, isolada do colmo da cana-de-açúcar variedade SP791011).

b) Vegetal: Plantas de *Saccharum* sp. variedade SP791011 (cana-de-açúcar), cultivadas a partir de toletes com uma gema, com 1 mês de idade foram gentilmente fornecidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC).

3.1.2 Soluções com nutrientes

a) Meio de cultura para ICB117:

- Meio NFb, mesmo meio no qual ICB117 foi isolado. Descrito para bactérias fixadoras de N₂ endofíticas por Döbereiner et al. (1995) (ANEXO A.1).
- Meio Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK E RUSSELL, 2001) (ANEXO A.1).

b) Solução nutritiva para plantas:

- Solução de Hoagland com fonte de nitrogênio (NO₃⁻ a 15 mM) (ANEXO A.2).
- Solução nutritiva sem fonte de nitrogênio (ANEXO A.2).

3.2 Métodos

3.2.1 Cultivo das plantas e procedimento de inoculação

Um dia antes de se realizar o processo de inoculação, as plantas não foram regadas com água. As plantas foram retiradas do substrato em que vieram plantadas para a realização do

procedimento de inoculação. As raízes foram lavadas e suas pontas cortadas: pequenos cortes foram realizados nas pontas dos diferentes tipos de raízes (raízes originárias do tolete, raízes originárias do desenvolvimento inicial do colmo). Após esse procedimento, para metade das plantas, suas raízes foram imersas em 4 L de suspensão de ICB117 em água destilada e o restante das plantas, suas raízes foram imersas em 4 L de água destilada sem a presença de *Acinetobacter* sp. ICB117. As raízes de todas as plantas permaneceram submersas por 2h. Após esse período, as plantas foram re-plantadas individualmente em vasos plásticos de 7 L contendo como substrato vermiculita e areia na proporção de 2:1. Os vasos foram sorteados aleatoriamente para receberem etiquetas com os seguintes tratamentos: **controle (C)** (não inoculadas) – solução nutritiva sem fonte de nitrogênio; **nitrato (N)** (não inoculadas) – solução nutritiva contendo 15 mM de nitrato (NO₃); **bactéria (B)** (inoculadas) – solução nutritiva sem nitrogênio e **bactéria + nitrato (BN)** (inoculadas) – solução nutritiva contendo 15 mM de nitrato (NO₃). Realizou-se um plantio uniforme (tamanho plantas) para todos os tratamentos (Figura 4).

As plantas receberam semanalmente 200 mL (por vaso) de solução nutritiva de Hoagland com ou sem fonte de nitrogênio combinado (ver item 3.1.2) de acordo com o respectivo tratamento e permaneceram em casa de vegetação. Os fatores temperatura e intensidade luminosa não foram controlados. A experimentação foi realizada de outubro à dezembro de 2009.

Figura 4. Esquematisação procedimento de inoculação bacteriana e plantio.

3.2.2 Cultivo de *Acinetobacter* sp. ICB117 para inoculação em cana-de-açúcar

a) Introdução de gene com expressão de fluorescência em *Acinetobacter* sp. ICB117

Previamente a realização do procedimento de inoculação, introduziu-se no microrganismo o plasmídio pWM1007, que contém um gene com expressão de fluorescência verde (GFP, Green Fluorescent Protein) e contém uma marca de resistência a canamicina. O plasmídio foi cedido gentilmente pela Dra. Maria T. Brandl do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) ao nosso laboratório, onde se encontrava em solução estoque.

Para o preparo das células eletrocompetentes, vinte e cinco mililitros de cultura de ICB117 em meio LB (ver item 3.1.2) foram inoculados em 225 mL de meio LB e incubados sob agitação até a DO de 0,5 (600 nm) ter sido atingida. As células foram esfriadas em gelo por 15min e centrifugadas por 40min a 5000 g a 4 °C. O precipitado foi suspenso em água deionizada estéril. Esse procedimento foi repetido duas vezes. Realizaram-se mais duas centrifugações a 5000 g a 4 °C por 10min sendo o precipitado suspenso em glicerol 10% gelado (5 mL na primeira lavagem e 500 µL na segunda). Após essas sucessivas lavagens para retirada de todo o

sal e muco da cultura de *Acinetobacter* ICB117, as células bacterianas foram congeladas em gelo seco e armazenadas a -80 °C (AUSUBEL et al., 1995).

Quarenta microlitros de células eletrocompetentes foram misturadas com 10 µl de DNA plasmidial em uma cubeta 0,1 cm (Bio- Rad). As células foram eletroporadas a 200 Ω, 25 µF e 1,8 KV (AUSUBEL et al., 1995). Em seguida, a suspensão de células foi transferida para um tubo de 1,5 mL, contendo 1 mL de meio LB, que foi mantido sob agitação (150 rpm em agitador Thermomixer compact EPPENDORF) por 1h a 30 °C. Logo após, 100 µl da suspensão foram semeados em quadruplicata em meio LB sólido contendo canamicina (50 µg mL⁻¹). Após 24h já haviam colônias crescidas e após 48h observou-se que expressavam fluorescência de cor verde.

b) Cultivo de *Acinetobacter* sp. ICB 117

Acinetobacter sp. ICB117 contendo o gene de fluorescência GFP foi cultivado em 100 mL de meio NFb (ver item 3.1.2) acrescido de 0,134 g de (NH₄)₂SO₄ (sulfato de amônio) sob agitação à 30 °C por 16h. A cultura bacteriana foi transferida para 900 mL de meio NFb sem acréscimo de (NH₄)₂SO₄ (totalizando 1 L) e foi cultivada à 30 °C sem agitação por 24h. Após esse período, a cultura atingiu 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) mL⁻¹.

A cultura microbiana foi então submetida à centrifugação por 20min a 5000 g a 4 °C, para retirada de excesso de sais do meio de cultura. O precipitado foi suspenso em água destilada estéril. Essa suspensão foi utilizada para inoculação em plantas de cana-de-açúcar.

3.2.3 *Coleta do Material Vegetal*

Foram realizadas coletas de material vegetal (n total =7 para cada tratamento) mensalmente no período de 2 meses para se analisar: crescimento (n=4 para cada tratamento), concentração de aminoácidos na seiva (n=3 para cada tratamento), proporções de C e N presentes na raiz e folhas (n=3 para cada tratamento), atividade da nitrato redutase foliar (n=3 para cada tratamento), assimilação líquida máxima de CO₂ (n=2 para cada tratamento) e estimativa da população de ICB117 endofítica da raiz e parte aérea (n=3 para cada tratamento).

a) Parâmetros de crescimento

Os parâmetros utilizados para acompanhar o crescimento das plantas foram a altura (cm), número de folhas e de perfilhos. A altura era medida da base do tolete até a folha mais alta.

Após a determinação da altura, nº de folhas e perfilhos e coleta da seiva, as plantas foram secas em estufa a 50 °C até o peso seco se apresentar constante para obtenção da massa seca total.

b) Coleta e Análise da seiva

A seiva foi coletada *in vivo* com auxílio de uma bomba de pressão (PMS Instrument modelo 1000, Oregon EUA) (CROFT et al., 1994) no período da manhã. As amostras foram congeladas a -20 °C para análises posteriores.

Para análise de aminoácidos e alantoína foi utilizada a metodologia descrita em Bruijn e Bout (2000), modificada por Macedo (2010): 20 µL de seiva foi acidificada com 1 µL de HCl 0,2 M e passada em coluna contendo resina de troca catiônica AG 50W-X8 (BioRad Laboratories), previamente lavada com água ultra-pura (Milli-Q) e HCl 0,01 M. Após a adição da amostra a resina foi lavada com 200 µL de HCl 0,01 M por 3 vezes, para exclusão dos carboidratos. Após este procedimento, a coluna foi lavada 4 vezes para retirada dos aminoácidos com 200 µL de tampão trisodiocitrato 33 mM, contendo 145 mM de NaOH e 200 mM de H₃BO₃ (≈ pH 10). Em todas as lavagens, as centrifugações eram realizadas por 3min a 12 000 g.

Obtiveram-se assim 4 frações para cada amostra, que tiveram seu pH ajustado em 9 com tampão trisodiocitrato 33 mM e, isoladamente, foram filtradas em filtro de 33 µm e analisadas em Cromatografia de Troca Iônica de Alto Desempenho com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) ICS 3000, em coluna Amino – PAC PA10 2 x 250 mm (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA) e coluna guarda AminoPac – PA10 2 x 50 mm (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, EUA). Os eluentes utilizados foram: A – água deionizada; B - hidróxido de sódio 250 mM; e C - acetato de sódio 1M, com fluxo 0,2 mL/ minuto. A eluição aconteceu através de um gradiente entre os eluentes A, B e C da seguinte maneira: 0-28min. 93-87 % A , 7-13 % B; 29-36min. 87-67% A, 13 % B, 0-20 % C; 37-49min. 67-55 % A, 13-15 % B, 20-30 % C; 50-54,8min. 55-30 % A, 15-25 % B, 30-45 % C; 54,9-55min. 30-20 % A, 25-80 % B, 45-0 % C; 55-55,1min. 20-93 % A, 80-7 % B; 55,2 – 60min. 93 % A, 7 % B.

Alantoína e os 21 aminoácidos foram pesquisados na seiva das plantas.

c) Atividade da enzima nitrato redutase foliar

A coleta de material foliar foi realizada pela manhã, sendo amostrados o terço médio da última folha totalmente expandida para os ensaios de atividade da nitrato redutase, segundo Stewart et al. (1986). O material fresco foi picado em pequenos pedaços e 100 mg de cada amostra foram transferidos para um tubo de ensaio. Adicionaram-se 5 mL de solução de incubação composta por Fosfato de Potássio Monobásico (KH_2PO_4 0,05 M), Nitrato de Potássio (KNO_3 100 mM) e 1,5% de Álcool N-propílico (1-propanol 0,05 M). Realizou-se infiltração a vácuo por 3 vezes seguidas. Manteve-se o vácuo e incubou-se à 30 °C por 1h no escuro. Em seguida, 1 mL de líquido da amostra foi transferido para outro tubo de ensaio, ao qual se adicionou 1 mL de ácido sulfanílico 1% e 1 mL de NED 0,05% (α -naphthyl etilenodiamina dihidroclórico). Os tubos permaneceram à temperatura ambiente por 30min e então se realizou leitura de absorbância a 540 nm em espectrofotômetro (biospectro SP-22).

d) Determinação da razão isotópica do C e N e determinação das concentrações de C e N em amostras de folhas e raízes

A determinação das concentrações de C e N no material vegetal e da abundância natural dos seus isótopos estáveis ($\delta^{15}\text{N}$ e $\delta^{13}\text{C}$) foi realizada nas amostras de folhas e raízes secas a 50 °C que foram utilizadas para determinação da biomassa. O material foi moído com auxílio de um moedor de bolas e analisado através de Analisador elementar (Carlo Erba EA 1110 CHNS, CE Instruments) e espectrometria de massas para razões isotópicas (Delta Plus, ThermoQuest-Finnigan) do Laboratório de Ecologia Isotópica do CENA/ESALQ/USP.

e) Caracterização das trocas gasosas

Foram avaliadas através de analisador de gás por infravermelho (LiCor - 6400 e Ciras2). As medidas foram realizadas no período da manhã, na primeira folha totalmente expandida, em dois indivíduos por tratamento. A seguinte abordagem foi caracterizada: curvas de resposta à luz ($A \times \text{RFA}$) para identificação da fotossíntese máxima (A_{max}), radiação fotossinteticamente ativa na saturação da fotossíntese (RFAsat) calculada a partir do ponto de saturação de luz com uso de câmara de luz artificial e cilindro de CO_2 . As curvas $A \times \text{RFA}$ foram obtidas segundo variação do RFA entre 0 e 2000 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de forma decrescente. Foram tomadas 12 medidas nas seguintes intensidades de RFA: 2000, 1500, 1250, 1000, 750, 500, 300, 150, 100, 70, 50 e 0

$\mu\text{mol f\acute{otons m}^{-2} \text{s}^{-1}}$. A concentrao do CO_2 foi mantida constante a 380 ppm. A temperatura foliar foi mantida entre 22 e 30 °C. Ao se realizar a curva de luz no 2º mÊs foi constatado saturao da assimilao de CO_2 com intensidades luminosas inferiores a 1000 $\mu\text{mol f\acute{otons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Para se evitar possÍveis danos a planta, as curvas de luz no 2º mÊs foram realizadas somente at 1250 $\mu\text{mol f\acute{otons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e assim os dados apresentados a seguir so referentes esse valor como intensidade luminosa mxima para o 1º e 2º mÊs.

3.2.4 Isolamento de Acinetobacter sp. ICB117 inoculado previamente nas plantas de cana-de-acar

a) Desinfeco da planta

Aps cada perÍodo de 1 e 2 meses, as plantas foram removidas dos vasos. Trs gramas de raÍzes e 3 g da parte area foram utilizados para se re-isolar e estimar a populao endofÍtica de ICB117 previamente inoculado.

Para desinfeco da planta seguiu-se a metodologia descrita por Arajo et al. (2002), modificada por Pariona (2007). As raÍzes e parte area da cana-de-acar foram inicialmente lavadas em gua corrente para a retirada de resÍduos do substrato. O material vegetal era imerso em lcool 70% por 2min com agitao, passagem por 5min em soluo de hipoclorito de sdio a 2% com agitao e trs lavagens sucessivas em gua destilada estril por 2min com agitao.

b) Controle de desinfeco

Ao se realizar as desinfecos, a eficcia da metodologia foi testada da seguinte maneira: previamente ao processo de desinfeco selou-se com parafina as pontas cortadas de folhas e raÍzes para se isolar o contedo interno, evitando possÍveis saÍdas de bactrias endofÍticas. Aps a desinfeco, estes materiais foram colocados em caldo nutriente e incubados por 24h a 30 °C. Aps esse perÍodo verificava-se a presena ou no de crescimento microbiano.

c) Processo de isolamento e Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

O material desinfetado foi macerado em 6 mL de água destilada estéril em almofariz e pistilo estéreis. Assim, obteve-se um caldo sendo 100 μL semeado (duplicata) em meio LB sólido com canamicina ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e micostatina ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Após 48h de permanência em estufa á 30°C , as colônias com expressão de fluorescência verde eram contadas. O número médio de UFC de ICB117 em cada tratamento foi utilizado para o cálculo da estimativa da população endofítica de ICB117 (UFC g^{-1}) presente na raiz e parte aérea. A verificação de fluorescência era realizada com o auxílio do transluminador M-20 Cambridge – UK.

3.2.5 Análises estatísticas

Os dados de altura foram submetidos à análise de variância com dois fatores (nitrato e bactéria) e uma medida repetida (tempo). Realizou-se o pós-teste Bonferroni.

A biomassa foi submetida à análise de variância (ANOVA) com três fatores (nitrato, bactéria e tempo). Quando necessário realizou-se comparações múltiplas pelo método de Tukey.

A assimilação de carbono, respiração, atividade nitrato redutase foliar, concentração em porcentagem de nitrogênio, abundância natural ^{15}N , razão C/N e número de folhas foram analisadas por ANOVA com dois fatores (nitrato e bactéria), seguida, quando necessário, por comparações múltiplas pelo método de Tukey.

A UFC foi avaliada somente pelos fatores nitrato e tempo, ANOVA.

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

O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização da metodologia de inoculação

Em novembro de 2008, foi iniciada a realização da experimentação, com introdução de ICB117 contendo GFP na cana-de-açúcar. No entanto, imprevistos ocorreram: nos dias que se seguiram a realização do processo de inoculação, todas as plantas (inoculadas e não inoculadas) sofreram visualmente grande estresse (folhas enrolaram e amarelaram). Foi imprescindível a recuperação das plantas antes de prosseguir com a experimentação (75 dias).

Entretanto, devido ao maior período decorrido de tempo, as plantas foram prejudicadas pelo pequeno tamanho do vaso utilizado (5L). Houve um claro impedimento do crescimento das raízes após o segundo mês de tratamento. Além disso, não foi possível re-isolar um número confiável de UFC com expressão de fluorescência verde.

Foi necessária padronização da metodologia de inoculação para realização do experimento com tentativas de redução do estresse causado às plantas. Para tanto, duas hipóteses foram elaboradas e testadas:

- 1) a manipulação das raízes, com realização de cortes seria a principal razão que causou o estresse nas plantas;
- 2) o meio de cultura para bactérias, utilizado como veículo de inoculação, poderia oferecer condições desfavoráveis para as plantas.

A primeira hipótese foi testada com inoculação de ICB117 em 3 grupos de plantas:

- a) plantas nas quais se realizaram cortes nas pontas das raízes;
- b) plantas nas quais, com auxílio de um prego, se realizaram furos nas raízes;
- c) plantas nas quais não se realizaram cortes nem furos.

Após esse procedimento as raízes das plantas foram imersas em suspensão de ICB117 em meio NFb por 2h, em seguida sendo plantadas. Todas as plantas apresentaram os mesmos estresses previamente observados. Portanto a manipulação com realização de cortes não mostrou ser o principal fator determinante do estresse.

Para se verificar o estresse causado pelo simples fato de lavar as raízes, estes órgãos foram submetidos à lavagem e em seguida foram plantados (as raízes não foram imersas em meio de cultura bacteriano). Verificou-se um grau de estresse reduzido. Somente as pontas das folhas enrolaram e amarelaram. Em poucos dias as plantas conseguiram se recuperar sem a necessidade de receber fonte de nitrogênio combinado na solução nutritiva.

A segunda hipótese foi testada: centrifugou-se (5000 g por 20min) a cultura de ICB117 (10^8 UFC mL⁻¹) crescida em meio NFb, suspendendo-se o precipitado em água destilada estéril. Uma nova contagem de UFC foi realizada e manteve-se o valor de 10^8 UFC mL⁻¹. As pontas das raízes foram lavadas, cortadas e imersas na suspensão de ICB117 em água destilada. Verificou-se um grau de estresse reduzido. Somente as pontas das folhas enrolaram e amarelaram (mesmo estresse sofrido ao se simplesmente lavar as raízes).

Em poucos dias as plantas conseguiram se recuperar sem a necessidade de receber fonte de nitrogênio combinado na solução nutritiva.

Isolaram-se do interior do tecido vegetal células fluorescentes em número aceitável para estimativa da população bacteriana até 2 meses após a inoculação de ICB117 nas plantas de cana-de-açúcar.

Tendo sido padronizada a metodologia de inoculação (utilização das células bacterianas suspensas em água destilada como veículo de inoculação, ver item 3.2.1), repetiu-se o experimento com início em outubro de 2009. Os resultados mostrados a seguir são referentes a essa experimentação.

4.2 Parâmetros de crescimento

4.2.1 Altura

As medidas de altura (cm), realizadas imediatamente antes do início do experimento, mostram que as plantas foram distribuídas uniformemente para receberem os diferentes tratamentos (Figura 5).

Figura 5. Altura (cm) inicial das plantas distribuídas para receberem diferentes tratamentos ($p=0,886$). Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN).

A altura (cm) das plantas (em cada mês) não foi significativamente influenciada pela presença de ICB117; somente o nitrato, no 1º e 2º mês após o início dos diferentes tratamentos, exerceu influência nos resultados para esse parâmetro de crescimento (N e $BN > C$ e B). A altura (cm) das plantas aumentou de acordo com o tempo, com exceção das plantas tratadas sem nitrato (C e B) que não mostraram crescimento significativo no 1º mês de estudo (comparando-se às medidas iniciais) (Figura 6).

Figura 6. Altura (cm) das plantas submetidas aos diferentes tratamentos ao longo dos meses de estudo. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN). Mês1 e mês2: (N e BN) $>$ (C e B) ($p<0,05$).
 N e BN : mês2>mês1>início ($p<0,05$). C e B : mês2>mês1 ($p<0,05$).

4.2.2 Número de folhas

No 1º mês de estudo verificou-se que a presença de ICB117 elevou o número de folhas ($p=0,025$) assim como o nitrato causou esse mesmo efeito ($p<0,001$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de folhas, média e desvio padrão do número de folhas presentes nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos no 1º mês. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN). Fator bactéria ($p=0,025$) e Fator nitrato ($p<0,001$) elevaram Número de Folhas.

NÚMERO DE FOLHAS			
C	B	N	BN
5	6	6	6
5	6	6	6
5	5	6	6
5	5	6	6
4	5	6	6
4	5	6	6
4	5	5	6
4	5	5	5
4	5	5	5
4	5	5	5
4	4	5	5
4	4	5	5
4	4	5	5
4	4	5	5
4	4	5	5
4,3 ±0,5	4,8 ±0,7	5,4 ±0,5	5,5 ±0,5

A análise estatística dos dados do nº de folhas obtidos no 2º mês de experimento foi inviabilizada devido ao baixo número de amostras ($n=4$) e às poucas variações entre eles. Ainda assim, é interessante ressaltar que as plantas tratadas com bactéria, na ausência de nitrato (B), apresentaram maior número de folhas em relação às plantas controle (C) (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de folhas, média e desvio padrão do número de folhas presentes nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos no 2º mês. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN).

NÚMERO DE FOLHAS			
C	B	N	BN
5	7	7	7
5	6	7	7
5	6	7	7
5	6	7	7
5±0	6,3 ±0,5	7±0	7 ±0

4.2.3 Perfilhos

No decorrer do experimento, em todos os tratamentos, não se observou perfilhamento nas plantas.

4.2.4 Biomassa

a) Raiz

Os valores de massa seca (g) das raízes mostraram que as plantas inoculadas apresentaram maior biomassa radicular em relação às não inoculadas ($p < 0,001$) em ambos os meses de estudo (B e BN > C e N). O nitrato não influenciou significativamente os valores de biomassa radicular. Do 1º mês de estudo ao 2º mês, todas as plantas aumentaram consideravelmente em biomassa radicular ($p < 0,001$) (Figura 7).

Figura 7. Massa seca (g) radicular das plantas submetidas aos diferentes tratamentos ao longo dos meses de estudo. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN): (B e BN) > (C e N) ($p < 0,001$). Mês2 > mês1 ($p < 0,001$).

A influência de *Acinetobacter* sp. ICB117 nas raízes das plantas pode ser visivelmente verificada (Figura 8).

Figura 8. Raízes das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no 2º mês de experimentação. Controle (C), Nitrato (N), Bactéria (B) e Bactéria + Nitrato (BN).

b) Aérea

Diferentemente do que se averiguou na biomassa radicular, na biomassa aérea não se constatou diferenças significativas entre as plantas inoculadas e não inoculadas. O teste estatístico indicou efeito de interação entre os fatores tempo e nitrato: ao se analisar cada mês isoladamente, se constatou que no 2º mês, as plantas tratadas com nitrato apresentaram maior biomassa em relação às sem nitrato ($N \text{ e } BN > C \text{ e } B$) ($p < 0,05$), mas no 1º mês, não houve diferença significativa entre as plantas tratadas com e sem nitrato ($C = B = N = BN$). Todas as plantas aumentaram significativamente ($p < 0,05$) em biomassa aérea do 1º mês para o 2º mês (Figura 9).

Figura 9. Massa seca (g) da parte aérea das plantas submetidas aos diferentes tratamentos ao longo dos meses de estudo. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN). Mês2: ($N \text{ e } BN > C \text{ e } B$) ($p < 0,05$). Mês2>mês1 ($P < 0,05$).

c) Total

A presença de ICB117 proporcionou aumento em biomassa total ($p = 0,005$) em ambos os meses, independente da presença de nitrato. Houve efeito de interação nitrato e tempo: o nitrato conduziu a um aumento em biomassa somente no 2º mês ($p < 0,05$). Todas as plantas aumentaram significativamente ($p < 0,05$) em biomassa total do 1º mês para o 2º mês (Figura 10).

Figura 10. Massa seca (g) total das plantas submetidas aos diferentes tratamentos ao longo dos meses de estudo. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN): Mês1: Fator Bactéria elevou biomassa ($p=0,005$). Mês2: Fator bactéria ($p=0,005$) e fator nitrato ($p<0,05$) elevaram biomassa. Mês2>mês1 ($p<0,05$).

d) Razão RAIZ:PARTE AÉREA

As plantas inoculadas investiram mais em biomassa radicular em relação às plantas não inoculadas, principalmente no 2º mês. No referido tempo de estudo o efeito do nitrato foi evidenciado: as plantas inoculadas tratadas com nitrato (BN) apresentaram menor razão raiz:parte aérea em relação às também inoculadas, porém tratadas na ausência de nitrato (B). As plantas não inoculadas tratadas com nitrato (N) apresentaram menor razão raiz:parte aérea em relação às plantas não inoculadas tratadas na ausência de nitrato (C) (Tabela 3).

Tabela 3 - Razão raiz:parte aérea das plantas submetidas aos diferentes tratamentos ao longo dos meses de estudo. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN).

RAZÃO RAIZ: PARTE AÉREA		
	mês 1	mês 2
C	0,9	0,7
B	1,5	1,3
N	0,9	0,5
BN	1	0,9

4.3 Atividade Nitrato Redutase Foliar

Ao se realizar a análise estatística dos dados dos dois meses de estudo em conjunto, observou-se nas plantas tratadas com nitrato, maior atividade da nitrato redutase foliar em relação as plantas desprovidas de nitrato ($p < 0,001$). A bactéria não influenciou significativamente a atividade da enzima ($N \text{ e } BN > C \text{ e } B$) (Figura 11).

Figura 11. Atividade da nitrato redutase foliar das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. 1º e 2º mês analisados em conjunto. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN): ($N \text{ e } BN > (C \text{ e } B)$) ($p < 0,001$).

4.4 Assimilação líquida máxima de CO₂ e respiração (no escuro)

Ao se realizar a análise estatística dos dados dos dois meses de estudo em conjunto, verificou-se que a bactéria incrementou a assimilação líquida máxima de CO₂ pelas plantas ($p = 0,016$), assim como o nitrato ocasionou o mesmo efeito ($p < 0,001$) (Tabela 4). Não se verificaram diferenças significativas na respiração das plantas submetidas aos diferentes tratamentos (fator bactéria: $p = 0,774$; fator nitrato: $p = 0,639$).

Tabela 4 - Assimilação máxima líquida média de CO_2 ($\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) (A liq máx) e desvio padrão da A liq máx no 1º e 2º mês de estudo. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN): Fator bactéria ($p=0,016$) e Fator nitrato ($p<0,001$) elevaram valores.

ASSIMILAÇÃO MÁXIMA LÍQUIDA CO_2		
	mês 1	mês 2
C	$9,6 \pm 0,3$	$8,2 \pm 0,9$
B	$12,7 \pm 0,5$	$10,9 \pm 0,5$
N	$19,1 \pm 1,9$	$20,0 \pm 2,7$
BN	$20,3 \pm 1,0$	$21,7 \pm 3,0$

4.5 Densidade populacional endofítica de *Acinetobacter* sp. ICB117

a) Raiz

Isolou-se maior quantidade de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) com fluorescência verde (ICB117) no 1º mês em relação ao 2º mês ($p<0,001$) e em ambos os meses se verificou que nas plantas inoculadas tratadas sem nitrato (B), o número de UFC com fluorescência verde foi superior às plantas inoculadas tratadas com nitrato (BN) ($p<0,001$) (Figura 12). Não se detectaram UFC fluorescentes no macerado vegetal das plantas não inoculadas (controle e nitrato).

Figura 12. UFC g⁻¹ (de tecido fresco) com expressão de fluorescência verde, isoladas do interior do tecido radicular após 1 e 2 meses da inoculação. Bactéria (B) e Bactéria + Nitrato (BN). $B>BN$ ($p<0,001$). Mês1>mês2 ($p<0,001$).

b) Parte aérea

Não se detectaram UFC fluorescentes verdes no macerado vegetal da parte aérea.

4.6 Proporções Carbono e Nitrogênio (2º mês)

a) Raiz

O valor absoluto de ^{15}N na raiz (abundância natural) foi influenciado principalmente pelo fator nitrato ($p = 0,005$): as plantas que receberam nitrato apresentaram valores absolutos de ^{15}N maiores em relação às plantas que não receberam nitrato (Figura 13).

Figura 13. Valor absoluto de ^{15}N nas raízes das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Dados referentes ao mês 2. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN). (N e BN) > (C e B) ($p = 0,005$).

Assim como o valor absoluto de ^{15}N , a porcentagem de nitrogênio na raiz e a razão C/N foram influenciadas somente pelo fator nitrato ($p = 0,002$): as plantas que receberam nitrato mostraram maior porcentagem de nitrogênio e menor razão C/N (Figura 14 e Figura 15).

Figura 14. Porcentagem de nitrogênio nas raízes das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Dados referentes ao mês 2. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN). (N e BN) > (C e B) ($p = 0,002$).

Figura 15. Razão Carbono/ Nitrogênio nas raízes das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Dados referentes ao mês 2. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN). (N e BN) > (C e B) ($p = 0,002$).

b) Folha

Assim como na raiz, o valor absoluto de ^{15}N na folha foi influenciado somente pelo fator nitrato ($p < 0,001$): as plantas que receberam nitrato apresentaram valores absolutos de ^{15}N maiores em relação às plantas que não receberam nitrato (Figura 16).

Figura 16. Valor absoluto de ^{15}N nas folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Dados referentes ao mês 2. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN). (N e BN) > (C e B) ($p < 0,001$).

A porcentagem de nitrogênio na folha foi influenciada positivamente somente nas plantas tratadas com nitrato não inoculadas (N) ($p < 0,05$) (Figura 17), assim como somente as folhas das plantas que receberam esse tratamento apresentaram significativa menor razão C/N ($p < 0,05$) (Figura 18).

Figura 17. Porcentagem de nitrogênio nas folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Dados referentes ao mês 2. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN). (N) > (C, B, BN) ($p < 0,05$).

Figura 18. Razão Carbono/ Nitrogênio nas folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos. Dados referentes ao mês 2. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN) ($N < (C, B, N, BN)$ ($p < 0,05$).

4.7 Aminoácidos presentes na seiva

Para ambos os meses, os dados referentes aos aminoácidos presentes na seiva, exibiram grande variabilidade em cada tratamento. Por esse motivo, não se verificou influência de nenhum tratamento na composição de aminoácidos da seiva, com predomínio de arginina em todas as plantas (Figura 19 e Figura 20).

A Tabela 5 e a Tabela 6 apresentam as concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos aminoácidos encontrados na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no primeiro e segundo mês de estudo, respectivamente.

A Tabela 7 e a Tabela 8 apresentam a porcentagem da concentração de cada aminoácido encontrado na seiva, no primeiro e segundo mês de estudo, respectivamente.

A Figura 19 e a Figura 20 são referentes à Tabela 7 e à Tabela 8, respectivamente.

Além dos aminoácidos descritos nas tabelas a seguir não foram encontrados outros aminoácidos na seiva das plantas.

Alantoína não foi encontrada na seiva de nenhum indivíduo estudado.

Tabela 5 - Concentrações médias dos aminoácidos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e desvio padrão das concentrações dos aminoácidos presentes na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no primeiro mês de estudo. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN).

AMINOÁCIDOS ($\mu\text{g mL}^{-1}$) MÊS 1				
	C	B	N	BN
Arginina	0,0635 $\pm$ 0,0098	0,0669 $\pm$ 0,0161	0,0649 $\pm$ 0,0348	0,1249 $\pm$ 0,0089
Tirosina	0,0116 $\pm$ 0,0057	0,0113 $\pm$ 0,0035	0,0086 $\pm$ 0,0032	0,0091 $\pm$ 0,0025
Glutamina	0,0154 $\pm$ 0,0183	0,0041 $\pm$ 0,0049	0,0103 $\pm$ 0,0076	0,0141 $\pm$ 0,0066
Aspartato	0,0355 $\pm$ 0,0412	0 $\pm$ 0	0,0027 $\pm$ 0,0047	0,0028 $\pm$ 0,0039
Valina	0,0103 $\pm$ 0,0178	0,0018 $\pm$ 0,0031	0,0059 $\pm$ 0,0071	0,0169 $\pm$ 0,0076
Glicina	0 $\pm$ 0	0,0098 $\pm$ 0,0042	0,0059 $\pm$ 0,0064	0 $\pm$ 0
Asparagina	0,0043 $\pm$ 0,0071	0,0019 $\pm$ 0,0023	0,0034 $\pm$ 0,0018	0,0084 $\pm$ 0,0046
Fenilalanina	0,0071 $\pm$ 0,0048	0,0028 $\pm$ 0,0022	0,0010 $\pm$ 0,0003	0,0014 $\pm$ 0,0005
Histidina	0,0025 $\pm$ 0,0009	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Hidroxiprolina	0 $\pm$ 0	0,0007 $\pm$ 0,0013	0,0003 $\pm$ 0,0005	0,0003 $\pm$ 0,0004
Prolina	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,0005 $\pm$ 0,0005	0,0002 $\pm$ 0,0003
Total	0,1503	0,0993	0,1036	0,1780

Tabela 6 - Concentrações médias dos aminoácidos ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e desvio padrão das concentrações dos aminoácidos presentes na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no segundo mês de estudo. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN).

AMINOÁCIDOS ($\mu\text{g mL}^{-1}$) MÊS 2				
	C	B	N	BN
Arginina	0,0305 $\pm$ 0,0180	0,0248 $\pm$ 0,0051	0,0137 $\pm$ 0,0105	0,0299 $\pm$ 0,0083
Aspartato	0,0446 $\pm$ 0,0772	0,0029 $\pm$ 0,0050	0,0092 $\pm$ 0,0128	0,0334 $\pm$ 0,0342
Tirosina	0 $\pm$ 0	0,0027 $\pm$ 0,0033	0,0050 $\pm$ 0,0022	0,0036 $\pm$ 0,0051
Glicina	0,0142 $\pm$ 0,0247	0,0037 $\pm$ 0,0064	0,0119 $\pm$ 0,0206	0,0029 $\pm$ 0,0051
Asparagina	0,0004 $\pm$ 0,0008	0,0018 $\pm$ 0,0028	0,0100 $\pm$ 0,0173	0,0022 $\pm$ 0,0039
Glutamina	0 $\pm$ 0	0,0020 $\pm$ 0,0034	0,0029 $\pm$ 0,0050	0,0058 $\pm$ 0,0077
Prolina	0,0009 $\pm$ 0,0016	0,0011 $\pm$ 0,0010	0 $\pm$ 0	0,0013 $\pm$ 0,0013
Fenilalanina	0,0002 $\pm$ 0,0004	0,0005 $\pm$ 0,0001	0,0004 $\pm$ 0,0002	0,0043 $\pm$ 0,0069
Histidina	0,0006 $\pm$ 0,0010	0,0003 $\pm$ 0,0005	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Valina	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Hidroxiprolina	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Total	0,0915	0,0396	0,0531	0,0834

Tabela 7 – Concentração em porcentagem média e desvio padrão das porcentagens de aminoácidos encontrados na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no primeiro mês de estudo. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN).

AMINOÁCIDOS (%) MÊS 1				
	C	B	N	BN
Arginina	50,2±21,1	67,6±6,0	62,8±4,0	70,1±2,8
Tirosina	10,0±6,5	11,3±1,3	11,8±10,7	5,1±1,8
Glutamina	7,8±7,3	4,2±5,2	8,7±5,1	8,1±4,8
Aspartato	19,2±12,8	0	2,5±4,4	1,5±2,6
Valina	4,2±7,2	1,9±3,2	4,2±4,4	9,3±4,9
Glicina	0	9,6±2,3	4,3±4,1	0
Asparagina	1,8±2,8	1,6±1,7	3,3±0,3	4,8±3,5
Fenilalanina	4,9±2,6	3,2±3,2	1,3±1,1	0,8±0,3
Histidina	2,0±1,0	0	0	0
Hidroxiprolina	0	0,6±1,0	0,2±0,3	0,1±0,2
Prolina	0	0	0,8±1,0	0,1±0,2

Tabela 8 – Concentração em porcentagem média e desvio padrão das porcentagens de aminoácidos encontrados na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no segundo mês de estudo. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN).

AMINOÁCIDOS (%) MÊS 2				
	C	B	N	BN
Arginina	33,3±40,6	72,3±28,2	37,1±24,0	48,6±35,6
Aspartato	48,7±35,4	4,5±7,7	22,1±35,3	30,1±30,2
Tirosina	0	5,1±5,0	16,3±12,2	4,4±4,4
Glicina	15,6±11,3	5,7±9,9	10,7±18,5	2,7±4,8
Asparagina	0,5±4,9	3,1±4,2	9,0±15,5	2,1±3,6
Glutamina	0	3,0±5,3	2,6±4,5	5,3±7,2
Prolina	1,0±10,2	3,5±4,7	0	2,3±2,3
Fenilalanina	0,2±0,2	1,6±1,0	2,2±2,6	4,5±6,1
Histidina	0,6±6,5	1,2±2,1	0	0
Valina	0	0	0	0
Hidroxiprolina	0	0	0	0

Figura 19. Porcentagem de aminoácidos encontrados na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no primeiro mês de estudo. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN).

Figura 20. Porcentagem de aminoácidos encontrados na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos no segundo mês de estudo. Controle (C); Bactéria (B); Nitrato (N); Bactéria + Nitrato (BN).

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, o estado de interação bactéria e cana-de-açúcar foi abordado pela análise de alguns aspectos fisiológicos determinados exclusivamente na planta.

Dentre os parâmetros de crescimento analisados, biomassa radicular foi a medida que mais sofreu influência com a inoculação de *Acinetobacter* sp. ICB117. Outros trabalhos, utilizando diferentes linhagens bacterianas e espécies vegetais, também relatam maior desenvolvimento da raiz em plantas inoculadas em relação às não inoculadas. Segundo Mantelin e Touraine (2004), os efeitos positivos causados por bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento da planta são sempre correlacionados com notáveis mudanças na morfologia da raiz, aumentando o comprimento de raízes laterais e número de pêlos. No presente trabalho, as plantas inoculadas mostraram aumento considerável de massa seca (g) radicular, assim como relatado por Dobbelaere et al. (2003) em experimentos com inoculação bacteriana em plantas.

As plantas inoculadas tratadas com solução nutritiva na ausência de nitrato (B) apresentaram biomassa radicular elevada em 30,43% (1º mês) e 114,55% (2º mês) ao se comparar com as plantas não inoculadas também tratadas sem nitrato (C). As plantas inoculadas tratadas com solução nutritiva contendo nitrato (BN) apresentaram biomassa radicular elevada em 70,00% (1º mês) e 92,68% (2º mês) em relação às plantas desprovidas de inoculação também tratadas com nitrato (N). Aumento em biomassa também foi verificado por Mantelin et al. (2006) em *Arabidopsis thaliana* inoculada com *Phyllobacterium* sp. Após 6 dias da inoculação, foi observado aumento de 56% e 172% de peso fresco em plantas tratadas com 2 mM e 10 mM de nitrato, respectivamente.

Diversos autores atribuem o aumento no desenvolvimento radicular verificado em plantas inoculadas, ser devido, sobretudo, à liberação de auxinas pelas bactérias (BHATTACHARJEE et al., 2008; DOBBELAERE et al., 2003; MANTELIN e TOURAINÉ, 2004). Carvalho et al. (2010) estudaram a transcrição de reguladores do desenvolvimento da raiz em duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias endofíticas diazotróficas e relataram que tanto os níveis como a distribuição de auxinas nas plantas são modificados durante a associação com as bactérias. Os autores sugerem que a promoção de crescimento da raiz pelas bactérias é pelo menos, em parte, resultado da modulação da via de produção desse hormônio. Não se conseguiu ainda estimar um balanço da quantidade de hormônio que é liberada pela bactéria (no interior da planta) e a quantidade de auxina produzida pela planta por influência da bactéria.

Conhecendo-se a capacidade de *Acinetobacter* sp. ICB117 de liberar AIA *in vitro* (FERRARA, 2010), pode-se sugerir que no presente projeto *Acinetobacter* sp. ICB117 liberou esse fitormônio para as raízes, sendo importante como molécula sinalizadora para estabelecimento do microorganismo no interior dos tecidos vegetais (LAMBRECHT, 2000). O AIA liberado pela bactéria possivelmente foi importante para o aumento de biomassa radicular, mas a presença da bactéria pode também ter estimulado a produção de AIA pela planta. Como mencionado anteriormente no trabalho de Carvalho et al. (2010) essa questão ainda precisa ser mais estudada.

O aumento na superfície da raiz e conseqüente maior abrangência de ambiente explorado, obtidos com a inoculação de *Acinetobacter* sp. ICB117, proporcionou à planta assimilar maior quantidade de nutrientes e ter um melhor desempenho na fixação de CO₂. Chi et al. (2005) em experimentos com inoculação de diferentes linhagens de rizóbios em arroz, também verificaram que a inoculação influenciava a fisiologia do vegetal com aumento na capacidade fotossintética de plantas inoculadas com certas linhagens. Os autores atribuem esse efeito ao fato das plantas inoculadas terem desenvolvido, além de maior volume de raiz, maior biomassa da parte aérea e maior área foliar. O maior desenvolvimento das raízes poderia ter proporcionado maior produção de citocininas porque a raiz é o principal sítio de produção desses fitormônios (PERES e KERBAUY, 2008). As citocininas poderiam ser transportadas até a parte aérea e terem estimulado a atividade da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), aumentando a fixação de CO₂. Suzuki et al. (1994), sugerem que, em milho, as citocininas elevam a transcrição do gene da PEPC específico para o metabolismo C₄. Em trabalho com trigo (metabolismo C₃), González-Santos et al. (2009) verificaram que citocininas aplicadas em folhas podem aumentar a atividade da PEPC durante a senescência.

Seria interessante que o tempo de experimentação do presente estudo tivesse sido prolongado e que as plantas fossem crescidas em um espaço físico que permitisse o desenvolvimento do colmo por completo. Assim, poderia ser realizada uma avaliação adequada do conteúdo de açúcares presentes no colmo. Se a cana-de-açúcar inoculada com *Acinetobacter* sp. ICB117 continuasse a apresentar maior taxa de assimilação de CO₂ ao longo da experimentação, possivelmente seria constatado maior acúmulo de sacarose e açúcares redutores nas plantas inoculadas em relação às não inoculadas. Essa suposição é fundamentada na maior

entrada de carbono via fotossíntese em cana-de-açúcar, levar a um aumento da partição para o colmo que acumula mais sacarose e açúcares redutores (SOUZA, 2007).

Nitrato estimula o crescimento de raízes laterais, contudo, quando presente em altas concentrações verifica-se efeito inibitório desse crescimento (ZHANG; HONGLIN; PILBEAM, 2007). No entanto, Mantelin et al. (2006) observaram que em plantas inoculadas, o sistema de arquitetura de raiz mostrou ser independente do suprimento de nitrato: com o aumento das concentrações de nitrato, não se observou diminuição de raízes laterais nessas plantas. Bactérias promotoras de crescimento estimulam, em geral, a ramificação das raízes e desenvolvimento de pêlos (MANTELIN e TOURAINE, 2004). A concentração de 15 mM de nitrato, utilizada no presente estudo é considerada uma concentração alta (DEAK e MALAMY, 2005), inclusive para cana-de-açúcar (BIGGS, 2003), que poderia inibir o crescimento de raízes laterais e o acúmulo de biomassa radicular. Na presente pesquisa, plantas não inoculadas, tratadas com e sem nitrato (N e C, respectivamente) não apresentaram diferenças significativas em biomassa radicular (Figura 7). Em muitas plantas não inoculadas, tratadas com nitrato (N), foi possível se constatar uma diminuição da biomassa radicular, mas alguns indivíduos submetidos ao referido tratamento apresentaram biomassa elevada e por isso no conjunto de dados, não se encontraram diferenças estatísticas entre os tratamentos controle e nitrato.

Mantelin e Touraine (2004) salientam que, em geral, bactérias promotoras de crescimento vegetal promovem maior crescimento do caule em relação à raiz. O estudo de Mantelin et al. (2006) confirmou essa afirmação. Diferentemente, no presente estudo, não se verificou aumento em biomassa da parte aérea nem em altura das plantas, ocasionado pela inoculação bacteriana. A razão raiz : parte aérea foi maior nas plantas inoculadas com *Acinetobacter* sp. ICB117 (Tabela 3). Contudo, as plantas inoculadas não apresentaram diminuição da biomassa aérea em relação às não inoculadas (Figura 9). Sendo assim, a presença de *Acinetobacter* sp. ICB117 acarretou em um aumento da biomassa total da planta.

Com a inoculação, não se verificou aumento em altura das plantas (Figura 6), porém, no primeiro mês da pesquisa, a presença bacteriana proporcionou um acréscimo do número de folhas (Tabela 1).

Ainda que tenha sido um aumento de uma folha, é um dado interessante porque a presença de maior número de folhas é indicativa de plantas submetidas a condições ideais. Por outro lado, baixos números de folhas são comumente encontrados em plantas de cana-de-açúcar

submetidas a fatores desfavoráveis como déficit hídrico ou baixas temperaturas (RODRIGUES, 1995). Sendo assim, é condição favorável para a planta permanecer com elevado número de folhas se estiver em condições adequadas e por isso sugere-se que uma eventual influência positiva da bactéria no número de folhas seja um benefício à planta.

A análise estatística não mostrou influência bacteriana na atividade da enzima nitrato redutase foliar, no entanto, apesar do alto desvio padrão, o perfil verificado nos dois meses foi o mesmo: as plantas inoculadas com *Acinetobacter* sp. ICB117 e tratadas com nitrato (BN) apresentaram maior atividade da nitrato redutase foliar em relação as plantas não inoculadas também tratadas com nitrato (N) (Figura 11). Esse aumento poderia ser indicativo da presença de *Acinetobacter* sp. ICB117 nas folhas, que também teria atividade da nitrato redutase assimilatória ativa. A atividade da enzima microbiana seria somada à atividade da enzima vegetal. Essa suposição é baseada no estudo de Pariona (2007) que verificou a capacidade de *Acinetobacter* sp. ICB117 em consumir nitrato e no trabalho de Salome et al. (2009) que mediu atividade da nitrato redutase em bactérias utilizando uma metodologia muito semelhante a aplicada no presente estudo para medir atividade da nitrato redutase foliar.

Nitrato inibe a fixação de nitrogênio em cianobactéria e outros organismos (SPRENT e SPRENT, 1990). No entanto, Lucinski, Polcyn e Ratajczak (2002) fazem uma ampla discussão sobre esse tema e indagam a possibilidade do nitrato não inibir a atividade da nitrogenase de bacteróides no interior de nódulos em algumas leguminosas. Os autores enfocam a presença de nitrato redutase dissimilatória nos bacteróides (não citam a enzima assimilatória). A provável presença da nitrato redutase assimilatória em *Acinetobacter* sp. ICB117 leva à questão: se a bactéria é geneticamente capaz de sintetizar a nitrogenase e a nitrato redutase assimilatória, a presença de nitrato no interior dos tecidos vegetais causaria inibição da nitrogenase? Ou os microorganismos estariam estabelecidos principalmente em locais de baixa concentração de nitrato, de modo a não ocorrer inibição da nitrogenase? Essa questão ainda não pode ser respondida.

Contra a proposição de terem sido medidas ambas as atividades da nitrato redutase foliar e da nitrato redutase de *Acinetobacter* sp. ICB117 há o fato de não terem sido isoladas UFC com expressão de fluorescência verde do interior do tecido aéreo. Gonzales (2008) ao inocular essa mesma linhagem bacteriana em plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas variedade SP803280, re-isolou esse microorganismo da parte aérea até 65 dias após a inoculação. Na parte

radicular, re-isolou $9,7 \cdot 10^5$ (30 dias) e $6,1 \cdot 10^5$ (65 dias) UFC de *Acinetobacter* sp. ICB117 (UFC g⁻¹). A maior densidade populacional encontrada no interior dos tecidos vegetais pelo autor em relação à encontrada no presente trabalho (Figura 12) pode ser explicada pelo fato do autor ter usado plantas micropropagadas: *Acinetobacter* sp. ICB117 enfrentou menor competição com outros microorganismos para conseguir colonizar a planta em relação ao presente experimento onde as plantas foram desenvolvidas a partir de toletes (originados de plantas adultas plantadas no campo) e já estavam colonizadas por outros microorganismos. O fato de Gonzales (2008) ter utilizado uma variedade de cana-de-açúcar diferente da utilizada no presente trabalho também deve ser considerado. As bactérias endofíticas podem desenvolver uma associação mais ou menos eficiente, com diferentes tempos de persistência da interação nas diferentes variedades de cana-de-açúcar (CARVALHO et al., 2010; MUÑOZ-ROJAS e CABALLERO-MELLADO, 2003). Para a presente pesquisa optou-se pela utilização da variedade SP791011 justamente por *Acinetobacter* sp. ICB117 ter sido isolada dessa variedade, mas é possível que a referida bactéria consiga se desenvolver melhor no interior dos tecidos de cana-de-açúcar da variedade SP803280. Gonzales (2008) estudou a colonização bacteriana, mas não analisou os efeitos de *Acinetobacter* sp. ICB117 na fisiologia das plantas. Portanto, com o conhecimento adquirido até o presente, não é possível comparar a associação de *Acinetobacter* sp. ICB117 entre essas diferentes variedades. Seria interessante que em estudos futuros, inoculações de *Acinetobacter* sp. ICB117 em diferentes variedades de cana-de-açúcar fossem realizadas, com o acompanhamento da colonização bacteriana e do desenvolvimento fisiológico da planta.

O fato de ter sido encontrado uma menor densidade populacional de *Acinetobacter* sp. ICB117 nas plantas tratadas com nitrato (BN) em relação as tratadas sem nitrato (B) (Figura 12) condiz com relatos na literatura: ao se comparar diferentes concentrações de fertilizantes nitrogenados aplicados à cana-de-açúcar, nas mais altas concentrações, encontra-se um decréscimo da população microbiana diazotrófica. Isso ocorre, provavelmente, pelo estado fisiológico da planta ser alterado pelo nitrogênio e isso subseqüentemente afeta a associação da planta com o microorganismo (BODDEY et al., 2006).

Houve queda na densidade populacional de *Acinetobacter* sp. ICB117 por grama de tecido fresco ao longo do tempo (Figura 12). Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado (2003) inocularam três diferentes linhagens de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em diferentes

variedades de cana-de-açúcar. Também verificaram queda da população bacteriana ao longo do tempo, em todas as experimentações realizadas.

Considerando-se as plantas tratadas sem nitrato (C e B), o fato da inoculação ter ocasionado um aumento de massa seca (Figuras 7 e 10) é favorável à hipótese de que o nitrogênio incorporado na biomassa seria originado do nitrogênio fixado pela bactéria e que haveria maior porcentagem de nitrogênio em B em relação a C. Nas plantas tratadas com nitrato (N e BN), a maior massa seca verificada nas plantas inoculadas (Figuras 7 e 10), também remete à idéia de que haveria maior porcentagem de nitrogênio nas plantas BN. Contudo, nesse caso, o nitrogênio incorporado em biomassa poderia ter sido originado principalmente do nitrato fornecido na solução nutritiva. Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado (2003) encontraram maior porcentagem de nitrogênio e maior biomassa em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com bactéria fixadora de nitrogênio em relação às não inoculadas.

No entanto, o presente estudo mostra que a inoculação ocasionou um aumento em biomassa (Figuras 7 e 10), mas não levou a um aumento da porcentagem de nitrogênio na planta (Figuras 14 e 17).

Mesmo não tendo sido verificado aumento em biomassa aérea (Figura 9), tendo em vista a constatação de a inoculação bacteriana ocasionar um incremento da fixação de gás carbônico (Tabela 4), supôs-se encontrar maior porcentagem de nitrogênio nas folhas das plantas inoculadas em relação às não inoculadas. Essa suposição foi feita porque uma maior assimilação de CO₂ está associada à maior disponibilidade de produção de fonte de carbono, o que pode levar a uma elevação da força de dreno e, portanto, ao aumento do metabolismo e seus componentes. Assim há maior assimilação e uso de elementos minerais como o nitrogênio, e há elevação da produção de substâncias nitrogenadas como enzimas e clorofila. Além disso, Suzuki et al. (1994), sugeriram que o gene da fosfoenolpiruvato carboxilase é regulado tanto no nível de transcrição como na pós-transcrição por disponibilidade de nitrogênio.

Os resultados da porcentagem de nitrogênio na folha foram diferentes do suposto inicialmente: as plantas não inoculadas tratadas com nitrato (N) mostraram maior porcentagem de nitrogênio em relação a todos os outros tratamentos (Figura 17).

O fato de uma planta apresentar maior porcentagem de nitrogênio em relação à outra não significa que esse nitrogênio suplementar tenha função nutricional. Por exemplo, a cana-de-açúcar, assim como outras plantas, é capaz de absorver maior concentração de nitrato em relação

a sua capacidade de assimilação (AIDAR et al., 2003), o que pode levar a um aumento de concentração nos tecidos. Entretanto, esse acúmulo não necessariamente será utilizado posteriormente em função nutricional, mas pode funcionar como soluto osmótico (SMIRNOFF e STEWART, 1985).

É importante notar que as atividades de nitrato redutase observadas devem ser consideradas modestas quando comparadas às plantas especializadas no uso de nitrato foliar (AIDAR et al., 2003).

O valor absoluto de ^{15}N tanto nas raízes quanto nas folhas não sofreu influência significativa pela inoculação bacteriana (Figuras 13 e 16). No entanto, nas raízes, ocorre um pequeno decréscimo do sinal isotópico quando há presença de bactéria no tratamento com nitrato (BN). Essa diminuição pode sugerir ocorrência de fixação biológica do nitrogênio. Isso é decorrente do não fracionamento isotópico pela enzima nitrogenase, e, portanto, o nitrogênio fixado tem sinal isotópico semelhante ao padrão atmosférico. A possível ocorrência de fixação biológica do nitrogênio nas plantas tratadas com nitrato retorna à questão sobre a interação desse composto (ou seus produtos) com a nitrogenase. A presença de nitrato não teria inibido a nitrogenase? ou então os microorganismos inoculados se estabeleceram em regiões de baixas concentrações desse composto?

A contribuição de fixação biológica do nitrogênio da bactéria para a planta poderia ter ocorrido de forma direta por liberação de aminoácidos, poliaminas, AIA (substâncias estas liberadas *in vitro*) (FERRARA, 2010) e/ ou outras fontes nitrogenadas para a planta ou poderia ter sido de forma indireta por morte e mineralização dos microorganismos como sugerem Dobbelaere et al. (2003).

Para estudos futuros é interessante a determinação do valor de ^{15}N do nitrato fornecido na solução nutritiva. Também é importante a realização da análise da abundância natural dos isótopos ^{15}N e ^{14}N em maior número de plantas por tratamento. No presente estudo, por questão de espaço e utilização de grande quantidade de plantas para análises simultâneas, apenas três plantas por tratamento foram avaliadas com relação ao conteúdo de carbono e nitrogênio e abundância natural dos isótopos estáveis.

Na seiva das plantas submetidas aos diferentes tratamentos, não foi encontrado predomínio de asparagina e glutamina, descritos como principais aminoácidos utilizados para transporte na maioria das plantas, inclusive cana-de-açúcar (SODEK, 2008; BIGGS, 2003).

Foi verificado, em todos os tratamentos, grande predomínio de arginina na seiva xilemática das plantas (Figuras 19 e 20). Esse aminoácido contém quatro átomos de nitrogênio em sua molécula (MARZZOCO e TORRES, 2007), dois a mais em relação à asparagina e glutamina. A cana-de-açúcar, assim como muitas plantas, não transporta em grande quantidade aminoácidos com esse elevado número de átomos de nitrogênio no xilema, a não ser quando há mobilização de proteínas de reserva (AIDAR et al., 2003).

Martins, M. C. M. (2007) verificou na seiva xilemática da leguminosa *Hymenaea courbaril*, transporte de nitrogênio oriundo de degradação de proteínas de reserva na forma de arginina. Schmidt e Stewart (1998); Aidar et al. (2003) encontraram em algumas espécies vegetais predominância de arginina na seiva xilemática na época de seca e por isso sugerem que esse aminoácido é transportado como resultado da remobilização de reserva de nitrogênio da planta.

O presente trabalho sugere que esse predomínio de arginina na seiva xilemática seja devido a transporte de nitrogênio oriundo de reserva presente no tolete das plantas de cana-de-açúcar. O nitrogênio da reserva do tolete é fundamental para o desenvolvimento inicial da planta (principalmente no primeiro mês de desenvolvimento), mas, Carneiro; Trivelin; Victoria (1995) afirmam que somente após 5 a 6 meses do plantio, todo nitrogênio exportável do tolete é esgotado. O presente estudo utilizou plantas originadas a partir de tolete, sendo as coletas realizadas no segundo e terceiro mês do plantio, período este em que as plantas ainda poderiam estar utilizando nitrogênio da reserva.

No trabalho de Subasinghe (2007), não há relato de glutamina e asparagina como principais aminoácidos na seiva xilemática de duas variedades de cana-de-açúcar, mas sim outros aminoácidos, dentre eles está a arginina, porém não em maior porcentagem. Na referida pesquisa, a coleta da seiva foi realizada aos 4 meses de idade da planta e no início da experimentação o autor procurou diminuir o tamanho do tolete, para diminuir a reserva de nutrientes. Talvez essa arginina encontrada possa ser originada de reservas remanescentes do tolete.

Durante o desenvolvimento da plântula, a queda da reserva nitrogenada ocorre mais rapidamente no nó em relação ao internó. O conteúdo do nitrogênio do internó decresce gradualmente e o nitrogênio liberado é translocado para tecidos jovens (VAN DILLEWIJN, 1952). As plantas utilizadas no presente estudo não desenvolveram o colmo por completo, podendo ser a arginina encontrada na seiva xilemática originada também da reserva nitrogenada

dos tecidos do colmo em desenvolvimento. Mais estudos sobre a proteômica da cana-de-açúcar são necessários, especialmente dos tecidos do colmo. Almaraj, et al. (2010) avaliaram alguns métodos de extração de proteínas do colmo de cana-de-açúcar e não conseguiram identificar aproximadamente 17% das proteínas. Essas proteínas não identificadas ou uma porcentagem delas podem ser de reserva do colmo.

Na pesquisa de proteínas de reserva de cana-de-açúcar extraída de sementes, células embriogênicas e calos, Blanco et al. (1999) encontraram principalmente albuminas e globulinas e menor porcentagem de prolaminas e glutelinas. Essas duas últimas proteínas são encontradas normalmente em altos níveis nas monocotiledôneas e por isso os autores mencionados concluíram que a cana-de-açúcar é uma exceção dentro das monocotiledôneas com relação ao acúmulo de proteínas de reserva. A importância da presença de proteínas de reserva no referido trabalho reside no fato de que albumina e globulina também poderiam estar presentes no tolete. O nitrogênio dessas reservas protéicas seria mobilizado na forma de arginina.

No 2º mês de coleta, nas plantas tratadas com nitrato, verificou-se um decréscimo no conteúdo de arginina e um aumento de aspartato (Figuras 19 e 20). Esse evento é mais uma indicação de que a alta concentração de arginina na seiva é originada de reserva protéica e que essa reserva estava sendo gradualmente esgotada, e a planta passou a transportar maior quantidade de nitrogênio originado do nitrato adquirido da solução nutritiva (a partir do 2º mês).

Biggs (2000), encontrou predomínio de asparagina na seiva xilemática de plantas cultivadas “*in vitro*” com 49 dias de cultura e em plantas crescidas em campo com 2 anos. As plantas cultivadas “*in vitro*” não dispunham, portanto, de reserva do tolete e as plantas crescidas em campo, aos dois anos de idade já haviam provavelmente esgotado todas as reservas do tolete. Esses dados reforçam a sugestão do presente trabalho de que a arginina encontrada na seiva das plantas principalmente deve ter sido originada de reserva do tolete em comparação a reserva do colmo em desenvolvimento.

A presença de alantoína não foi verificada nem na seiva apoplástica (TEJERA et al., 2006), nem na seiva xilemática (presente trabalho) da cana-de-açúcar.

Assim como muitas leguminosas tropicais, somente quando noduladas passam a transportar alantoína e outros ureídeos (SCHUBERT, 1986), objetivou-se verificar se a presença de *Acinetobacter* sp. ICB117 influenciaria o transporte de nitrogênio da planta. No entanto, não foi possível averiguar a influência de nenhum tratamento no transporte de nitrogênio realizado

pela cana-de-açúcar, provavelmente por ter sido utilizado para o presente estudo plantas desenvolvidas a partir de tolete até os 3 meses de idade. Para pesquisas futuras, seria interessante realizar um estudo comparativo com plantas, de maior idade, desenvolvidas a partir de tolete e também com a utilização de plantas micropropagadas.

A possibilidade das plantas de utilizar nitrogênio originado de reserva do tolete dificultou também a análise da possível transferência de nitrogênio oriundo de fixação biológica para a cana-de-açúcar. Não foi possível esclarecer se os efeitos benéficos verificados nas plantas foram sobretudo relacionados à liberação e regulação de fitormônios pela bactéria na planta ou se também a transferência de nitrogênio fixado foi importante. Sendo assim não foi possível comprovar nem negar a primeira hipótese inicial descrita nesse trabalho. Apesar disso, como discutido anteriormente, os resultados de abundância natural de ^{15}N das raízes sugerem a possibilidade de ocorrência de fixação biológica do nitrogênio no interior dos tecidos vegetais nas plantas inoculadas com *Acinetobacter* sp. ICB117 tratadas com nitrato (BN). Apesar de não serem dados conclusivos, esses resultados indicam ser interessante a continuidade na pesquisa da possível transferência de nitrogênio originado de fixação biológica para planta.

Embora não tenham sido esclarecidas ainda questões importantes, os resultados obtidos comprovam a segunda hipótese proposta pelo presente trabalho: a inoculação de *Acinetobacter* sp. ICB117 na cana-de-açúcar promoveu crescimento do vegetal, com aumento de biomassa radicular e desempenho fotossintético. Sendo assim, essa bactéria é digna de receber atenção, com possibilidades de, em estudos futuros, serem obtidos mais resultados que a caracterizem como potencial promotora de crescimento vegetal. As plantas inoculadas que receberam nitrato (BN) foram as que tiveram melhor desenvolvimento evidenciando que a bactéria, por si só, não é capaz de suprir nitrogênio suficiente para a planta havendo a necessidade de adição de fertilizantes nitrogenados a cultura de cana-de-açúcar. O nitrato, em concentração adequada é um fertilizante apropriado para cana-de-açúcar. Essa cultura apresenta maior taxa de crescimento quando submetida à fertilização com nitrato em relação à utilização de uréia (TISHCHENKO² et al., apud BIGGS, 2003), que é amplamente empregada em canaviais. A utilização de inoculantes bacterianos promotores de crescimento em conjunto com o nitrato é uma possível forma de elevação da produtividade da cultura canavieira.

²TISHCHENKO, N. N. et al. Effect of nitrate and ammonium forms of nitrogen fertilisers on sugarcane photosynthesis and growth parameters. 1991.

6 CONCLUSÕES

- O microorganismo *Acinetobacter* sp. ICB117 foi capaz de recolonizar o interior da raiz de cana-de-açúcar variedade SP791011 tanto na presença quanto ausência de nitrato. No entanto, a presença de nitrato acarretou um decréscimo na densidade populacional de *Acinetobacter* sp. ICB117. Com o passar do tempo, a população da referida bactéria diminuiu em ambos os tratamentos.
- A atividade da nitrato redutase foliar foi alterada significativamente com a presença de nitrato na solução nutritiva. A inoculação de *Acinetobacter* sp. ICB117 não ocasionou alteração significativa da atividade da nitrato redutase foliar.
- *Acinetobacter* sp. ICB117 incrementou a assimilação líquida máxima de CO₂ pelas plantas, assim como o nitrato ocasionou o mesmo efeito. A respiração não foi alterada significativamente pela presença do microorganismo inoculado assim como o nitrato não interferiu nesse parâmetro analisado.
- A inoculação ocasionou um aumento da biomassa radicular. No entanto, a altura das plantas e a biomassa aérea não foram influenciadas pela inoculação bacteriana. Nitrato ocasionou incremento de massa seca da parte aérea somente no 2º mês de experimentação.
- O número de folhas (1º mês de estudo) foi influenciado pela presença de *Acinetobacter* sp. ICB117 assim como pela presença de nitrato.
- Nenhum dos tratamentos interferiu na composição de aminoácidos na seiva xilemática. O predomínio de arginina até os três meses de idade da cana-de-açúcar pode ser atribuído ao nitrogênio oriundo de reserva protéica do tolete.
- Na raiz, apesar de pequeno, o decréscimo do sinal isotópico quando há presença de bactéria no tratamento com nitrato é uma indicação de presença de nitrogênio oriundo de fixação biológica.

- O fato das plantas tratadas com nitrato terem apresentado uma menor razão C:N, não significa que esses indivíduos estavam utilizando mais eficientemente o nitrogênio.
- A inoculação de *Acinetobacter* sp. ICB117 proporcionou benefícios à cana-de-açúcar: aumento das raízes, da assimilação de CO₂ e do número de folhas. Contudo, a questão sobre possível ocorrência de fixação de nitrogênio pelo microrganismo no interior dos tecidos vegetais não pôde ser respondida.
- As plantas que melhor se desenvolveram foram inoculadas e receberam nitrato em sua solução nutritiva.

REFERÊNCIAS*

AIDAR, M. P. M. et al. Nitrogen use strategies of neotropical rainforest trees in threatened Atlantic Forest. **Plant, Cell and Environment**, v. 26, p. 389-399, 2003.

AMALRAJ, R. S. et al. Sugarcane proteomics: Establishment of a protein extraction method for 2-DE in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map. **Electrophoresis**, v. 31, p. 1959-1974, 2010.

ARAÚJO, W. L. et al. Diversity of endophytic bacterial population and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

AUSUBEL, F. M. et al. **Short protocols in molecular biology**. 3rd ed. New York, NY: Wiley, 1995. 900 p.

AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

BALDANI, J. I. et al. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 29, p. 417-423, 2002.

BHATTACHARJEE, R. B. et al. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 80, p. 199-209, 2008.

BIGGS, I. M. **An investigation of sugarcane nitrogen physiology: sources, uptake and metabolism**. 2003. 139 p. Ph. D. thesis (Philosophy) - School of life Sciences, The University of Queensland, Brisbane, Australia, 2003.

BIRUR, D. K. et al. Impact of biofuel production on world agricultural markets: a computable general equilibrium analysis. **Global Trade Analysis Project Working Paper**, n. 53, p. 1-63, 2008.

BLANCO, M. A. et al. Storage proteins in sugarcane: An interesting exception in monocots. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 59, p. 217-218, 1999.

* **De acordo com:** ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BODDEY, R. M. et al. Biological Nitrogen Fixation in Agroecosystems and in Plant Roots. In: UPHOFF, N. **Biological Approaches to Sustainable Soil Systems**. [Florida]: CRC Press, 2006. p. 177-189.

BRUIJN, J. M.; BOUT, M. HPAEC Analysis of amino acids in sugar beet samples: Method development and application. **Zuckerindustrie**, v. 125. p. 604–609, 2000. Presented In: Symposium of Association Andrew van Hook for the advancement of knowledge on sugars, 7., 2000, Reims, FR.

CALSA JR., T.; FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C₄ metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, v. 63, p. 745–762, 2007.

CANUTO, E. L. et al. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 67-72, 2003.

CARNEIRO, A. E. V; TRIVELIN, P. C. O.; VICTORIA, R. L. Utilização da reserva orgânica e de nitrogênio do tolete de plantio (colmo semente) no desenvolvimento da cana-planta. **Scientia Agricola**, v. 52, n. 2, p. 199-209, 2005.

CARVALHO, T. L. G. et al. Auxin Signaling in Sugarcane Root Development Promoted by Endophytic Diazotrophic Bacteria. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION WITH NON – LEGUMES, 12., 2010. Búzios, RJ, Brazil. **Book of Abstracts**. Rio de Janeiro, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2010. p. 54, abs SIV.15.

CHI, F. et al. 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, 2005.

CRAWFORD, N. M.; GLASS, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, v. 3, n. 10, p. 389-395, 1998.

CROFT, B. J. et al. RSD diagnosis and varietal resistance screening in sugarcane using the EB-EIA technique. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology**, v. 16. p. 143-151, 1994.

DEAK, K. I.; MALAMY, J. Osmotic regulation of root system architecture. **The Plant Journal**, v. 43, p. 17–28, 2005.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 621-631, 2004.

DOBBELAERE, S. et al. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J. et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa, 1995. 60 p.

DONATO, V. M. T. S. et al. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 39, n. 11, p. 1087-1093, 2004.

EMBRAPA. **Embrapa e UFPR desenvolvem primeiro inoculante para milho e trigo**. Imprensa, notícias, agosto de 2009a. Disponível em: <www.embrapa.br>. Acesso em: 8 out. 2009.

EMBRAPA. **Tecnologia da Embrapa vira produto para cana-de-açúcar**. Imprensa, notícias, março de 2009b. Disponível em: <www.embrapa.br>. Acesso em: 8 out. 2009.

EMBRAPA AGROBIOLOGIA. **Empresas vão começar a produzir inoculante para cana-de-açúcar**. 2008. Disponível em: <www.cnpab.embrapa.br>. Acesso em: 8 out. 2009.

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.

GONZALES, H. H. S. **Caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio endofíticas isoladas de *Saccharum* sp. (cana de açúcar) cultivadas sob adubação orgânica ou fertilizante nitrogenado ou sem adubação**. 2008. 145 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GONZÁLEZ-SANTOS, R. et al. Cytokinin bap promotes the accumulation of hexoses and increases the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase during the delay of leaf senescence in wheat. **Agrociencia**, v. 43, p. 379-391, 2009.

HALLMANN, J. et al. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HARDOIM, P. R et al. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n.10, p. 463-471, 2008.

HOTTA, C. T. et al. The Biotechnology Roadmap for Sugarcane Improvement. **Tropical Plant Biology**, v. 3, p-75-87, 2010.

HUANG, J. Ultrastructure of bacterial penetration in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 24, p. 141-157, 1986.

JANK, M. S. **Etanol Reagindo ao tiroteio global**. Unica. abr. 2008. Disponível em: <www.unica.com.br> Acesso em: 8 out. 2009.

LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria- plant interactions. **Trends In Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 298-300, 2000.

LEPINIEC, L. et al. Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. **Plant Science**, v. 99, p. 111-124, 1994.

LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ^{15}N aided nitrogen balance. **Soil Biology Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 165-170, 1987.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.

LOIRET, F. G. et al. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 504-511, 2004.

LUCINSKI, R.; POLCYN, W.; RATAJCZAK, L. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium* – legumes. **Acta Biochimica Polonica**, v. 49, n. 2, p. 537-546, 2002.

MACEDO, F. L. **Estimativa da fixação de N₂ através da composição da seiva do xilema e técnicas de diluição de ¹⁵N em *Anadenanthera falcata* (Benth.) Speg. (Leguminosae – Mimosoideae).** 2010. 57 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, 2010.

MAGNANI, G. S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar.** 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MAJEROWICZ, N. Fotossíntese. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 82-133.

MALAVOLTA, E.; HAAG, H. P. Fisiologia. In: MALAVOLTA, E. et al. **Cultura e adubação da cana-de-açúcar.** São Paulo: Instituto Brasileiro de Potassa, 1964. p. 221-236.

MANTELIN, S.; TOURAINE, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 394, p. 27-34, 2004.

MANTELIN, S. et al. Nitrate-dependent control of root architecture and N nutrition are altered by a plant growth-promoting *Phyllobacterium* sp. **Planta**, v. 223, p. 591-603, 2006.

MARTINS, M. C. M. **Ecofisiologia do uso de reservas de carbono e nitrogênio ao longo do ciclo de vida de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Heyne) Lee & Lang. (Leguminosae, Caesalpinioideae).** 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, 2007.

MARTINS, R. C. R. **Associações *in vitro* de bactérias endofíticas diazotróficas com células de cana-de-açúcar.** 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 386 p.

MUÑOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and its Effect on Plant Growth. **Microbial Ecology**, v. 46, 454-464, 2003.

NÄSHOLM, T. et al. Uptake of organic nitrogen by plants. **New Phytologist**, v. 182, p. 31-48, 2009.

ORSEL, M. et al. Nitrate transport in plants: which gene and which control? **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 825-833, 2002.

PARIONA, R. L. **Isolamento de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio de cana-de-açúcar submetida a adubação orgânica ou fertilizada com N-mineral ou sem adubação: comparação quantitativa e da presença de atividade nitrato redutase assimilatória**. 2007. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PAULA, M. O. et al. Potencial da cinza do bagaço da cana-de-açúcar como material de substituição parcial de cimento Portland. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 353-357, 2009.

PAUNGFOO-LONHIENNE, C. et al. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 11, p. 4524–4529, 2008.

PEREIRA, W. et al. Agronomic efficiency of the sugarcane inoculants. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION WITH NON – LEGUMES, 12., 2010. Búzios, Rio de Janeiro, Brazil. **Book of Abstracts**. Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 2010. p. 70, abs SV.23.

PERES, L. E. P. e KERBAUY, G. B. Citocininas. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 212-234.

POSTGATE, J. **Nitrogen Fixation**. 3rd ed. Cambridge: University Press, 1998. 112 p.

RAINEY, F. A.; LANG, E.; STACKEBRANDT, E. The phylogenetic structure of the genus *Acinetobacter*. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 124, p. 349-353, 1994.

RODRIGUES, J. D. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1995. Disponível em: <www.malavolta.com.br/pdf/1071.pdf> Acesso em: 20 out. 2010.

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters**, v. 278, p. 1-9, 2008.

SACHDEV, D. et al. Assessment of 16S rRNA gene-based phylogenetic diversity and promising plant growth-promoting traits of Acinetobacter community from the rhizosphere of wheat. **Microbiological Research**, v. 165, n. 8, p. 627-638, 2010.

SAGE, R. F. The evolution of C₄ photosynthesis. **New Phytologist**, v. 161, p. 341-370, 2004.

SALOME, J. et al. Electrochemical assay of the nitrate and nitrite reductase activities of Rhizobium japonicum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, p. 3487-3491, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL D. W. **Molecular Cloning**. A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHMIDT, S.; STEWART, G. R. Transport, storage and mobilization of nitrogen by trees and shrubs in the wet/dry tropics of northern Australia. **Tree Physiology**, v. 18, p. 403-410, 1998.

SCHUBERT, K. R. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, Transport and Metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 37, p. 539-574, 1986.

SCHULTZ, N. et al. Productivity of sugar cane inoculated with diazotrophs in two experiments conducted in Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro State. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION WITH NON – LEGUMES, 12., 2010, Búzios, Rio de Janeiro, Brazil. **Book of Abstracts...** Rio de Janeiro, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2010. p. 72, abs SV.27.

SEGATO, S. V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: CP 2, 2006, 415 p.

SMIRNOFF, N., STEWART, G. R. Nitrate assimilation and translocation by higher plants: Comparative physiology and ecological consequences. **Physiologia Plantarum**, v. 64, p. 133-140, 1985.

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

SOUZA, A. P. **A cana-de-açúcar e as mudanças climáticas: efeito de uma atmosfera enriquecida em CO₂ sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de carboidratos de *Sacharrum* ssp.** 2007. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

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

SPRENT, J. I.; SPRENT, P. **Nitrogen Fixing Organisms: pure and applied aspects.** Cambridge: Cambridge University Press, 1990. 256 p.

STEWART, G. R. et al. Localization of nitrate reduction in ferns and its relationship to environment and physiological characteristics. **New Phytologist**, v. 104, p. 373-384, 1986.

STURZ, A. V. et al. Bacterial Endophytes: Potential Role in Developing Sustainable Systems of Crop Production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 19, n. 1, p. 1-30, 2000.

SUBASINGHE, R. Effect of External Nitrogen and Potassium Supply on Xylem Sap Composition of Sugarcane. **Journal of Plant Nutrition**, v. 30, p. 187-201, 2007.

SUZUKI, I. et al. Transcriptional and Posttranscriptional Regulation of Nitrogen-Responding Expression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Gene in Maize. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1223-1229, 1994.

TEJERA, N., et al. Nitrogen compounds in the apoplastic sap of sugarcane stem: Some implications in the association with endophytes. **Journal of Plant Physiology**, v. 163, p. 80-85, 2006.

THOMAS, R. J.; SCHRADER, L. E. Ureide metabolism in higher plants. **Phytochemistry**, v. 20, p. 361-371, 1981.

THULER, D. S. et al. Plant growth regulators and amino acids released by *Azospirillum* sp. in chemically defined media. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 174-178, 2003.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A. et al. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v. 11, p. 296-310, 2008.

VAN DILLEWIJN, C. **Botany of sugarcane**. Massachusetts, USA: Waltham - The Chronica Botanica, 1952. 371 p.

VELÁZQUEZ, E. et al. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 118-124, 2008.

ZHANG, H; HONGLIN, R.; PILBEAM, D. Signalling mechanisms underlying the morphological responses of the root system to nitrogen in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**. v. 58, n. 9, p. 2329-2338, 2007.

ANEXO A – Composições das soluções com nutrientes

ANEXO A.1 - Composição Meio de cultura microorganismo

a) Meio NFb

Ácido málico-----	5 g
K ₂ HPO ₄ -----	0,5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O-----	0,2 g
NaCl-----	0,1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O-----	0,02 g
Solução de Micronutrientes-----	2 mL
FeEDTA-----	4 mL
Solução de Vitaminas-----	1 mL
KOH-----	4,5 g
Água destilada-----	QSP 1000mL

pH é ajustado para 6,5-6,8.

Solução de Micronutrientes

CuSO ₄ ·5H ₂ O-----	0,04 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O-----	1,20 g
H ₃ BO ₃ -----	1,40 g
Na ₂ MoO ₄ -----	1,0 g
MnSO ₄ ·H ₂ O-----	1,175 g
Água destilada-----	QSP 1000 mL

Solução de FeEDTA

FeEDTA-----	16,4 g
Água destilada-----	QSP 1000 mL

Solução de vitaminas

Biotina-----	10 mg
Piridoxol-HCl-----	20 mg
Água destilada-----	QSP 1000 mL

b) Composição Meio Luria-Bertani (LB)

Triptona-----	10 g
Extrato de Levedura-----	5 g
NaCl-----	5 g
Água destilada-----	QSP 1000 mL
Para meio sólido: 15 g de ágar eram adicionados (1 L).	

*ANEXO A.2 - Composição solução nutritiva plantas***a) Solução de Hoagland com fonte de nitrogênio (NO_3^- a 15 mM)**

K_2HPO_4 -----	1 mL
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -----	5 mL
MgSO_4 -----	2 mL
KNO_3 -----	5 mL
Micronutrientes-----	5 mL
FeEDTA-----	10 mL
Água destilada-----	QSP1000 mL

Todas as soluções estoque se encontravam a 1 M, exceto a de Micronutrientes e FeEDTA, como descrito abaixo:

Micronutrientes

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (316 mM)-----	0,079 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (275 mM)-----	0,212 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (11 mM)-----	1,81 g

H_3BO_3 (43 mM)-----	2,84 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,05 mM)-----	0,013 g
Água destilada-----	QSP 1000 mL

FeEDTA

Na_2EDTA -----	3,72 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----	2,78 g
Água destilada-----	QSP 1000 mL

b) Solução nutritiva sem fonte de nitrogênio

Utilizaram-se os mesmos componentes (com as mesmas concentrações) empregados na solução com fonte de nitrogênio, substituindo-se somente $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e KNO_3 por $\text{Ca}(\text{Cl})_2$ e KCl , respectivamente.