SIMONE ICHIWAKI

Efeitos da inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 sobre o crescimento e acúmulo de nitrogênio em plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) submetidas a fertilização orgânica e convencional

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

São Paulo
2012

SIMONE ICHIWAKI

Efeitos da inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 sobre o crescimento e acúmulo de nitrogênio em plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) submetidas a fertilização orgânica e convencional

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: Prof^a. Dr^a. Heloiza Ramos Barbosa

Versão original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Ichiwaki, Simone.

Efeitos da inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 sobre o crescimento e conteúdo de nitrogênio em plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) submetidas a fertilização orgânica e convencional / Simone Ichiwaki. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. 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: Interações entre bactérias diazotróficas e plantas.

Versão do título para o inglês: Effects of the inoculation of *Enterobacter* sp. ICB481 on the growth and nitrogen content of sugarcane plantlets submitted to organic and conventional fertilization.

1. Bactéria endofítica 2. Bactéria diazotrófica 3. Cana-de-açúcar 4. Inoculação I. Barbosa, Profa. Dra. Heloiza Ramos II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB091/2012

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

Candidato(a): Simone Ichiwaki.

Título da Dissertação: Efeitos da inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 sobre o crescimento e conteúdo de nitrogênio em plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) submetidas a fertilização orgânica e convencional.

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

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

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

*À minha família e amigos que nunca
deixaram de me apoiar e acreditar em
meu potencial.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Masashi Ichiwaki e Marilene Monteiro Ichiwaki, por todos os anos de dedicação, apoio e carinho. Ao meu irmão André Monteiro Ichiwaki, pelo incentivo e por me confortar em muitos momentos de ansiedade.

Agradeço à minha orientadora, Heloiza Ramos Barbosa, pelos ensinamentos, pela amizade e por me acolher em seu laboratório.

A Felipe Ibañez por todo o amor e compreensão! Obrigada por me ajudar, especialmente quando há números envolvidos na questão!

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Adriana Macedo, sempre animada e paciente para me ouvir durante horas; Felipe Pommorsky, que sempre traz novidades e histórias divertidas; Lina Rada, que me ajudou imensamente em muitos momentos; Mariana Brolezzi, que sempre consegue me fazer sorrir, mesmo nos dias mais tristes; Roberta Martins, por ser tão companheira; e Leonor, por toda ajuda e pelo cafezinho de todas as tardes!

Um agradecimento especial para Íris Takako, minha tia postiça, que sempre me ajudou não só no laboratório, mas com preciosos conselhos e muito carinho! :)

Aos meus amigos Guilherme, Thomas, Emily, Thiago, Otranto, Flávia, Alexandre, Renato e Pablo por sempre levantarem meu ânimo e colocarem um sorriso no meu rosto.

Agradeço aos professores Marcos Buckeridge, Eny Iochevet Segal Floh, Marcos Aidar, Maria Luiza Salatino e Regina Baldini pelo apoio com equipamentos, metodologias e boas idéias.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira e sua equipe, em especial Sabrina Moutinho e Maria Cristina Falco, por fornecerem as plântulas utilizadas neste trabalho.

A todos àqueles que de alguma forma colaboraram com este trabalho.

À CAPES pelo financiamento

Muito Obrigada!

RESUMO

ICHIWAKI. S. **Efeitos da inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 sobre o crescimento e acúmulo protéico em plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) submetidas a fertilização orgânica e convencional.** 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A cana-de-açúcar possui grande importância na economia brasileira por ser matéria prima para produtos como o açúcar e o álcool. A maior parte dos cultivares ainda utiliza a adubação convencional e, por isso, existe a preocupação em se obter um sistema menos prejudicial ao ambiente. Alternativas são o adubo orgânico e o emprego bactérias endofíticas diazotróficas. O gênero *Enterobacter* possui representantes diazotróficos e promotores de crescimento vegetal. O objetivo deste trabalho foi analisar a interação de *Enterobacter* sp. ICB481 com plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas adubadas orgânica e convencionalmente. As plântulas utilizadas foram divididas três grupos não inoculados: orgânico, convencional, sem adubação; e três inoculados: *Enterobacter*-orgânica, *Enterobacter*-convencional e *Enterobacter*-sem adubação. Foram avaliados: comprimentos foliar, volume radicular, massas fresca e seca de folha e raiz, concentrações de nitrato, amônio, aminoácidos, proteínas e açúcares solúveis. As plantas foram mantidas em casa de vegetação com fotoperíodo controlado por dois meses. Após 60 dias, verificou-se que os fertilizantes orgânico e convencional atuaram de forma semelhante em quase todos os parâmetros de crescimento e no teor de clorofila, tanto nos grupos inoculados como não inoculados. A exceção foi massa fresca radicular, onde o tratamento orgânico promoveu maior incremento. Não houve diferenças de comprimento foliar, massa fresca foliar, massa seca foliar e radicular entre os grupos orgânicos e convencionais (com e sem bactéria). A inoculação de *Enterobacter* promoveu maior volume e massa fresca radicular nos grupos orgânico e convencional. A inoculação no grupo sem adubação promoveu aumento em todos os parâmetros de crescimento e clorofila total quando comparados aos grupos não inoculados. As medidas de nitrato, aminoácidos e proteínas totais livres, sugerem a influência de *Enterobacter* sp. ICB481 no perfil de assimilação de nitrogênio. As concentrações de amônio livre apresentaram-se abaixo do limite de detecção. Nos três grupos inoculados não houve diferença entre os conteúdos protéicos. Os grupos convencionais, inoculado e não inoculado, não diferiram entre si. O grupos inoculados orgânico e sem adubação apresentaram maior conteúdo protéico em relação aos mesmos não inoculados. O teste de colonização comprovou que *Enterobacter* sp. ICB481 ao final de 60 dias ainda estavam presentes nos tecidos radiculares, em população de 10^5 UFC.g⁻¹ de planta nos três grupos inoculados. Os resultados obtidos demonstram efeitos benéficos, tanto no aumento do crescimento vegetal quanto no incremento de protéico em plântulas de cana inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 especialmente em condições de carência de nitrogênio combinado.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. *Enterobacter*. Fixação biológica de nitrogênio. Promoção de crescimento vegetal.

ABSTRACT

ICHIWAKI. S. Effects of the inoculation of *Enterobacter* sp. ICB481 on the growth and nitrogen content of sugarcane (*Saccharum* sp.) plantlets submitted to organic and conventional fertilization. 2012. 85 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Sugarcane has great importance in the Brazilian economy because it is raw material for products such as sugar and alcohol. Most cultivars use conventional fertilization and therefore there is a concern in developing alternatives less aggressive to the environment. Alternatives are the organic fertilization and employment diazotrophic endophytic bacteria. The genus *Enterobacter* has diazotrophic and plant growth promoters representatives. The objective of this study was to analyze the interaction of *Enterobacter* sp. ICB481 with seedlings of micropropagated sugarcane submitted to organic and conventional fertilization. The seedlings used were divided into three inoculated and three non-inoculated groups: organic, conventional, no fertilization. The parameters evaluated were: leaf length, root volume, fresh and dried leaf and root matters and concentrations of nitrate, ammonium, amino acids, proteins and soluble sugars. The plants were kept in a greenhouse with a photoperiod controlled by two months. After 60 days, it was found that the organic and conventional fertilizers influenced similarly almost all growth parameters and the chlorophyll concentration in both, the inoculated and uninoculated groups. The exception was fresh mass, where the organic treatments promoted greater increase of biomass. There were no differences between organic and conventional groups (with and without bacteria) in the following parameters: leaf length, fresh leaf matter, root and leaf dry matter. The inoculation of *Enterobacter* promoted increase root volume and fresh mass in organic and conventional groups. Inoculation of the group without fertilization promoted increases in all growth parameters and chlorophyll content as compared to non-inoculated groups. The measurements of nitrate, free amino acids and total proteins content, show the influence of *Enterobacter* sp. ICB481 the profile of nitrogen content. The concentrations of free ammonium measured were below the detection limit. The protein content of the three inoculated groups did not differ. The conventional groups, inoculated and uninoculated, were not significantly different. The inoculated groups treated with organic fertilization and not fertilized showed higher protein content compared to the same non-inoculated. The test showed that colonization *Enterobacter* sp. ICB481 at 60 days were still present in root tissue and the population was 10^5 CFU g⁻¹ in the three inoculated groups. The results show beneficial effects promoting plant growth by increasing several growth parameters when as seedlings were inoculated with sugarcane *Enterobacter* sp. ICB481, particularly under conditions of deficiency of combined nitrogen.

Keywords: Sugarcane. *Enterobacter*. Biological nitrogen fixation. Plant growth promotion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema representativo da assimilação de amônio pelo sistema enzimático GS/GOGAT.....	20
Figura 2 - Mapa do plasmídeo pWM1007 gerado pelo aplicativo PlasMapper	29
Figura 3 - Médias de comprimento foliar de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação.	41
Figura 4 - Diferença entre os comprimentos foliares de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e plântula do grupo sem adubação 60 DPI.	42
Figura 5 - Comparação entre comprimentos foliares de plântulas não inoculadas e inoculadas 60 DPI	43
Figura 6 - Médias do volume radicular em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	43
Figura 7 - Médias de massa fresca foliar em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	44
Figura 8 - Médias de massa fresca radicular em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	45
Figura 9 - Médias de massa seca foliar em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	46
Figura 10. Médias de massa seca radicular em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	47
Figura 11 - Médias de teor relativo de clorofila total (SPAD) em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	48
Figura 12 - Diferença na pigmentação foliar em plântulas não inoculadas.	49

Figura 13 - Ausência de amarelecimento foliar nos grupos inoculados com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 60 DPI.	49
Figura 14 - Médias de concentração de nitrato livre foliar em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	50
Figura 15 - Médias de concentração de nitrato livre radicular em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	51
Figura 16 - Médias de concentração de aminoácidos totais livres foliares em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	52
Figura 17 - Médias de concentração de aminoácidos totais livres radiculares em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	53
Figura 18 - Médias de conteúdo protéico total em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	54
Figura 19 - Médias de carboidratos solúveis foliares em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	55
Figura 20 - Médias de carboidratos solúveis radiculares em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.	57

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Grupos de tratamento formados de acordo com o fertilizante aplicado e a presença ou ausência de <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 inoculada	34
Quadro 2 - Quantificação de <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 marcada (UFC.g ⁻¹ de planta) em plântulas submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação ao longo de 5, 30 e 60 DPI.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIA – Ácido indol-3-acético

ARA – Ensaio de redução de acetileno

C – Grupo convencional não inoculado

DO – Densidade óptica

DPI – Dias pós inoculação

EC – Grupo convencional inoculado com *Enterobacter* sp.

EO – Grupo orgânico inoculado com *Enterobacter* sp.

ES – Grupo sem adubação inoculado com *Enterobacter* sp.

FBN – Fixação biológica de nitrogênio

GOGAT – Glutamato sintase

GS – Glutamina sintetase

HPLC - Cromatografia líquida de alto desempenho

NR – Nitrato redutase

NiR – Nitrito redutase

O – Grupo orgânico não inoculado

Rubisco - Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase

S – Grupo sem adubação não inoculado

UFC – Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
<i>1.1 Cana-de-açúcar</i>	16
<i>1.2 A importância da cana-de-açúcar na economia brasileira</i>	16
<i>1.3 Fertilizações convencional e orgânica</i>	17
<i>1.4 Metabolismo do nitrogênio</i>	18
<i>1.5 Bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio</i>	21
<i>1.6 O gênero Enterobacter</i>	23
<i>1.7 Plântulas micropropagadas</i>	24
<i>1.7.1 Variedade de cana-de-açúcar SP79-1011</i>	25
<i>1.8 Justificativa</i>	25
<i>1.9 Hipóteses iniciais</i>	26
2. OBJETIVOS	27
<i>2.1 Objetivo geral</i>	27
<i>2.2 Objetivos específicos</i>	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
<i>3.1 Material</i>	28
<i>3.1.1 Material biológico</i>	28
<i>3.1.2 Meios de cultura</i>	28
<i>3.1.3 Plasmídeo fluorescente</i>	28
<i>3.2 Métodos</i>	29
<i>3.2.1 Transformação de Enterobacter sp. ICB481</i>	29
<i><u>3.2.1.1 Extração de DNA plasmideal</u></i>	29
<i><u>3.2.1.2 Eletrocompetência</u></i>	30
<i><u>3.2.1.3 Eletroporação</u></i>	30
<i>3.2.2 Cultivo das plântulas e montagem de experimentos</i>	31
<i><u>3.2.2.1 Aclimação das plântulas de cana-de-açúcar em casa de vegetação</u></i>	31
<i><u>3.2.2.2 Padronização do manejo das plântulas: experimento piloto</u></i>	31
<i><u>3.2.2.3 Experimentos: montagem do grupo não inoculado</u></i>	32
<i><u>3.2.2.4 Montagem dos grupos Enterobacter sp.</u></i>	32

<u>3.2.2.4.1 Preparo do inóculo</u>	32
<u>3.2.2.4.2 Inoculação das plântulas</u>	33
3.2.3 Esquema dos grupos analisados.	34
3.2.4 Coleta do material vegetal.	34
3.2.5 Parâmetros de crescimento vegetal.	35
<u>3.2.5.1 Comprimentos foliar</u>	35
<u>3.2.5.2 Avaliação do volume radicular</u>	35
<u>3.2.5.3 Pesagem de massa fresca e seca</u>	35
3.2.6 Medida do teor de clorofila total	35
3.2.7 Extração e dosagem de proteínas.	36
3.2.8 Extração de nitrato, amônio, aminoácidos livres e açúcares solúveis	36
<u>3.2.8.1 Quantificação de nitrato</u>	37
<u>3.2.8.2 Quantificação de amônio</u>	37
<u>3.2.8.3 Quantificação de aminoácido livres</u>	37
<u>3.2.8.4 Quantificação de açúcares solúveis</u>	38
3.2.9 Teste de colonização.	38
3.2.10 Análise estatística.	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Padronização do manejo das plântulas: experimento piloto	40
4.1.1 Aplicação de fertilizantes.	40
4.1.2 Coleta das plântulas.	40
4.2 Efeitos dos tipos de tratamentos sobre plântulas micropropagadas – Lote não inoculado e lote <i>Enterobacter</i>	41
4.2.1 Medidas de Comprimento foliar	41
4.2.2 Volume radicular	43
4.2.3 Massa fresca.	44
4.2.3.1 Massa fresca foliar	44
4.2.3.2 Massa fresca radicular	45
4.2.4 Massa seca.	46
4.2.4.1 Massa seca foliar.	46
4.2.4.2 Massa seca radicular	47

<i>4.2.5 Teor relativo de clorofila total</i>	48
<i>4.2.6 Concentração de nitrato livre</i>	50
<i><u>4.2.6.1 Nitrato livre foliar</u></i>	50
<i><u>4.2.6.2 Nitrato livre radicular</u></i>	51
<i>4.2.7 Concentração de amônio livre</i>	52
<i>4.2.8 Concentração de aminoácidos totais livres</i>	52
<i><u>4.2.8.1 Aminoácidos livres foliares</u></i>	52
<i><u>4.2.8.2 Aminoácidos livres radiculares</u></i>	53
<i>4.2.9 Medida de proteína vegetal</i>	54
<i>4.2.10 Concentração de carboidratos solúveis</i>	55
<i><u>4.2.10.1 Carboidratos solúveis foliares</u></i>	55
<i><u>4.2.10.2 Carboidratos solúveis radiculares</u></i>	56
4.3 Colonização	58
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72
ANEXOS A - Meios de cultura e reagentes	82
ANEXO B – Quadro: resumo dos resultados	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Cana-de-açúcar*

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma gramínea tropical pertencente à Família Poaceae, Gênero *Saccharum*, o qual engloba espécies que possuem estoque de sacarose no colmo (CHEESMAN, 2004). Apresenta elevada eficiência fisiológica na utilização de nitrogênio, absorvendo do solo e convertendo-o prontamente em amidas e aminoácidos além de destacar-se como uma planta de elevado potencial para transformar energia solar em energia química (FERNANDES; ROSSIELLO, 1995). Possui o metabolismo C_4 para fixação de carbono inorgânico, o que lhe confere maior eficiência na assimilação de dióxido de carbono (CO_2) durante a fotossíntese em relação às plantas C_3 . As plantas C_4 possuem modificações bioquímicas e estruturais que permitem maior concentração de CO_2 em torno da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO), enzima fundamental da via de fixação de carbono, o Ciclo de Calvin-Benson (SAGE, 2004). A taxa fotossintética, por unidade de nitrogênio, geralmente é maior em plantas C_4 , acarretando maior crescimento e expansão foliar por unidade de nitrogênio (N), ou seja, é necessária menor quantidade desta enzima para que haja altas taxas de fixação de CO_2 (SAGE; PEARCY, 1987).

1.2 *A importância da cana-de-açúcar na economia brasileira*

A cana comercializada consiste em híbridos de *Saccharum officinarum* e outras espécies com características agronomicamente interessantes como resistência a pragas e doenças e maior concentração de sacarose (GALVÃO; FORMAGGIO; TISOT, 2005). É empregada como matéria prima de produtos como o açúcar comercial e o álcool combustível, que constitui uma fonte de energia renovável de aspecto relevante quanto à questão de sustentabilidade ambiental (GALVÃO; FORMAGGIO; TISOT, 2005; SEGATO; MATTIUZ; MOZAMBANI, 2006).

Atualmente o Brasil ostenta o título de maior produtor mundial de cana-de-açúcar (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2011). De acordo com o levantamento parcial realizado em maio de 2011 pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a dimensão da nova safra brasileira de cana-de-açúcar para a temporada 2011/12

deverá atingir quase 642 milhões de toneladas, com incremento de 2,9% em relação à safra 2010/11. A previsão para a produção de açúcar é de 48,11% da safra e 51,88% serão usadas para a produção de aproximadamente 27 bilhões de litros de etanol. O Estado de São Paulo continua sendo o maior produtor com 52,8% da produção brasileira (4,46 milhões de hectares) (CONAB, 2011).

1.3 Fertilizações convencional e orgânica

O solo possui reservas naturais de nutrientes, os quais são necessários ao desenvolvimento vegetal adequado. No entanto, estas reservas podem encontrar-se na forma indisponível para a planta. Frente à grande demanda na produção, os agricultores utilizam fertilizantes, orgânicos ou convencionais, para incrementar o aporte dessas substâncias (BOKHTIAR; SAKURAI, 2005). Para que tenham qualidade superior, Van Dillewijn (1952) salienta a necessidade de nitrogênio pelas mudas de cana-de-açúcar no período imediatamente após a germinação. A boa qualidade das mudas é um fator determinante para a produtividade final da lavoura, pois estabelece relação direta entre a percentagem de sobrevivência da planta adulta e a velocidade de seu crescimento (SUÁREZ; GÓMEZ; FRANCIA, 2003).

Dentre os principais nutrientes a serem aplicados no plantio da cana, o nitrogênio (N) é um dos mais onerosos, principalmente se o agricultor tiver que adquirir o produto industrializado, chamado fertilizante convencional (CONKIN, 2008; LADHA et al., 2005). Grande parte dos cultivares de cana-de-açúcar ainda utiliza fertilizantes convencionais como fonte de nutrientes. Estes empregam elementos solúveis que são prontamente disponibilizados para as plantas (CHEN, 2006). As fontes de nitrogênio mais comuns nestes produtos são a uréia, o amônio (NH_4^+) e o nitrato (NO_3^-), sendo o último mais solúvel. O nitrato de amônio, por ser altamente inflamável e facilmente lixiviado, tem sido substituído por sulfato de amônio em muitos fertilizantes convencionais (VITOSH, 1983). A lixiviação ocorre quando há o transporte de cátions ou ânions para as camadas mais profundas do solo, fora do alcance do sistema radicular das plantas, principalmente, pela ação das chuvas e água de irrigação. A intensidade do fenômeno varia com o tipo de solo e mecanismos aplicados ao plantio, havendo maior lixiviação em terrenos arenosos ou em cultivos que adotam irrigação mecanizada. A grande mobilidade do íon nitrato (NO_3^-) no solo, aliada à sua crescente utilização são responsáveis pelo processo de

eutrofização de águas superficiais e pela contaminação de águas subterrâneas que muitas vezes abastecem populações (LADHA et al., 2005).

Conceitos de agroecologia e agricultura sustentável consolidaram-se na Conferência das Nações Unidas para o Meio Ambiente e o Desenvolvimento Eco-92, quando foram lançadas as bases para um desenvolvimento sustentável no planeta. A agroecologia pode ser definida como a produção ou cultivo de alimentos de forma natural, sem a utilização de agrotóxicos e adubos químicos solúveis. De acordo com Anjos et al. (2007), atualmente a preocupação em se obter um novo produto que utiliza o sistema de adubação orgânica ou parcialmente orgânica tem aumentado consideravelmente. A adubação orgânica é composta por restos de origem animal e vegetal contendo em média 58% de carbono e 5% de nitrogênio. Para ser considerada como cultura orgânica, a cana-de-açúcar deve ser cultivada em solo livre de fertilizantes químicos nos últimos três anos. O único fertilizante permitido deve conter nitrogênio de origem natural como de guano, restos vegetais, estrume ou de organismos fixadores de nitrogênio. Elementos minerais precisam ser obtidos de depósitos naturais, como por exemplo, o fosfato retirado de rochas (IRVINE, 2004). Matsuoka et al. (2002) afirmam que a produção de cana-de-açúcar orgânica é viável, pois são alcançadas produtividades agrícolas similares às obtidas com adubação convencional. Este fato reforça a possibilidade da redução ou mesmo da substituição do adubo industrial pelo orgânico, visto que não ocorrem perdas tanto na qualidade da matéria-prima quanto nos rendimentos da cultura de cana-de-açúcar (CARVALHO et al., 2006).

1.4 Metabolismo de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial para os seres vivos, pois é componente de ácidos nucléicos, aminoácidos e proteínas dentre outras moléculas. Nas plantas ainda participa da composição de substâncias orgânicas como a clorofila e fitormônios, os quais possuem papéis importantes no crescimento e desenvolvimento vegetal (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). A deficiência de nitrogênio no cultivo pode causar distúrbios ao metabolismo celular e a conseqüente redução do potencial produtivo (CRUZ, 2006).

O nitrogênio requerido para o desenvolvimento vegetal é originado basicamente da absorção de nitrato e amônio pelo sistema radicular. Os mecanismos envolvidos da regulação da absorção desses íons ainda não são totalmente conhecidos (SEHTIYA; GOYAL, 2000). Lemos

(1996) afirma que as taxas de absorção de nitrato e amônio pelas plantas superiores são influenciadas por fatores como a proporção de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ no meio, temperatura, intensidade luminosa, concentração de carboidratos nas raízes, entre outros.

O nitrato, para ser incorporado pelo vegetal, necessita ser reduzido a amônio. Essa conversão ocorre em duas etapas: a primeira ocorre no citosol e consiste na redução do nitrato a nitrito (NO_2^-) pela enzima nitrato redutase (NR) mediante o consumo de 2 elétrons; e a segunda etapa, que ocorre nos plastídios e consiste na conversão do nitrito a amônio pela ação da enzima nitrito redutase (NiR), sob o custo de 6 elétrons (LEA, 1993; MARZZOCO; TORRES, 2007). Na parte aérea das plantas, a redução do nitrato a nitrito utiliza elétrons do NADPH oriundo da oxidação do fotossistema 1 na fotossíntese. O nitrito é, por sua vez, reduzido a amônio utilizando elétrons doados pela ferredoxina reduzida também durante o processo fotossintético. Nas raízes, as fontes de carbono e energia, necessárias para a redução do nitrato, são supridas pelos carboidratos advindos do ciclo de Calvin-Benson e que são transportados via floema. Dessa forma pode-se observar uma estreita correlação entre os níveis de carboidratos e a capacidade dos tecidos da raiz reduzir nitrato (MAGALHÃES, 1993).

Ao contrário da incorporação do nitrato, o amônio absorvido pelas raízes pode ser incorporado diretamente na forma de compostos orgânicos. Este processo consiste na sua conversão em aminoácidos através do sistema enzimático da glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT). Inicialmente o amônio é incorporado a uma molécula de glutamato pela ação da GS, gerando uma molécula de glutamina. Em seguida, o grupo amino da glutamina é transferido, pela GOGAT, para o α -cetoglutarato sintetizado no Ciclo de Krebs, formando duas moléculas de glutamato (Figura 1). Para cada molécula de NH_4^+ convertida em glutamato há a exigência de 2 elétrons e um ATP. A partir do glutamato podem ser sintetizados os outros aminoácidos e seus metabólitos (SOUZA et al., 2002).

O ciclo de assimilação do amônio pelo sistema enzimático GS/GOGAT pode ser considerado a principal rota de assimilação do amônio em plantas superiores. A GS parece estar distribuída em toda a planta, porém sua atividade é maior na parte aérea do que nas raízes (MAGALHÃES, 1993).

Figura 1 - Esquema representativo da assimilação de amônio pelo sistema enzimático GS/GOGAT.

FERr: ferredoxina reduzida; FERoxi: ferredoxina oxidada.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Alternativamente, o nitrato e o amônio podem ser translocados inalterados para a parte aérea do vegetal ou podem ser estocados em vacúolos das raízes e folhas, constituindo uma reserva para posterior redução, além de exercerem um papel importante na osmoregulação da planta (CRAWFORD, 1995).

Apesar da maior demanda energética para a utilização do nitrato em relação à incorporação do amônio, Baker e Millis (1980) afirmam que o desenvolvimento das plantas é melhor quando estas são supridas com nitrato e não com amônio. Lemos (1996), no entanto, argumenta que, dependendo da espécie vegetal, observa-se maior tendência na absorção de um destes íons em relação ao outro. Dados obtidos em nosso laboratório, ainda não publicados, demonstram a preferência da utilização de nitrato por plântulas de cana-de-açúcar.

A assimilação do N depende da disponibilidade de energia produzida na fotossíntese (ATP e NADPH), da presença de ácidos orgânicos provenientes do ciclo de Calvin-Benson e do catabolismo de carboidratos também provenientes deste ciclo (PIMENTEL, 1995). Por sua vez, a fotossíntese depende diretamente da atividade de proteínas e outros compostos nitrogenados. Observa-se, portanto, que a harmonia entre o metabolismo de N e de carbono é fundamental para o desenvolvimento dos vegetais em geral.

1.5 Bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio

Apesar de a atmosfera ser composta por 78% de N_2 , a maioria dos organismos vivos absorve nitrogênio apenas na forma combinada, tornando este elemento um dos maiores fatores limitantes que controla a dinâmica e funcionamento de vários ecossistemas (DALTON; KRAMER, 2007).

Uma alternativa à demanda por adubação é o emprego de bactérias fixadoras de nitrogênio, também chamadas diazotróficas, como bioinoculantes.

Os benefícios da fixação biológica de nitrogênio (FBN) advêm da capacidade que as bactérias diazotróficas possuem de quebrar a tripla ligação que une os dois átomos de nitrogênio atmosférico (N_2) pela ação da enzima nitrogenase. Esta enzima catalisa a redução do nitrogênio atmosférico à amônia (NH_3), podendo disponibilizar esta forma de nitrogênio combinado aos vegetais. O nitrogênio fixado também pode ser disponibilizado indiretamente, através da liberação de outros compostos nitrogenados pela bactéria (POSTGATE, 1998). As bactérias diazotróficas podem ser encontradas na região rizosférica, sendo, portanto de vida livre, ou mesmo dentro dos tecidos das plantas, as chamadas endofíticas (HARDOIM et al., 2008). Também estabelecem simbiose, como na associação de rizóbios em raízes de leguminosas (KIERS; WEST; DENISON, 2008; ROSENDAHL et al., 2000).

Bactérias endofíticas são aquelas capazes de colonizar e viver nos tecidos internos das plantas sem causar-lhes nenhum efeito negativo aparente. Podem ser isoladas do interior da planta hospedeira, sendo capazes de recolonizá-las (HALLMANN et al., 1997; TANAKA et al., 2006). Sua penetração pode ocorrer através da zona radicular e da parte aérea (KOBAYASHI; PALUMBO, 2000) mas a principal entrada consiste em fissuras na superfície das raízes derivadas do processo de crescimento radicular (HARDOIM et al., 2008). Qualquer órgão da planta pode ser colonizado por microrganismos endofíticos. Dentre as bactérias capazes de colonizar tecidos vegetais estão os gêneros como *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Gluconoacetobacter*, *Bacillus* e *Azospirillum* (LODEWYCKX et al., 2002; MASTRETTA et al., 2006; WEYENS et al., 2009).

Inicialmente os microrganismos endofíticos eram considerados inócuos às plantas, porém a partir da década de 70 começou-se a verificar efeitos positivos nestas interações (AZEVEDO et al., 2000). Além da FBN, foram descritos outros potenciais efeitos benéficos das bactérias sobre

as plantas. A colonização endofítica é considerada sinal de um sistema saudável para o vegetal, visto que muitos microorganismos endofíticos promovem o crescimento do hospedeiro (TAGHAVI et al., 2010). Às bactérias endofíticas são atribuídos o controle de patologias, a promoção de crescimento vegetal por meio da liberação de fitormônios, a contribuição direta na síntese de aminoácidos, poliaminas e outras substâncias importantes no metabolismo da planta, além auxiliar em seu desenvolvimento sob circunstâncias adversas (CHANWAY, 1997; THULER et al., 2003; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001).

No que se refere aos benefícios advindos da fixação biológica pelas bactérias endofíticas, permanecem em discussão o mecanismo de transferência do nitrogênio combinado à planta, bem como sua assimilação. Dobbelaere, Vanderleyden e Okon (2003) chamam atenção para o emprego de técnicas como a análise de redução de acetileno (ARA) ou balanço de nitrogênio que, se utilizadas isoladamente podem comprovar a ocorrência de fixação por parte da bactéria, porém não a assimilação do nitrogênio combinado por parte da planta.

Uma proposta para verificar tais dados baseou-se na inoculação de um mutante defeitivo para o gene que codifica a nitrogenase (*nif*-) e da linhagem selvagem de *Azospirillum brasilense* em plântulas e sementes de tomate. Em ambos os grupos houve aumento de massa seca e aumento na circunferência do caule, sugerindo que a promoção do crescimento não estava relacionada somente à fixação de nitrogênio (BASHAN; SINGH; LEVANONY, 1989). Sevilla et al. (2001) uniram técnicas de inoculação de linhagens selvagem e *nif*- de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar e a utilização de isótopo $^{15}\text{N}_2$ em experimentos livres de N combinado e comprovou que, em um período de 24 horas de exposição, 0.4% do nitrogênio total das raízes e caule foram provenientes do isótopo. O grupo inoculado com bactérias *nif*- apresentou incremento de apenas 0.05%, o que comprovou a transferência do N advindo da fixação biológica (SEVILLA, 2001). Porém, apesar de ter sido constatado o incremento de N pela planta, o mecanismo de transferência do N ainda não foi elucidado.

Solidificando resultados bem sucedidos na utilização de bactérias endofíticas diazotróficas na agricultura de cana-de-açúcar, a Embrapa Agrobiologia (Seropédica - RJ) desenvolveu um inoculante à base de algumas espécies dessas bactérias. Ferreira (2008) relatou que sua aplicação promoveu o crescimento da cana-de-açúcar e dispensou o uso de fertilizante nitrogenado, constituindo um significativo ganho ambiental e a redução de custos, visto que a utilização do inoculante é simples e de baixo custo. Bioinoculantes podem proporcionar às plantas uma

nutrição mais balanceada, com aumento na absorção de nitrogênio, fósforo e outros nutrientes minerais (BASHAN; HOLGUIN, 1997). Reis Junior, Mendes e Reis (2007) descreveram um experimento no qual a inoculação de uma mistura de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar antes do plantio promoveu incrementos de até 35% na produção de matéria seca e evidenciaram que 29% do nitrogênio acumulado foi oriundo da fixação biológica. Acrescentaram que, mesmo em solos pobres, a FBN pode ajudar as plantas a alcançar produções próximas ao dobro da média atual de produtividade.

A avaliação do conteúdo de substâncias nitrogenadas nos tecidos vegetais é de grande importância para comprovar a contribuição da FBN para a planta, uma vez que a simples presença de bactérias diazotróficas em seu interior não necessariamente implica na obtenção de benefícios advindos da fixação de N (BODDEY, 1995). No entanto, há poucos dados na literatura que avaliam o metabolismo de nitrogênio em plantas inoculadas com bactérias endofíticas diazotróficas.

1.6 O gênero *Enterobacter*

O gênero bacteriano *Enterobacter* pertence à família Enterobacteriaceae e pode ser encontrado em uma grande variedade de ambientes. Esta família, inicialmente descrita como colonizadora do trato intestinal humano (WIENER et al., 1999), tem adquirido importância por possuir representantes capazes de fixar nitrogênio, sendo encontrados em muitas espécies vegetais, tanto endofiticamente quanto na rizosfera (BARRAQUIO et al., 2000; HALLMANN et al., 1998). São consideradas endofíticas verdadeiras e já foram isoladas de diversas sendo descritas como promotoras de crescimento vegetal (ASIS; ADACHI, 2004; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004).

Estudos embasados em microscopia realizados para identificar a região colonizada por *Enterobacter asburiae*, endofítica em feijoeiros e algodoeiros, revelaram que estas penetram ativamente pelas plântulas por meio da hidrólise da parede celular, colonizando os espaços intercelulares das raízes e folhas (QUADT-HALLMANN; KLOEPPER, 1996). Ruppel et al. (1992) verificaram que, após inocular *Enterobacter radicincitans* em trigo, houve colonização de tecidos internos e externos da planta. Também foram localizadas em espaços intercelulares e na superfície das raízes, na superfície de folhas e caule, em torno das células do estômato, nos

espaços intercelulares do mesófilo e dentro de vasos xilemáticos. Existem linhagens do gênero *Enterobacter* consideradas promotoras de crescimento vegetal, pois independentemente de demonstrarem a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, são também capazes de produzir fitormônios, como o etileno, citocininas e a auxina ácido indol-3-acético (AIA), atuante no crescimento e alongamento das raízes e na proliferação dos pêlos radiculares (FERRARA, 2010; SCHOLZ-SEIDEL; RUPPEL, 1992). Além disso, foi recentemente demonstrada a liberação ativa de aminoácidos por linhagens endofíticas diazotróficas de *Enterobacter* sp. isoladas de cana-de-açúcar. Estas substâncias foram liberadas *in vitro* por 41% das linhagens de *Enterobacter* testadas (FERRARA, 2010).

A linhagem de *Enterobacter* sp. ICB481, utilizada no presente trabalho foi isolada do interior de raízes de cana-de-açúcar da variedade SP79-1011 em trabalho realizado em nosso laboratório com exemplares de cana submetidas a diferentes tipos de fertilização. Os exemplares foram cedidos pela Fazenda São Francisco, localizada no município de Sertãozinho, Estado de São Paulo, Brasil (21° 9'S; 48° 9'N). Posteriormente, a microbiota endofítica foi caracterizada fisiologicamente e identificada por seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA (SOTO-GONZALES, 2007). Constatou-se que 30,7 % da microbiota isolada pertencia à família Enterobacteriaceae. Ferrara (2010) avaliou *in vitro* as potencialidades de promoção de crescimento vegetal de diversas linhagens bacterianas desta coleção. A linhagem ICB481 apresentou atividade da enzima nitrogenase pelo método de redução de acetileno (ARA) e foi positiva para a presença do gene *nifH*. Também foram detectadas capacidades de solubilização de fosfato inorgânico e produção de fitormônios como etileno e AIA, características que sugerem a potencialidade como promotora de crescimento vegetal.

1.7 Plântulas micropropagadas

Plantas micropropagadas são resultantes da cultura de células vegetais *in vitro*. Realizam-se explantes de tecidos de uma planta-mãe ou a indução de células indiferenciadas (calos) em meio de cultura contendo reguladores de crescimento vegetal. Ocorre a diferenciação dos tecidos vegetais dando origem a plântulas estéreis (GEORGE; HALL; De KLERK, 2007).

A prática da micropropagação em cana-de-açúcar começou no Brasil nos anos 70, mas foi comercialmente introduzida na última década. Uma das vantagens em se utilizar plântulas

micropropagadas consiste na ausência microorganismos (OLIVEIRA et al., 2002). Assim, plântulas micropropagadas tornaram-se modelos experimentais para análises sistêmicas de interação planta-bactéria (OLIVEIRA et al., 2002; SEVILLA et al., 2001). O cultivo *in vitro* permite a manipulação das condições de crescimento das plantas, eliminando variáveis encontradas nos experimentos de campo (DONATO et al., 2003).

Em experimentos de médio e longo prazo, nos quais as plântulas não podem ser mantidas em frascos estéreis, a utilização de material vegetal micropropagado reduz a carga microbiana interferente e permite a reconstrução da microbiota em condições semelhantes para todas as réplicas biológicas.

1.7.1 Variedade de cana-de-açúcar SP79-1011

A variedade de cana SP79-1011, utilizada neste estudo, pertence à terceira geração de linhagens desenvolvidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC- Copersucar). De acordo com boletim técnico (COPERSUCAR, 1991) a variedade apresenta bom retorno econômico mesmo em solos de menor fertilidade, possui boa brotação de soqueira, com bom perfilhamento e fechamento. Também não são observados tombamento e florescimento, mas ocorrem alto teor de pol%, igualando-se à variedade genitora NA56-79 (variedade mais plantada no Brasil) e baixo teor de fibras. Foi classificada como de resistência intermediária à ferrugem e resistente ao vírus mosaico e à escaldadura. No entanto, possui suscetibilidade a patógenos como carvão e à broca.

1.8 Justificativa

A área destinada ao cultivo de cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil. Os maiores índices de aumento de áreas cultivadas ocorrem em São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais (CONAB, 2011). Torna-se evidente a necessidade de se desenvolverem sistemas de cultivo que aumentem a produtividade da área de plantio sem realizar sua expansão. É fundamental que a indústria sucroalcooleira considere os temas ambientais como parte das pautas de desenvolvimento. O estudo de efeitos benéficos vinculados à inoculação de bactérias endofíticas diazotróficas pode trazer novas estratégias agrícolas, visando, dessa forma, a redução da demanda por fertilizantes convencionais. A adoção de fertilizantes orgânicos em conjunto com

bioinoculantes utilizaria a biodiversidade endofítica em favor do cultivo sustentável, também levando em conta a importância do cenário agroindustrial da cana-de-açúcar na economia brasileira.

1.9 Hipóteses iniciais

- *Enterobacter* sp. ICB481 disponibiliza nitrogênio fixado a plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas;
- *Enterobacter* sp. ICB481 atua como promotora de crescimento vegetal em cana-de-açúcar.
- a fertilização orgânica atua de forma equivalente à convencional, quando aplicada nas plântulas de cana;
- a inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 nas plântulas fertilizadas aumenta o crescimento vegetal em comparação às plântulas apenas fertilizadas.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

- Avaliar os efeitos da interação de *Enterobacter* sp. ICB481 com plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas;
- avaliar os efeitos da adubação orgânica e convencional sobre o cultivo das plântulas inoculadas e não inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481.

2.2 *Objetivos específicos*

- Avaliar a capacidade de re-colonização de *Enterobacter* sp. ICB481 em plântulas de cana-de-açúcar;
- verificar medidas de massa fresca e seca, comprimento foliar, volume radicular e teor de clorofila total nas plântulas inoculadas e não inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481;
- analisar concentrações de proteínas totais, nitrato, amônio, aminoácidos livres em raízes e folhas de cana-de-açúcar inoculadas e não inoculadas;
- avaliar a concentração de açúcares solúveis livres em raízes e folhas de plantas inoculadas e não inoculadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS.

3.1 Material

3.1.1 Material biológico

a) Linhagens bacterianas:

- *Enterobacter* sp. ICB481 isolada do interior de raízes de cana-de-açúcar da variedade SP79-1011;
- *Escherichia coli* DH5- α estoque para o plasmídeo marcador pWM1007. Linhagem cedida gentilmente pela Dr^a. Maria T. Brandl do *United States Department of Agriculture* (USDA), Canadá.

b) Linhagem de cana-de-açúcar:

- Plântulas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) micropropagadas da variedade SP79-1011 gentilmente cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) – Piracicaba, SP.

3.1.2 Meios de cultura

- Para a manutenção de *Enterobacter* sp. ICB481 em cultura foi utilizado meio NFb (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).
- Para a manutenção da linhagens de *Escherichia coli* DH5- α e *Enterobacter* sp. ICB481 transformadas com plasmídeo *gfp* foi empregado meio Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) acrescido do antibiótico canamicina (50 μ g/ml).

3.1.3 Plasmídeo fluorescente

Neste estudo utilizou-se para a marcação de *Enterobacter* sp. ICB481 o plasmídeo pWM1007, o qual codifica proteína fluorescente verde (GFP), além de conferir resistência ao antibiótico canamicina (Figura 2).

Figura 2 - Mapa do plasmídeo pWM1007 gerado pelo aplicativo PlasMapper.

Observa-se a origem de replicação pBR322, reconhecida por enterobactérias (preto); o gene reporter *gfp*, codificador da proteína fluorescente (roxo); o marcador de seletividade, o qual confere resistência à canamicina (laranja); e sítios únicos de restrição (azul).

FONTE: SOFTWARE PlasMapper (2012)

3.2 Métodos

3.2.1 Transformação de *Enterobacter* sp. ICB481

3.2.1.1 Extração de DNA plasmideal

Para a obtenção do plasmídeo pWM1007, realizou-se a cultura da linhagem de *Escherichia coli* DH5- α , estoque do vetor, em meio LB líquido adicionado de canamicina (50 μ g/ml). A cultura cresceu durante 18 horas, à 37 °C sob agitação.

O DNA plasmideal foi extraído utilizando-se o kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e estocado à -20 °C.

3.2.1.2 Eletrocompetência

Para tornar *Enterobacter* sp. ICB481 competente à recepção do plasmídeo pWM1007 cultivou-se a bactéria *overnight* em 250 ml de meio LB líquido, a 30 °C sob agitação. A cultura foi diluída para uma Densidade Óptica (DO) de 0,1 (comprimento de onda de 500 nm) em um volume de 500 ml de meio LB líquido e incubada a 30 °C sob agitação até alcançar DO entre 0,4 e 0,6. A cultura foi incubada a 4 °C por 15 min, e centrifugada por 10 min a 4.800 rpm e temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 10 ml de glicerol 10% (MERCK) gelado e previamente esterilizado. Seguiu-se centrifugação a 9.000 rpm e temperatura de 4 °C, durante 20 min. Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se a etapa anterior. Após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 500 µl de glicerol 10% ao precipitado. A suspensão foi estocada em alíquotas de 50 µl e mantida a -80 °C.

3.2.1.3 Eletroporação

Depositou-se 40 µl de células competentes e 1 µl de solução plasmidial (100 ng.µl⁻¹) em uma cubeta de 0,2 cm (BioRad), previamente resfriada. A eletroporação foi realizada no equipamento Gene Pulser (BioRad) com voltagem de 2,5 kV, corrente de 25 mA, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω. Imediatamente após o pulso, transferiram-se as células para 1 ml de meio LB líquido, o qual foi mantido sob agitação (150 rpm) por 1 h a 37 °C. Após este período, semeou-se, com alça de Drigalski, 100 µl da cultura em placas contendo meio LB sólido acrescido de canamicina (50 µg/ml). As placas foram incubadas a 37 °C até que apresentassem crescimento de colônias.

3.2.2 Cultivo das plântulas e montagem de experimentos

3.2.2.1 Aclimação das plântulas de cana-de-açúcar em casa de vegetação

Assim que recebidas do Centro de Tecnologia Canavieira, as plântulas de cana-de-açúcar micropropagadas foram transferidas para tubos de PVC contendo substrato composto por vermiculita e quartzo (proporção 2:1). Estas receberam semanalmente solução de Hoagland, sem adição de nitrogênio, e foram envoltas com sacos plásticos para aclimação. As plântulas foram mantidas em casa de vegetação com fotoperíodo de 12 h e temperatura média de 28 °C.

Seguiu-se o período de aclimação durante duas semanas, etapa na qual a umidade do ar, mantida pelos sacos plásticos, foi reduzida gradativamente até equiparar-se às condições da estufa. Ao final da etapa de aclimação os sacos plásticos foram retirados dos tubos de PVC.

3.2.2.2 Padronização do manejo das plântulas: experimento piloto

Com intuito de padronizar o manejo das plântulas micropropagadas em casa de vegetação, bem como a quantidade de fertilizantes a serem utilizados, realizou-se um experimento piloto com duração de dois meses.

As plântulas aclimatadas tiveram a extremidade de suas raízes cortadas e imersas em água destilada durante 1 h. As plântulas foram, então, transferidas a tubos de PVC com diferentes alturas: 20 cm para plantas coletadas após 5 dias, 40 cm para aquelas coletadas após 30 dias e 60 cm para plantas coletadas após 60 dias. Este procedimento foi realizado com intuito de permitir o crescimento máximo das raízes durante os meses de experimento.

Separaram-se as plântulas em três grupos de acordo com o fertilizante nelas utilizado: grupo piloto-orgânico, no qual as plantas receberam de farinha de osso e torta de algodão (N 3%); grupo piloto-convencional, no qual utilizou-se NPK 10:10:10 sólido (N 10%); e grupo piloto-sem adubação, no qual as plântulas não receberam fonte de nitrogênio combinado.

No grupo piloto-orgânico foi utilizada a medida de fertilizante indicada pelo fabricante (6 g/tubo) (Sempre Verde). No grupo piloto-convencional, visando tornar a concentração de N aplicado equivalente ao do fertilizante orgânico utilizou-se a medida de 2 g/tubo de NPK 10:10:10 (Ultra Verde).

Todas as plântulas receberam semanalmente solução de Hoagland sem fontes de nitrogênio e foram mantidas em casa de vegetação, sob temperatura de 28 °C e fotoperíodo de 12 h.

Neste piloto as plântulas não foram inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481, mas utilizou-se como medida de tempo a expressão “dias pós inoculação” (DPI) a fim de manter a unidade utilizada nos demais experimentos deste trabalho.

Após a padronização do manejo, metodologias de fertilização e coleta, realizaram-se a montagem dos experimentos com um lote de plântulas não-inoculadas e outro com plântulas inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481.

3.2.2.3 Experimentos: montagem do grupo não inoculado

Após aclimação das plântulas, realizou-se o corte da extremidade das raízes seguido da imersão destas em água destilada durante 45 min.

Seguiu-se a transferência das plântulas para tubos de PVC com alturas de 20, 40 e 60 cm. Estas foram separadas em três grupos de acordo com o fertilizante aplicado: grupo orgânico (O), no qual as plantas receberam 6 g/tubo farinha de osso e torta de algodão (Sempre Verde); grupo convencional (C), no qual se utilizou 100 ml/tubo de solução de NPK líquido 10:10:10 (5 ml/l) (Ultra Verde); e grupo sem adubação (S), no qual as plântulas não receberam fonte de nitrogênio combinado. O fertilizante orgânico foi reaplicado após 30 dias e o convencional a cada 15 dias, de acordo com as indicações dos fabricantes.

As plântulas receberam solução de Hoagland sem fontes de nitrogênio uma vez por semana e foram mantidas em casa de vegetação, sob temperatura média de 28 °C e fotoperíodo de 12 h.

3.2.2.4 Montagem dos grupos *Enterobacter* sp.

3.2.2.4.1 Preparo do inóculo

A inoculação das plântulas micropropagadas foi feita utilizando-se suspensão de bactérias com concentração 10^7 UFC.ml⁻¹.

Para calcular a concentração do inóculo, realizou-se a cultura de *Enterobacter* sp. ICB481 transformada em 250 ml de meio LB líquido com canamicina durante 18 h, a 30 °C, sob agitação (180 rpm). Mediu-se a DO em espectrofotômetro Cary 50 Bio Spectrophotometer (comprimento de onda de 500 nm) e sua correspondente densidade populacional em UFC.ml⁻¹ empregando-se o método de contagem de unidades formadoras de colônias (BARBOSA et al., 1995).

Repetiu-se a cultura da bactéria sob as mesmas condições até que esta atingisse a DO correspondente a 10⁷ UFC.ml⁻¹. Para tanto, realizou-se a centrifugação da cultura a 4.800 rpm durante 10 min. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 250 ml de água destilada. Com a medida de UFC já conhecida, diluiu-se a suspensão bacteriana em água destilada para atingir a densidade populacional de 10⁷ UFC.ml⁻¹.

3.2.2.4.2 Inoculação das plântulas

As plântulas, depois de aclimatadas, tiveram a extremidade de suas raízes cortadas e foram imersas durante 45 min na suspensão bacteriana contendo 10⁷ UFC.ml⁻¹.

Seguiu-se o acondicionamento em tubos de PVC, como foi realizado no lote de plântulas não inoculadas. Três grupos foram formados de acordo com o fertilizante utilizado: *Enterobacter*-orgânico (EO), *Enterobacter*-convencional (EC) e *Enterobacter*-sem adubação (ES). Os fertilizantes e a quantidade aplicada foram as mesmas utilizadas nas plântulas do lote não inoculado.

As plântulas receberam, semanalmente, solução de Hoagland sem fonte de nitrogênio e foram mantidas em casa de vegetação, sob temperatura média de 28 °C e fotoperíodo de 12 h.

3.2.3 Esquema dos grupos analisados

De acordo com a metodologia supracitada formaram-se 6 grupos de tratamento (Quadro 1).

Quadro 1 - Grupos de tratamento formados de acordo com o fertilizante aplicado e a presença ou ausência de *Enterobacter* sp. ICB481 inoculada.

Nome do grupo	Sigla	Fertilizante	Inoculação
Orgânico	O	Farinha de Osso + Torta de algodão	Não
Convencional	C	NPK líquido 10:10:10	Não
Sem Adubação	S	Ausência de fertilizante	Não
Enterobacter-orgânico	EO	Farinha de Osso + Torta de algodão	Sim
Enterobacter-convencional	EC	NPK líquido 10:10:10	Sim
Enterobacter-sem adubação	ES	Ausência de fertilizante	Sim

FONTE: Ichiwaki (2012).

3.2.4 Coleta e análise do material vegetal

Inicialmente realizou-se coleta de plântulas aos 5, 30 e 60 DPI.

Após análise dos resultados de comprimentos foliar, massas fresca e seca totais e conteúdo protéico verificou-se que nos períodos de 5 e 30 DPI não havia diferença significativa entre nenhum dos 6 grupos de tratamento nos parâmetros analisados. As diferenças entre os grupos se manifestavam entre os períodos de 30 e 60 DPI.

Dessa forma um novo lote de plantas foi avaliado apenas aos 60 DPI para os parâmetros: comprimento foliar, volume radicular, massa fresca e seca foliar e radicular, clorofila, concentração de proteínas totais e concentrações de nitrato, amônio, aminoácidos e carboidratos livres (em raízes e folhas). Foram coletadas 3 plantas de cada um dos grupos de tratamento.

3.2.5 Parâmetros de crescimento vegetal

Foram analisados como medida de crescimento vegetal comprimento foliar, volume radicular, massas fresca e seca foliar e radicular das plântulas aos 60 DPI.

3.2.5.1 Comprimento foliar

As medidas de comprimento foliar foram consideradas da base à ponta da folha mais longa.

3.2.5.2 Avaliação do volume radicular

Para a determinação deste parâmetro, mergulharam-se as raízes das plântulas em uma proveta contendo volume conhecido de água. Considerou-se como medida o volume de água deslocado pela adição das raízes.

3.2.5.3 Pesagem de massa fresca e seca

Logo após a coleta das plântulas, raízes e folhas foram separadas e as massas frescas foram aferidas.

Para a determinação de massa seca, as plântulas foram submetidas à temperatura de 65 °C até atingir massa constante. A pesagem foi realizada após esta etapa de secagem.

3.2.6 Medida do teor relativo de clorofila total

As medições do teor relativo de clorofila total foram realizadas com auxílio de um clorofilômetro óptico portátil (SPAD 502 – Konica Minolta). Em cada indivíduo foram realizadas três leituras de uma mesma folha e adotada a média de cada repetição. As leituras efetuadas pelo medidor portátil de clorofila correspondem ao cálculo feito pelo equipamento baseado na transmissão de luz pela folha, em comprimentos de onda de diferentes absorbâncias.

3.2.7 Extração e dosagem de proteínas

As plântulas coletadas foram maceradas com auxílio de almofariz e pistilo. Nitrogênio líquido foi empregado para facilitar a fragmentação dos tecidos.

Do material triturado, 0,2 g foram utilizados para a extração protéica. Adicionou-se ao macerado 1,5 ml de tampão fosfato (pH 7,5), contendo 50 mM de fosfato de sódio dibásico, 10 mM de 2-mercaptoetanol e 50 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF). A amostra foi incubada durante 30 min a 4 °C. O material foi centrifugado por 10 min a 11000 rpm a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado a -20 °C (SILVEIRA et al., 2004). O precipitado foi adicionado de 1,0 ml de tampão Tris-HCl (pH 6,8) contendo 65 mM de trizma base, 50 mM de PMSF, 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 10% de glicerol e 320 mM de 2-mercaptoetanol. A mistura foi aquecida a 100 °C por 5 min, seguidos de incubação a 4 °C por 30 min e centrifugação a 11000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C (SANTA-CATARINA et al., 2006).

A concentração de proteínas totais foi determinada utilizando-se o método de Bradford (1976), com albumina bovina como padrão em espectrofotômetro Cary 50 Bio Spectrophotometer (comprimento de onda de 595 nm).

3.2.8 Extração de nitrato, amônio, aminoácidos livres e açúcares solúveis.

Foram coletados 500 mg de massa fresca (de raízes e folhas separadamente). Estas amostras foram imersas em 2 ml de etanol 80% fervente e armazenadas a -20 °C. Posteriormente, as amostras foram maceradas em almofariz e centrifugadas a 1.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi coletado e o resíduo foi ressuspensionado por mais três vezes em etanol 80% fervente. O volume de sobrenadante foi completado para 25 ml com etanol 80% em temperatura ambiente e filtrado em papel filtro. Do extrato etanólico, 10 ml foram despigmentados pela adição de 10 ml de clorofórmio e 3 ml de água em funil de separação. Agitou-se a solução suavemente, deixando-a em repouso por 30 min até a completa separação das porções polar e apolar. A fase apolar (pigmentada) foi descartada e a fração polar coletada. Em seguida, a fração polar foi evaporada até a secura, em liofilizador e ressuspensionado em 5 ml de água destilada.

Deste extrato foram retiradas alíquotas para as determinações de nitrato, amônio e aminoácidos livres e açúcares solúveis.

3.2.8.1 Quantificação de nitrato

Concentração de nitrato foi determinada segundo método colorimétrico de Cataldo et al. (1975). Uma líquota de 50 µl do extrato etanólico (raiz e folha separadamente) foi colocada em um tubo de ensaio, no qual foi adicionado vagarosamente 0,2 ml de solução de ácido salicílico 5% (em HCL concentrado). A mistura foi deixada em repouso durante 20 min. Após este período a reação foi paralisada adicionando-se 4,75 ml de NaOH (2N). Realizou-se leitura em espectrofotômetro Cary 50 Bio Spectrophotometer (comprimento de onda de 410 nm), utilizando-se soluções de KNO₃ para a determinação da curva-padrão.

3.2.8.2 Quantificação de amônio

A quantificação de amônio livre foi realizada segundo método colorimétrico de Weatherburn et al. (1967). Em um tubo de ensaio contendo 5 ml de solução de fenol e nitroprussiato de sódio adicionou-se 20 µl do extrato etanólico. Agitou-se o tubo vigorosamente e adicionou-se 5 ml de solução de hipoclorito alcalino. Após agitar o tubo novamente, a solução ficou em repouso durante 20 min a 37 °C. Realizou-se leitura em espectrofotômetro Cary 50 Bio Spectrophotometer (comprimento de onda de 625 nm). Para a determinação da curva-padrão foram utilizadas soluções de (NH₄)₂SO₄.

As soluções utilizadas nos protocolos supracitados encontram-se listadas no ANEXO A.

3.2.8.3 Quantificação de aminoácidos livres

Os aminoácidos contidos no extrato etanólico foram submetidos à técnica da derivatização com O-ftalaldeído (OPA), segundo a metodologia descrita por Astarita, Floh e Handro (2004). Misturou-se 400 µl da solução OPA-borato e 200 µl de amostra. Os aminoácidos derivatizados foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alto desempenho em HPLC de fase reversa com coluna C18 (Shimadzu Shim-pack CLC ODS) e detector de fluorescência

(excitação 250 nm e emissão de 480 nm). As concentrações dos eluentes na coluna foram 80% do Eluente A e 20% do Eluente B nos primeiros 32 min de corrida. Entre 32 e 71 min a concentração do Eluente B aumentou linearmente de 20% para 100% sendo mantida até 93 min (fim da análise). As áreas, tempos de retenção e concentração de cada aminoácido foram avaliados por comparação com padrões de concentrações conhecidas.

Todas as soluções utilizadas no protocolo supracitado encontram-se listadas no ANEXO A.

3.2.8.4 Quantificação de açúcares solúveis

A concentração de açúcares solúveis nos tecidos de raízes e folhas foram avaliados pela metodologia de Dubois et al. (1956). Em tubo de ensaio contendo 0,5 ml do extrato etanólico adicionou-se 0,5 ml de solução de fenol 5%. Acrescentou-se vagarosamente 2 ml de H₂SO₄ concentrado ao tubo de ensaio, deixando a amostra esfriar em temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se leitura em espectrofotômetro Cary 50 Bio Spectrophotometer (comprimento de onda de 490 nm), utilizando-se de soluções de glicose para determinação da curva padrão.

3.2.9 Teste de colonização

A colonização de *Enterobacter* sp. ICB481 foi verificada nos tecidos internos das plântulas inoculadas. O experimento, descrito abaixo, foi realizado em triplicata, em plântulas coletadas aos 5, 30 e 60 DPI.

A plântula fresca foi coletada e acondicionada dentro de um frasco com tampa. Realizou-se lavagem com água destilada agitando o frasco durante 2 min. Repetiu-se o procedimento até retirar totalmente a vermiculita aderida às raízes. Seguiram-se lavagens com etanol 70% por 2 min, com hipoclorito de sódio 2,5% por 5 min e duas lavagens com água destilada estéril durante 1 min.

Amostras de 500 mg de raízes e folhas foram maceradas em almofariz adicionando-se 5 ml de água destilada estéril. Retirou-se 100 µl do macerado e adicionou-se a 900 µl de água destilada para realizar diluição seriada até a diluição de 10⁻⁷. Plaqueou-se, com alça de Drigalski,

100 µl de cada diluição em meio LB sólido com canamicina. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 h. Foram contadas as colônias que apresentaram expressão do gene *gfp*.

3.2.10 Análise estatística

Todos os parâmetros foram submetidos à análise de variância por ANOVA ($p < 0.05$) com três fatores (tipo de fertilizante, inoculação bacteriana e tempo) seguido por teste de Tukey ($p < 0.05$).

4 RESULTADOS

4.1 Padronização do manejo das plântulas: experimento piloto

4.1.1 Aplicação de fertilizantes

Sete dias após receberem adubação NPK 10:10:10 sólido (2 g/tubo), aproximadamente 90% das plântulas do grupo piloto-convencional morreram. Não foi observada tal taxa de mortalidade nas plântulas dos grupos piloto-orgânico e piloto-sem adubação.

Devido a este fato, realizou-se um teste com plântulas estoque para determinar se a mortalidade observada estava relacionada com a dosagem de NPK 10:10:10 utilizada. A quantidade de NPK foi alterada para 0,8 g/pote, de acordo com instruções do fabricante. Após 7 dias da aplicação, observou-se mortalidade de 35% das plântulas.

Paralelamente a este teste, utilizou-se NPK 10:10:10 líquido, conforme indicação do fabricante. Não houve perda de plântulas com este tratamento, sendo este adotado para a realização dos experimentos.

Quanto à utilização do fertilizante orgânico, observou-se que ao aplicar o produto sobre o substrato, sem misturá-los, havia crescimento de fungos nos tubos após 7 dias. O problema foi sanado misturando-se o fertilizante à camada superficial de substrato.

4.1.2 Coleta das plântulas

Plântulas dos períodos de 30 e 60 DPI apresentaram rompimento das porções finais das raízes ao serem coletadas apesar de terem sido puxadas cuidadosamente de dentro dos tubos. Optou-se por coletar as plântulas esvaziando os tubos por inversão. No entanto, a aderência do substrato úmido ao interior dos tubos dificultou a retirada das raízes. Observou-se que ao posicionar os tubos horizontalmente, batendo-os levemente contra o chão, o substrato se soltava do tubo, facilitando o esvaziamento do mesmo. Tal metodologia reduziu a incidência de rompimento de raízes durante as coletas.

4.2 Efeitos dos tipos de tratamentos sobre plântulas micropropagadas – lote não inoculado e lote *Enterobacter*

Inicialmente estipulou-se que as medidas dos parâmetros a seguir seriam coletadas nos períodos de 5, 30 e 60 DPI. No entanto, nenhum dos grupos de tratamento apresentou diferenças significativas entre si nos períodos de 5 e 30 DPI. Por este motivo as seguintes análises foram realizadas com os dados de 60 DPI, onde foram detectadas diferenças de acordo com os grupos de tratamento.

Foram avaliados dois lotes de plântulas após 60 DPI: um lote inoculado com *Enterobacter* sp. ICB481 e um lote de plântulas não inoculadas. Os experimentos foram realizados após padronização das metodologias.

4.2.1 Medidas de comprimento foliar

Figura 3 - Médias de comprimento foliar de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 3): Aos 60 dias, os grupos orgânico (O) e convencional (C) atingiram médias de 61,5 cm e 66,2 cm de comprimento, respectivamente, não apresentando diferença significativa entre si; o grupo sem adubação (S) apresentou média de 36,3 cm, sendo significativamente menor que os fertilizados ($O=C>S$).

Grupos *Enterobacter* (Figura 3): Aos 60 DPI os grupos inoculados atingiram 71,3 cm no *Enterobacter*-orgânico (EO), 70,3 cm no *Enterobacter*-convencional (EC) e 76,6 cm no *Enterobacter*-sem adubação (ES). Não houve diferença entre as médias obtidas nos três tratamentos inoculados (EO=EC=ES).

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Os grupos orgânico e *Enterobacter*-orgânico (O=EO) não apresentaram diferença entre si, assim como os grupos convencional e *Enterobacter*-convencional (C=EC). O grupo *Enterobacter*-sem adubação apresentou média significativamente maior (76,6 cm) que o grupo sem adubação (ES>S) (36,6 cm) (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Diferença entre os comprimentos foliares de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e plântula do grupo sem adubação, após 60 DPI.

EC= Grupo *Enterobacter*-convencional, EO= Grupo *Enterobacter*-orgânico, ES= Grupo *Enterobacter*-sem adubação, S= Grupo Sem adubação.
FONTE: Ichiwaki (2012).

Figura 5 - Comparação entre comprimentos foliares de plântulas não inoculadas e inoculadas 60 DPI.

A: Comparação entre plântulas dos grupos Orgânico (O) e *Enterobacter*-orgânico (EO) / **B:** Comparação entre plântulas do grupo convencional (C) e *Enterobacter*-convencional / **C:** Comparação entre plântulas dos grupos sem adubação (S) e ES= *Enterobacter*-sem adubação.

FONTE: Ichiwaki (2012).

4.2.2 Volume radicular

Figura 6 - Médias do volume radicular em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 6): Aos 60 dias, o grupo orgânico (O) apresentou média de volume radicular de 3,6 cm³, o grupo convencional (C) de 3,1 cm³ e o sem adubação (S) de 2,5 cm³; não houve diferença significativa entre os tratamentos (O=C=S).

Grupos *Enterobacter* (Figura 6): O volume das raízes em plântulas inoculadas atingiu médias de 5,6 cm³ no grupo *Enterobacter*-orgânico (EO), 4,3 cm³ no *Enterobacter*-convencional (EC) e 5,6 cm³ no *Enterobacter*-sem adubação (ES). Não houve diferença entre as médias obtidas nos três grupos (EO=EC=ES).

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Todos os grupos inoculados apresentaram médias significativamente maiores em relação aos grupos não inoculados para volumes radiculares (EO>O; EC>C; ES>S). Não houve efeito de interação grupo-tratamento.

4.2.3 Massa fresca

4.2.3.1 Massa fresca foliar

Figura 7 - Médias de massa fresca foliar em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 7): Após 60 DPI, o grupo orgânico (O) apresentou média de massa fresca foliar de 2,86 g e o convencional (C) de 2,97 g não havendo diferença

significativa entre os dois. O grupo sem adubação (S) atingiu média de 0,87 g sendo o grupo com menor medida de massa seca ($O=C>S$).

Grupos *Enterobacter* (Figura 7): Os grupos *Enterobacter*-orgânico (EO) e *Enterobacter*-convencional (EC) apresentaram as médias de 2,95 g e 2,60 g respectivamente, sendo considerados estatisticamente iguais. O grupo *Enterobacter*-sem adubação (ES) apresentou a maior média de massa fresca foliar, atingindo 4,0 g ($EO=EC<ES$)

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Os grupos Orgânico e *Enterobacter*-orgânico ($O=EO$) não apresentaram diferença entre si, o mesmo ocorrendo entre os grupos Convencional e *Enterobacter*-convencional ($C=EC$). O grupo *Enterobacter*-sem adubação apresentou média significativamente maior que o grupo Sem adubação ($ES>S$).

4.2.3.2 Massa fresca radicular

Figura 8 - Médias de massa fresca radicular em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 8): O grupo Orgânico (O) apresentou média de massa fresca radicular de 0,88 g, o Convencional (C) de 0,57 g e o Sem adubação (S) 0,52 g. Não houve diferença significativa entre os grupos Convencional e Sem adubação, ambos apresentando médias menores em relação ao grupo Orgânico ($O>C=S$).

Grupos *Enterobacter* (Figura 8): Aos 60 DPI, os grupos *Enterobacter*-orgânico (EO), *Enterobacter*-convencional (EC) e *Enterobacter*-sem adubação (ES) apresentaram as médias de 1,23 g, 1,20 g e 1,20 g respectivamente, sendo considerados estatisticamente iguais (EO=EC=ES)

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Todos os grupos inoculados apresentaram diferença significativa em relação aos não inoculados, sendo as maiores médias de massa fresca radicular pertencentes aos grupos inoculados (EO>O; EC>C; ES>S).

4.2.4 Massa seca

4.2.4.1 Massa seca foliar

Figura 9 - Médias de massa seca foliar em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 9): Aos 60 DPI, o grupo orgânico (O) apresentou média de massa seca foliar de 0,42 g, o convencional (C) de 0,52 g e o sem adubação (S) 0,18 g. Não houve diferença significativa entre os grupos orgânico e convencional. A menor média pertenceu ao grupo sem adubação (O=C>S).

Grupos *Enterobacter* (Figura 9): No mesmo período, os grupos *Enterobacter*-orgânico (EO), *Enterobacter*-convencional (EC) e *Enterobacter*-sem adubação (ES) apresentaram as

médias de 0,48 g, 0,48 g e 0,47 g respectivamente, não havendo diferenças significativas entre eles (EO=EC=ES)

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Não houve diferença significativa entre os grupos Orgânico e *Enterobacter*-orgânico (O=EO) e entre o convencional e *Enterobacter*-convencional (C=EC). Já o grupo *Enterobacter*-sem adubação apresentou maior média em relação ao grupo sem adubação (ES>S).

4.2.4.2 *Massa seca radicular*

Figura 10 - Médias de massa seca radicular em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 10): O grupo orgânico (O) apresentou média de massa seca radicular de 0,12 g, sendo esta estatisticamente igual à média do grupo convencional (C): 0,14 g. O grupo sem adubação (S) foi significativamente menor que os demais grupos, apresentando média de 0,03 g. (O=C>S).

Grupos *Enterobacter* (Figura 10): Após 60 DPI, o grupos *Enterobacter*-orgânico (EO) apresentou média de 0,12 g, o *Enterobacter*-convencional (EC) de 0,13 g e *Enterobacter*-sem adubação (ES) de 0,14 g, sendo estas medidas consideradas estatisticamente iguais (EO=EC=ES)

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Os grupos orgânico e *Enterobacter*-orgânico não apresentaram diferença significativa entre si (O=EO), sendo o mesmo

observado entre os grupos convencional e *Enterobacter*-convencional (C=EC). O grupo *Enterobacter*-sem adubação apresentou maior média de massa seca radicular em relação ao grupo sem adubação (ES>S).

4.2.5 Teor relativo de clorofila total (SPAD)

Figura 11 - Médias de teor relativo de clorofila total (SPAD) em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 11): Após 60 dias de tratamento, as plântulas dos grupos orgânico (O) e convencional (C) apresentaram médias de 34,9 e 36,0 para teor de clorofila total (SPAD), sendo considerados estatisticamente iguais. O grupo sem adubação (S) apresentou a menor média: 17,9. (O=C>S) Os sintomas de clorose tornaram-se evidentes no começo do segundo mês de experimento.

Grupo *Enterobacter* (Figura 11): Plântulas dos grupos *Enterobacter*-orgânico (EO) e *Enterobacter*-convencional (EC) e *Enterobacter*-sem adubação (ES) apresentaram médias 35,2, 36,3 e 35,4 respectivamente, não apresentando diferenças significativas entre si. A diferença de coloração entre os tratamentos pode ser verificada visualmente como mostram as figuras 12 e 13.

Figura 12 - Diferença na pigmentação foliar em plântulas não inoculadas.

O= Grupo orgânico, C= Grupo convencional, S= Grupo sem adubação. Observa-se amarelecimento foliar apenas no grupo controle sem-adubação.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Figura 13 - Ausência de amarelecimento foliar nos grupos inoculados com *Enterobacter* sp. ICB481 aos 60 DPI.

EC= Grupo *Enterobacter* convencional, EO= Grupo *Enterobacter* orgânico, ES= Grupo-*Enterobacter* sem adubação.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Os grupos orgânico e *Enterobacter*-orgânico (O=EO) não apresentaram diferença entre si, assim como os grupos convencional e *Enterobacter*-convencional (C=EC). O grupo *Enterobacter*-sem adubação apresentou média significativamente maior (35,4 cm) em relação ao grupo sem adubação (17,9 cm) (ES>S).

4.2.6 Concentração de nitrato livre

4.2.6.1 Nitrato livre foliar

Figura 14 - Médias de concentração de nitrato livre foliar em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 14): Aos 60 DPI o grupo orgânico (O) atingiu média de nitrato livre foliar de $133,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, o convencional (C) $40,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, e o sem adubação (S) $53,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca. O grupo Orgânico apresentou a maior média em relação aos demais grupos, enquanto os grupos Convencional e Sem-adubação não apresentaram diferenças significativas entre si ($O > C = S$).

Grupos *Enterobacter* (Figura 14): No mesmo período, foram obtidas as médias $106,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no grupo *Enterobacter*-orgânico, $160,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no *Enterobacter*-convencional e $133,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no *Enterobacter*-sem adubação. Não houve diferença entre as medidas dos três grupos de tratamento após 60 DPI ($EO = EC = ES$).

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Apenas os grupos orgânico e *Enterobacter*-orgânico não diferiram entre si ($O = EO$). Entre os demais grupos, as plântulas inoculadas apresentaram maiores médias de nitrato livres foliares em relação àquelas não inoculadas ($EC > C$ e $ES > S$).

4.2.6.2 Nitrato livre radicular

Figura 15 - Médias de concentração de nitrato livre radicular em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 15): Após 60 DPI, o grupo orgânico (O) atingiu média de concentração de nitrato solúvel radicular de $280,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, o convencional (C) $253,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, e o sem adubação (S) $83,3 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca. Não houve diferença significativa entre os valores dos grupos orgânico e convencional. Ambos diferiram do grupo sem adubação, o qual atingiu a menor média do período ($C=O>S$).

Grupos *Enterobacter* (Figura 15): Nos grupos inoculados foram obtidas as médias $176,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no grupo *Enterobacter*-orgânico, $266,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no *Enterobacter*-convencional e $186,6 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no *Enterobacter*-sem adubação. Não houve diferença entre as medidas dos três grupos de tratamento após 60 DPI ($EO=EC=ES$).

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Os grupos orgânico e *Enterobacter*-orgânico não apresentaram diferença significativa entre si ($O=EO$), ocorrendo o mesmo entre os grupos convencional e *Enterobacter*-convencional ($C=EC$). O grupo *Enterobacter*-sem adubação apresentou maior média de massa seca radicular em relação ao grupo sem adubação ($ES>S$).

4.2.7 Concentração de amônio livre

Para todas as medidas realizadas, tanto nos grupos inoculados como não inoculados, os valores obtidos para concentração de amônio livre em raízes e folhas ficaram abaixo do limite de detecção pela metodologia de Weatherburn et al. (1967).

4.2.8 Concentração de aminoácidos totais livres

4.2.8.1 Aminoácidos livres foliares

Figura 16 - Médias de concentração de aminoácidos totais livres foliares em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 16): Aos 60 dias, o grupo Orgânico (O) apresentou média $32590 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, o grupo Convencional (C) $19352 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca e o Sem adubação (S) $7403 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca para medidas de concentração de aminoácidos livres foliares. Houve diferença significativa entre os valores de todos os grupos de tratamento ($O > C > S$).

Grupos *Enterobacter* (Figura 16): Nos grupos inoculados as médias atingiram $14937 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no grupo *Enterobacter*-orgânico (EO), $14458 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no

Enterobacter-convencional (EC) e 19466 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no *Enterobacter*-sem adubação (ES). Não houve diferença entre as médias dos grupos *Enterobacter*-orgânico e *Enterobacter*-convencional, porém ambos diferiram do grupo *Enterobacter*-sem adubação, o qual apresentou a maior média entre os grupos ($\text{EO}=\text{EC}<\text{ES}$).

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Os grupos *Enterobacter*-orgânico (EO) e *Enterobacter*-convencional (EC) apresentaram médias significativamente menores em relação aos grupos Orgânico e Convencional ($\text{EO}<\text{O}$; $\text{EC}<\text{C}$). Já o grupo *Enterobacter*-sem adubação (ES) apresentou maior média em relação ao grupo Sem adubação ($\text{ES}>\text{S}$).

4.2.8.2 Aminoácidos livres radiculares

Figura 17 - Médias de concentração de aminoácidos totais livres radiculares em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 17): Aos 60 DPI, o grupo Orgânico (O) apresentou média de 18831 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, o grupo Convencional (C) de 27975 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca e o Sem adubação (S) de 10035 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca para medidas de concentração de aminoácido radicular. Houve diferença significativa entre três grupos de tratamentos ($\text{C}>\text{O}>\text{S}$).

Grupos *Enterobacter* (Figura 17): As médias de concentração de aminoácidos radiculares atingiram 13565 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no grupo *Enterobacter*-orgânico (EO), 16681

$\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no *Enterobacter*-convencional (EC) e $8635 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no *Enterobacter*-sem adubação (ES). Não houve diferença significativa entre os grupos *Enterobacter*-orgânico e *Enterobacter*-convencional (EO=EC). O grupo *Enterobacter*-orgânico também não diferiu do grupo *Enterobacter*-sem adubação (EO=ES). No entanto o grupo *Enterobacter*-convencional apresentou maior média em relação ao grupo *Enterobacter*-sem adubação (EC>ES).

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Os grupos *Enterobacter*-orgânico (EO) e *Enterobacter*-convencional (EC) apresentaram médias significativamente menores em relação aos grupos Orgânico e Convencional (EO<O; EC<C). Não houve diferença significativa entre as médias dos grupos *Enterobacter*-sem adubação (ES) e Sem adubação (ES=S).

4.2.9 Medida de proteína vegetal

Figura 18 - Médias de conteúdo protéico total em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 18): Aos 60 DPI o grupo orgânico (O) atingiu média de concentração protéica total de $8,35 \text{ mg.planta}^{-1}$, o convencional (C) $20,97 \text{ mg.planta}^{-1}$, e o sem adubação (S) $6,81 \text{ mg.planta}^{-1}$. Não houve diferença significativa entre os valores dos grupos

orgânico e sem adubação. Ambos diferiram do grupo convencional, o qual atingiu a maior média do período ($C > O = S$).

Grupos *Enterobacter* (Figura 18): No mesmo período, verificaram-se as médias 25,9 mg.planta⁻¹ no grupo *Enterobacter*-orgânico, 24,6 mg.planta⁻¹ no *Enterobacter*-convencional e 21,9 mg.planta⁻¹ no *Enterobacter*-sem adubação. Não houve diferença entre as medidas dos três grupos de tratamento após 60 DPI ($EO = EC = ES$).

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Após 60 dias, apenas os grupos convencional e *Enterobacter*-convencional ($C = EC$) não diferiram entre si. Entre os demais grupos, as plântulas inoculadas apresentaram maior média de concentração de proteínas totais em relação àquelas não inoculadas ($EO > O$ e $ES > S$).

4.2.10 Concentração de carboidratos solúveis

4.2.10.1 Carboidratos solúveis foliares

Figura 19 - Médias de carboidratos solúveis foliares em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 2): Aos 60 DPI, o grupo Orgânico (O) apresentou média de carboidratos solúveis foliares de 3097 µg.g⁻¹ massa fresca, o grupo Convencional (C) de 1750

$\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca e o grupo Sem adubação (S) de $2770 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca. Não houve diferença significativa entre os grupos Orgânico e Sem adubação e ambos apresentaram médias significativamente maiores em relação ao grupo Convencional ($O=S>C$).

Grupos *Enterobacter* (Figura 2): O grupo *Enterobacter*-orgânico (EO) apresentou média de $3020 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, o *Enterobacter*-convencional (EC) de $1820 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca e *Enterobacter*-sem adubação (ES) de $2617 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca. Não houve diferença significativa entre os grupos *Enterobacter*-orgânico e *Enterobacter*-sem adubação. Ambos apresentaram médias significativamente maiores em relação ao grupo *Enterobacter*-convencional ($EO=ES>EC$).

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: Não houve diferença significativa entre os grupos inoculados e não inoculados ($EO=O$; $EC=C$; $ES=S$). Não foi, portanto, detectado efeito de interação entre Grupo (inoculado e não inoculado) e Tratamentos.

4.2.10.2 Carboidratos solúveis radiculares

Grupos não inoculados (Figura 2): Os grupos não inoculados apresentaram as seguintes médias de carboidratos solúveis foliares: $2317 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no Orgânico (O), $1452 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no Convencional (C) e $1698 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no Sem adubação (S). Não houve diferença significativa entre os grupos Convencional e Sem adubação, sendo que ambos apresentaram médias significativamente menores em relação ao grupo Orgânico ($O>C=S$).

Grupos *Enterobacter* (Figura 2): No mesmo período, o grupo *Enterobacter*-orgânico (EO) apresentou média de $1773 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, o *Enterobacter*-convencional (EC) $1684 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca e *Enterobacter*-sem adubação (ES) $1384 \mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca. Houve diferença significativa apenas entre os grupos *Enterobacter*-orgânico e *Enterobacter*-sem adubação, sendo a média do primeiro grupo maior que a do segundo ($EO>ES$; $EO=EC$; $EC=ES$).

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: O grupo Orgânico apresentou média maior em relação ao *Enterobacter*-orgânico ($EO<O$). Os grupos Convencional e *Enterobacter*-convencional não apresentaram diferença significativa entre si ($EC=C$), sendo o mesmo observado entre os grupos Sem adubação e *Enterobacter*-sem adubação ($ES=S$).

Figura 20 - Médias de carboidratos solúveis radiculares em plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481 e não inoculadas, submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação aos 60 DPI.

FONTE: Ichiwaki (2012).

Grupos não inoculados (Figura 20): Os grupos não inoculados apresentaram as seguintes médias de carboidratos solúveis foliares: 2317 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no Orgânico (O), 1452 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no Convencional (C) e 1698 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca no Sem adubação (S). Não houve diferença significativa entre os grupos Convencional e Sem adubação, sendo que ambos apresentaram médias significativamente menores em relação ao grupo Orgânico ($O > C = S$).

Grupos *Enterobacter* (Figura 20): No mesmo período, o grupo *Enterobacter*-orgânico (EO) apresentou média de 1773 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca, o *Enterobacter*-convencional (EC) 1684 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca e *Enterobacter*-sem adubação (ES) 1384 $\mu\text{g.g}^{-1}$ massa fresca. Houve diferença significativa apenas entre os grupos *Enterobacter*-orgânico e *Enterobacter*-sem adubação, sendo a média do primeiro grupo maior que a do segundo ($EO > ES$; $EO = EC$; $EC = ES$).

Comparação entre grupos não inoculados e grupos *Enterobacter*: O grupo Orgânico apresentou média maior em relação ao *Enterobacter*-orgânico ($EO < O$). Os grupos Convencional e *Enterobacter*-convencional não apresentaram diferença significativa entre si ($EC = C$), sendo o mesmo observado entre os grupos Sem adubação e *Enterobacter*-sem adubação ($ES = S$).

4.3 Colonização

Quadro 2 - Quantificação de *Enterobacter* sp. ICB481 marcada (UFC.g⁻¹ de planta) em plântulas submetidas aos tratamentos orgânico, convencional e sem adubação ao longo de 5, 30 e 60 DPI.

<i>Enterobacter</i> UFC.g ⁻¹ de planta	5 DPI	30 DPI	60 DPI
Orgânica	$4,35 \times 10^7 \pm 2,12 \times 10^6$	$1,20 \times 10^5 \pm 2,00 \times 10^4$	$3,90 \times 10^5 \pm 8,54 \times 10^4$
Convencional	$4,33 \times 10^5 \pm 4,04 \times 10^5$	$1,22 \times 10^6 \pm 2,33 \times 10^5$	$5,43 \times 10^5 \pm 5,13 \times 10^4$
Sem Adubação	$8,65 \times 10^6 \pm 7,78 \times 10^5$	$1,20 \times 10^6 \pm 1,76 \times 10^5$	$3,63 \times 10^5 \pm 5,50 \times 10^4$

FONTE: Ichiwaki (2012).

A densidade populacional de *Enterobacter* sp. ICB481 no interior das plântulas inoculadas foi de: $4,35 \times 10^7$ UFC.g⁻¹ no grupo *Enterobacter*-orgânico, $4,33 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ no *Enterobacter*-convencional e $8,65 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ no *Enterobacter*-sem adubação (Quadro 2). Aos 30 DPI a quantificação bacteriana ficou em: $1,20 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ no grupo *Enterobacter*-orgânico, $1,22 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ no *Enterobacter*-convencional e $1,20 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ no *Enterobacter*-sem adubação. Aos 60 DPI, verificou-se o $3,9 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ no grupo *Enterobacter*-orgânico, $5,43 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ no *Enterobacter*-convencional e $3,63 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ no *Enterobacter*-sem adubação.

Observa-se que a população apresentou perfis diferentes de acordo com o tipo de tratamento. Porém após 60 DPI as populações não apresentaram diferenças significativas entre si.

Enterobacter sp. ICB481 foi encontrada apenas nos tecidos das raízes em todos os grupos inoculados. Não foram encontradas bactérias da parte aérea das plântulas.

O resumo dos resultados obtidos pode ser encontrado no quadro do ANEXO B.

5 DISCUSSÃO

Parâmetros de crescimento e teor de clorofila total: Durante a padronização do manejo no grupo piloto-convencional, cerca de 90% das plântulas morreram após receberem 2 g/tubo de NPK sólido (10:10:10), apesar desta quantidade ter sido calculada para que as concentrações de N fossem equivalentes nos dois tratamentos, o orgânico e o convencional. O excesso de fertilizante convencional pode causar efeitos negativos para o ambiente, como o desequilíbrio do pH do solo levando à redução de sua fertilidade. Também pode causar efeitos negativos como a modificação nos tecidos que envolvem a planta (CHEN, 2006). Biggs (2003) relata que, se aplicado em altas concentrações o NH_4^+ , presente no fertilizante convencional usado neste estudo (nitrato de amônio), pode causar redução de crescimento e morte do vegetal, seja pela alteração de pH do meio ou pelo efeito tóxico. Não foi observada tal taxa de mortalidade no grupo piloto-orgânico. Podem ser atribuídos à adubação orgânica benefícios como o tamponamento de acidez, adequada alcalinidade e salinidade do solo, além do aumento da capacidade de retenção de água (CHEN, 2006; HALSALL, 1993).

Na avaliação dos parâmetros de crescimento em plantas inoculadas e não inoculadas, de forma geral, foram verificadas diferenças entre grupos de tratamento somente após 60 DPI.

No lote de plântulas não inoculadas, observou-se que os fertilizantes orgânicos (farinha de osso e torta de algodão) e convencional (NPK líquido 10:10:10) atuaram de forma semelhante no aumento dos seguintes parâmetros de crescimento: comprimento foliar, volume radicular, massa fresca foliar, massa seca foliar e radicular. Corroborando estes resultados, Pires et al. (2009) constatou que não houve diferença significativa na produção final de maracujazeiro-amarelo ao utilizar tratamento convencional ou torta de filtro, com e sem cobertura morta junto com farinha de osso, composição semelhante ao da adubação orgânica utilizada neste projeto. Experimentos de campo realizados por Singh et al. (2007) mostraram que diferentes adubações orgânicas causaram efeitos estatisticamente semelhantes à aplicação de NPK em termos de produção de biomassa e rendimento da colheita. Os autores testaram adubações a base de estrume, resíduos do processamento de cana, chorume e vermicomposto, e verificaram incremento de 44 a 69% de carbono orgânico no solo e aumento de atividade microbiana.

O único parâmetro de crescimento que apresentou diferença significativa entre os grupos Orgânico e Convencional foi massa fresca radicular ($O > C$). Tal resposta pode estar relacionada ao alto teor de NH_4^+ presente no fertilizante convencional. De acordo com Fernandes (1978), grandes quantidades de N amoniacal podem levar a um acúmulo de N-amino livre, que se reflete na redução do peso fresco da planta. Paralelamente à menor média de massa fresca radicular, o grupo Convencional (C) também apresentou maior média de aminoácidos livres radiculares (N-amino) em relação ao grupo Orgânico (O). Fernandes (1990) observou que há relação negativa entre os teores de N-amino livres no tecido e a matéria fresca, independente dos fatores de causaram o acúmulo de N-amino.

Nos grupos inoculados não houve diferença entre os grupos *Enterobacter*-Orgânico (EO) e *Enterobacter*-convencional (EC) em nenhum dos parâmetros de crescimento, o que reforça a eficiência de ambos os fertilizantes. O baixo incremento de massa fresca radicular observado no grupo C, não foi visto no grupo EC. A utilização de parte do NH_4^+ pelas bactérias do grupo EC pode ter evitado o acúmulo de N-amino livre nas raízes e sua conseqüente redução de massa fresca. Problemas referentes à coleta das plântulas do grupo C também podem ser considerados, uma vez que as raízes das plantas micropropagadas são muito finas e passíveis de rompimento.

Comparando os grupos fertilizados não inoculados com aqueles inoculados com *Enterobacter* ICB481, observou-se que, ao final de 60 DPI, não houve diferenças entre as médias de comprimento foliar, massa fresca foliar, massa seca foliar e radicular ($O = EO$ e $C = EC$), evidenciando que nesses parâmetros medidos, não houve influência bacteriana. Além disso, salienta-se, mais uma vez, os efeitos equivalentes entre a utilização de adubações orgânica e convencional sobre o crescimento das plântulas. Mahfouz e Sharaf-eldin (2007) obtiveram diferentes resultados em erva doce ao utilizarem fertilizante convencional (50% da quantidade recomendada) adicionado de biofertilizante à base de linhagens de *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum lipoferum*, e *Bacillus megatherium*. Foram verificados aumentos de altura, número de folhas, massa fresca e seca em relação ao tratamento convencional sem bactérias. Outro estudo, utilizando adubação orgânica (50% da quantidade recomendada) adicionada de biofertilizante a base de *Bacillus* sp. *B. subtilis*, *B. erythropolis*, *B. pumilus* e *Phyllobacterium rubiacearum* comprovou acréscimo de 34% de massa seca em aipo em relação ao cultivo que utilizou apenas adubação orgânica (YOUNG et al., 2004). Vale ressaltar que as linhagens utilizadas em tais estudos foram isoladas de rizosfera, e os incrementos observados nas produções

podem ser atribuídos a benefícios como a solubilização do fosfato inorgânico contido tanto nos fertilizantes orgânicos como no rizoplane (YOUNG et al., 2004). Pesquisas a respeito dos efeitos da inoculação de bactérias endofíticas em conjunto com fertilizações orgânica ou convencional são escassas na literatura. O que se observa são estudos envolvendo inoculação de bactérias endofíticas em plantas que recebem soluções de nitrato ou amônio (DONATO et al., 2003; SEVILLA et al., 2001).

Efeitos benéficos relacionados à inoculação de *Enterobacter* ICB481 foram observados nos grupos fertilizados (EO e ES) nos parâmetros de volume radicular e massa fresca radicular, que obtiveram maiores médias em relação aos grupos não inoculados (O e C). Estes resultados podem estar relacionados à produção e liberação de fitormônios promotores de crescimento por parte das bactérias. Além da fixação de nitrogênio, bactérias podem contribuir para as plantas com produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal como aminoácidos, poliaminas, e fitormônios como as auxinas e o etileno (THULER et al., 2003). O ácido indol-3-acético (AIA) é um fitormônio da classe das auxinas envolvido em vários processos de crescimento vegetal, dentre eles a divisão e diferenciação celular. As maiores concentrações de AIA na planta ocorrem em sementes e em regiões de constante crescimento, como pontas de raízes, gemas apicais e laterais e inflorescências (TAIZ; ZIEGER, 2002). Mirza et al. (2001) descreveram quatro isolados de *Enterobacter* produtores de AIA. A linhagem *Enterobacter* sp. ICB481 demonstrou capacidade de produzir *in vitro*, os fitormônios AIA e etileno (FERRARA, 2010). Após nove dias de crescimento, ICB481 foi capaz de produzir concentração de AIA 25 vezes maior que a concentração obtida em 14 dias pela linhagem de maior produção isolada por Mirza et al. (2001). ICB481 ainda foi capaz de produzir o fitormônio etileno, responsável por várias funções, como a indução na formação de raízes e pêlos radiculares (TAIZ; ZIEGER, 2002). Portanto, a possível liberação de fitormônios por *Enterobacter* sp. ICB481 no interior da planta pode ter auxiliado no desenvolvimento radicular.

As menores médias para os parâmetros de crescimento foram obtidas no grupo sem adubação (S). Tais medidas podem ser explicadas pela condição de carência de nitrogênio na qual as plântulas deste grupo se encontravam. A limitação de nitrogênio influencia no desenvolvimento, produtividade e biomassa da planta (LEMAÎTRE et al., 2008). Em condições de pouca disponibilidade de N combinado, plantas C4 conseguem alocar parte do N disponível para o crescimento de novas folhas e raízes devido à sua alta eficiência fotossintética por unidade

de N, porém, quanto maior a carência deste elemento menor será a taxa de crescimento foliar (SAGE; PEARCY, 1987). Efeitos semelhantes aos encontrados nestas plântulas foram relatados em outras espécies vegetais, como em estêvia (*Stevia rebaudiana*) e aceroleira (*Malpighia emarginata*), que apresentaram desenvolvimento reduzido, folhas pequenas, pouca ramificação e clorose generalizada em condições N limitantes (FERNANDES et al., 2000; LIMA FILHO; MALAVOLTA, 1997). Em trigo, o nitrogênio influencia fortemente o crescimento durante os estágios iniciais, afetando diretamente produção e sobrevivência da planta (MUNDSTOCK; BREDEMEIER, 2001). Por constituir principalmente ácidos nucleicos, proteínas e clorofila que participam como elementos importantes do metabolismo e estrutura da planta, é esperado que, com a limitação de nitrogênio, o desenvolvimento vegetal seja comprometido.

As plântulas do grupo Sem adubação (S) também apresentaram o menor teor de clorofila total em relação aos demais grupos. Segundo Lima Filho e Malavolta (1997), há forte correlação entre o teor de N foliar e a clorofila total. Plantas deficientes em N apresentaram as folhas mais velhas com teor de clorofila menor que as folhas mais novas. Nessas folhas mais velhas as proteínas seriam hidrolisadas, resultando em aminoácidos livres redistribuídos para folhas novas e outras regiões apicais. A proteólise causa o colapso dos cloroplastos, diminuindo o conteúdo de clorofila (MENGEL; KIRKBY, 1982). A disponibilidade de nitrogênio afeta diretamente o crescimento e a densidade das raízes. A densidade radicular aumenta rapidamente em locais com a presença de fertilizantes nitrogenados (MARSCHNER, 1995; SARMENTO et al., 2008).

No lote de plântulas inoculadas com *Enterobacter* sp. ICB481, ao contrário do que ocorreu com o lote não inoculado, em nenhum momento os parâmetros de crescimento do grupo não adubado (ES) apresentou-se menor em relação aos grupos adubados (EO e EC). O mesmo foi constatado para os resultados de teor de clorofila total. Comparando os grupos sem adubação (S) e *Enterobacter*-sem adubação (ES), constatou-se apenas efeitos benéficos relacionados à inoculação. Pode-se sugerir que os efeitos benéficos da inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 nas plântulas não adubadas estão associados à fixação biológica de nitrogênio, uma vez que este grupo de tratamento não recebeu nenhuma fonte de nitrogênio combinado durante todo o período de experimentos. A capacidade fixar N_2 representa uma vantagem competitiva aos microrganismos diazotróficos, pois permite que estes sobrevivam em ambientes carentes de N-combinado, utilizando-se do N_2 atmosférico (KIM; REES, 1994). Várias linhagens do gênero *Enterobacter* sp., são capazes de fixar nitrogênio e podem ser encontradas associadas a muitas

espécies vegetais (PENG et al., 2009). Uma vez que *Enterobacter* sp. ICB481 apresentou atividade da enzima nitrogenase *in vitro* (FERRARA, 2010), pode-se supor que enzima encontrava-se ativa também quando as bactérias estavam colonizando as plântulas e que houve condições de transferência de N fixado.

Resultados semelhantes para o aumento do comprimento foliar em plântulas inoculadas em situação de carência de N combinado foram constatados por Sevilla et al. (1998). Ao inocularem uma linhagem endofítica selvagem de *Azospirillum* em plântulas de cana micropropagadas, as plantas apresentaram maior altura em relação àquelas não inoculadas.

O incremento de massa fresca obtido com a inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 sem adição de nitrogênio combinado (ES) também foi verificado em experimento realizado por Sevilla et al. (2001) em plantas inoculadas com *Azospirillum*. Estas plantas tiveram maior incremento de massa e conteúdo nitrogenado em relação àquelas não inoculadas. Este incremento foi verificado principalmente nos caules. Pode-se sugerir que, se os experimentos do presente trabalho fossem conduzidos até o desenvolvimento de caule nas plântulas, o incremento de massa desse órgão, em condições de carência de N combinado, seria superior em plântulas inoculadas com *Enterobacter* sp ICB481 do que em plântulas não inoculadas.

Em estudo realizado por Ruppel, Rühlmann e Merbach (2006), a inoculação de *Enterobacter radicincitans* em *Brassica oleracea* induziu crescimento significativo em todas as partes da planta. A maior taxa de crescimento foi verificada no sistema radicular, onde as plantas inoculadas apresentaram raízes com maior incremento de massa seca em relação às não inoculadas. Estes dados corroboram o maior incremento de massa seca radicular promovido pela inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 em condições de carência de nitrogênio (ES>S). Além disso, corroboram os maiores volumes e massas frescas radiculares presentes em todos os grupos inoculados em relação aos não inoculados.

De acordo com Korndörfer et al. (1989) quanto maior o sistema radicular de uma planta maior será sua capacidade de explorar o solo e aproveitar nutrientes e água disponíveis. Efeitos benéficos relacionados com a inoculação de bactérias endofíticas foram observados em raízes. Estes órgãos apresentaram aumento de comprimento, biomassa e de número de raízes laterais. (MAYAK; TIROSH; GLICK, 1999; MEHNAZ et al., 2010). Essas alterações podem ser atribuídas à liberação de fitormônios pelas bactérias. Por se tratar de uma substância nitrogenada, o AIA, em condições de ausência de N combinado, seria produzido graças à fixação biológica de

N atmosférico. A possível liberação de AIA por *Enterobacter* sp. ICB481 no interior da planta pode ter auxiliado também o desenvolvimento foliar e o incremento de biomassa citado anteriormente no grupo ES (FERRARA et al., 2012).

A fixação biológica de nitrogênio pode contribuir com o aumento no conteúdo de N das plantas hospedeiras. Este aumento pode ser mensurado pela determinação de N total, teores de amônio, nitrato, aminoácidos livres e pela quantificação de proteínas (BERGERSEN, 1980)

Quantificação de nitrato, amônio, aminoácidos, proteínas livres e açúcares solúveis:

Em todos os grupos, inoculados e não inoculados, a concentração de nitrato foliar livre foi menor em relação à radicular, o que pode ser atribuído a uma maior atividade da enzima nitrato redutase (NR) nos tecidos foliares, reduzindo o nitrato. De acordo com Magalhães (1993) a capacidade das raízes e da parte aérea das plantas em reduzir o nitrato absorvido varia amplamente com a espécie e a fase de desenvolvimento do vegetal. A atividade da NR é baixa nas folhas em início de expansão, atinge valores máximos quando elas se tornam expandidas. Segundo Bredemeier e Mundstock (2000), durante o rápido crescimento vegetativo, são altas as taxas de redução de nitrato e síntese de aminoácidos nas folhas. Ali mesmo, grande parte dos aminoácidos já é utilizada na síntese de clorofila, de rubisco e outras proteínas.

Nos grupos não inoculados observam-se concentrações estatisticamente iguais de nitrato solúvel nas raízes dos grupos Orgânico (O) e Convencional (C). A fonte de nitrogênio combinado presente na torta de algodão (componente do fertilizante utilizado neste estudo) é constituída principalmente de proteínas brutas (46% da composição) (ARAÚJO, 2003). Pode-se sugerir que a planta utilizou como fonte de N para seus processos metabólicos, aminoácidos provenientes da degradação dessas proteínas por parte de microorganismos presentes no substrato. Assim, o nitrato absorvido pelas raízes não seria utilizado, sendo então estocado em vacúolos do tecido radicular. Parte desse nitrato seria mobilizada para as folhas onde também seria estocada, o que justificaria a maior concentração de nitrato foliar deste grupo em relação aos demais. Vinall et al. (2012), afirma que aminoácidos podem ser absorvidos e utilizados como fonte de nitrogênio por diversas espécies vegetais, incluindo cana-de-açúcar. Já no grupo convencional (C), a alta solubilidade do NO_3^- , única fonte de N presente na composição do NPK, permitiria a elevada absorção deste íon. Nestas condições, o nitrato acumulado nos vacúolos (“pool” de reserva), pode ser, mais tarde, metabolizado para o crescimento da planta (FERNANDES; ROSSIELO, 1995). Dessa forma, uma parte do nitrato absorvido no grupo Convencional seria incorporada e outra

seria estocada. A baixa concentração de nitrato foliar neste mesmo grupo estaria relacionada à rápida conversão de nitrato, mobilizado das raízes, a amônio e sua utilização na síntese de aminoácidos e proteínas, dados estes confirmados pela grande concentração de proteínas detectada.

No grupo Sem adubação (S) verificou-se uma baixa concentração de nitrato livre tanto nos tecidos das raízes quanto das folhas, fato atribuído à condição de carência de nitrogênio.

A inoculação de *Enterobacter sp.* ICB481 teve como consequência menor concentração de nitrato solúvel radicular no grupo *Enterobacter*-orgânico em relação ao Orgânico (EO<O), o que sugere a influência da bactéria na redução de nitrato. Ferreira et al. (1987) observou que plantas de trigo inoculadas com estirpes mutantes de *Azospirillum brasilense* NR negativa, apresentaram maior atividade da NR na parte aérea em relação à plantas inoculadas com a estirpe selvagem (NR positiva). Ocorreu, portanto, maior translocação de NO_3^- para a parte aérea nas plantas inoculadas com as mutantes e, ao contrário, uma maior redução de NO_3^- nas raízes das plantas inoculadas com a estirpe selvagem. A estirpe selvagem teria reduzido o nitrato da raiz, favorecendo a translocação do nitrogênio já incorporado em cadeias de carbono, para a parte aérea. A linhagem bacteriana *Enterobacter sp.* ICB481 demonstrou *in vitro* a capacidade de reduzir nitrato (nitrato redutase positiva), dessa forma no grupo *Enterobacter*-orgânico (EO) as bactérias poderiam ter reduzido parte do nitrato absorvido pelas plantas, liberando compostos nitrogenados já incorporados em cadeias de carbono, como aminoácidos. Estes favoreceriam a síntese de proteínas vegetais, o que justificaria o maior incremento protéico do grupo *Enterobacter*-orgânico (EO) em relação ao Orgânico (O).

Outra hipótese a ser considerada é que haveria, em função da inoculação bacteriana, o incremento da atividade das enzimas NR e NiR. O produto, NH_4^+ , estimularia o sistema enzimático GS/GOGAT, o que resultaria em uma alta disponibilidade de aminoácidos que já seriam prontamente convertidos em proteínas. No entanto, para comprovar tal hipótese seriam necessários mais experimentos.

A inoculação de *Enterobacter sp.* ICB481 não influenciou a concentração de nitrato radicular no grupo *Enterobacter*-convencional (EC=C). A concentração de nitrato livre foliar, no entanto, mostrou-se significativamente maior (EC>C). Isto pode ser explicado por maior absorção de NO_3^- pelo grupo EC; o NO_3^- seria translocado inalterado para a parte aérea da folha, onde seria estocado. O efeito das bactérias no maior aporte de nitrato, segundo Mantelin et al.

(2006) é indireto, decorrente de sua atuação na promoção de crescimento radicular, por meio da liberação de fitormônios como auxinas. O grupo *Enterobacter*-convencional apresentou maior volume radicular em comparação ao grupo convencional, o que reforça esta hipótese.

Não foi possível detectar concentrações confiáveis de amônio nos tecidos vegetais com a metodologia proposta por Weatherburn (1967), pois os valores obtidos ficaram abaixo do limite de detecção. Segundo Souza (2002), em plantas superiores, a concentração de NH_4^+ é normalmente baixa, sendo este íon rapidamente convertido a aminoácidos.

Nas medidas de concentração de aminoácidos dos grupos não inoculados, observa-se maior concentração de aminoácidos livres foliares no grupo Orgânico (O) em relação aos demais. De acordo com Fernandes (1991), a concentração de aminoácidos livres varia de acordo com a nutrição níttrica aplicada no vegetal. Em experimento realizado com plantas de arroz, observou que plantas que receberam maior concentração de N apresentaram menor acúmulo de aminoácidos na parte aérea em relação àquelas que receberam menores dosagens. De acordo com Chen (2006), os fertilizantes orgânicos possuem a taxa de liberação de nutrientes mais lenta e gradual, o que consiste em uma característica importante para reduzir a lixiviação de N. Esta característica pode ter favorecido o maior acúmulo de aminoácidos livres nas folhas do grupo Orgânico. Além disso, o fato da adubação orgânica disponibilizar proteínas e aminoácidos como fonte de N pode ter auxiliado na obtenção deste resultado. Por outro lado, a alta concentração de N solúvel disponibilizado na fertilização convencional pode ter ocasionado a menor concentração de aminoácidos foliares no grupo Convencional (C) em comparação com o grupo Orgânico (O).

A concentração de aminoácidos livres nas raízes dos grupos fertilizados não inoculados (O e C) foi inversa à encontrada nas folhas, o que sugere que os aminoácidos do grupo Orgânico são preferencialmente translocados à parte aérea, enquanto que em situação de excesso de N os aminoácidos ficam retidos nas raízes.

A inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 induziu uma menor concentração de aminoácidos livres nos grupos EO e EC em relação às concentrações em plantas dos grupos O e C. Este fato pode estar relacionado com a utilização de parte desses aminoácidos pela própria bactéria ou, como sugerido anteriormente, a um estímulo provocado pela inoculação, que resultaria na maior atividade das enzimas envolvidas nos processos de redução do nitrato a amônio, e daquelas envolvidas na formação de aminoácidos. Este estímulo aumentaria a incorporação de N na forma de proteínas, o que resultaria em poucos aminoácidos livres.

A baixa concentração de aminoácidos nos tecidos foliar e radicular do grupo Sem adubação (S) está relacionada com a condição de carência de N. Pode-se observar, no entanto, que em plantas inoculadas há maior conteúdo de aminoácidos na parte aérea. Esta maior concentração de aminoácidos pode ser atribuída à fixação biológica de nitrogênio. A bactéria poderia disponibilizar N combinado para a planta na forma de NH_4^+ ou mesmo na forma de aminoácidos, como foi demonstrado em linhagens de *Enterobacter in vitro* por Ferrara (2010).

Quanto às medidas de conteúdo protéico total, foram consideradas as concentrações por massa fresca total da planta. No lote não inoculado, observou-se que ao final de 60 DPI, a média obtida no grupo Convencional (C) foi muito maior em relação aos demais grupos de tratamento. Pelo fato de todos os parâmetros de crescimento terem sido equivalentes para os grupos Orgânico (O) e Convencional (C), e os de conteúdo protéico terem divergido, pode-se pensar na hipótese de que, por possuir fontes de carbono em sua composição, a adubação orgânica pôde fornecer fonte de carbono extra, além daquela obtida pela fixação de CO_2 . A fertilização convencional supre as plantas apenas com nitrogênio, fósforo e potássio, não oferecendo nenhuma fonte de carbono, porém a incorporação de C fixado por unidade de N é facilitada pela solubilidade do N do fertilizante. Isso explicaria a equivalência dos parâmetros de crescimento entre os grupos orgânico e convencional.

A adubação orgânica adotada neste estudo possui composição média de 46% de proteína bruta, 4,6% de extrato etéreo (gorduras), 11,4% de fibra bruta dentre outros elementos (ARAÚJO et al., 2003). Estes compostos, uma vez degradados, serviriam como fontes de nitrogênio e carbono para as plantas. A maior fonte de aminoácidos para os vegetais é, provavelmente, produto de hidrólise de proteínas e peptídeos gerados por ação de enzimas extracelulares (LIPSON; NÄSHOLM, 2001). Recentemente tem sido evidenciada a importância da captação de aminoácidos pelas plantas e vários transportadores radiculares têm sido identificados (KIELLAND, 1994; NÄSHOLM et al., 2009). A absorção de aminoácidos é provavelmente menor que a de NH_4^+ mas maior que a de NO_3^- na maioria das espécies de plantas (NÄSHOLM et al., 2009). A incorporação de N do adubo orgânico seria mais baixa que do fertilizante convencional, já solúvel. Isso explicaria a menor quantidade de proteína no grupo orgânico mesmo que a incorporação de C tenha sido equivalente.

No lote inoculado com *Enterobacter* sp. ICB481 não houve diferença entre as concentrações protéicas dos três grupos de tratamento ao final de 60 DPI. No grupo

Enterobacter-sem adubação (ES) a média foi equivalente aos demais grupos inoculados (EO e EC) mesmo não recebendo fonte de nitrogênio. Este fato pode ser explicado pela capacidade da linhagem de *Enterobacter* sp. ICB481 não só fixar nitrogênio, mas também de transferi-lo à planta, visto que a única fonte de nitrogênio que poderia ser utilizada seria aquela proveniente da atmosfera (OLIVEIRA et al., 2011).

Comparando as concentrações de proteínas dos dois lotes, pôde-se verificar que, ao final de 60 DPI, todos os grupos inoculados (EO, EC e ES) obtiveram maiores médias em relação aos não inoculados (O, C e S). Os valores atingidos dentro lote *Enterobacter* foram bastante similares entre si. O conteúdo protéico do grupo *Enterobacter*-convencional (EC), no entanto, não foi significativamente distinto do obtido no grupo convencional (C). É bastante evidente que ocorreu uma contribuição bacteriana comparando-se os grupos sem adubação (S) e *Enterobacter* sem adubação (ES). O conteúdo protéico subiu três vezes, fato este que sugere a transferência de N-combinado da bactéria para a planta, produto da fixação de N_2 . Em plantas não leguminosas ainda não está estabelecida a possível forma em que o N fixado pela bactéria endofítica seria transferido para o vegetal. Se fosse liberado como aminoácidos, favoreceria de imediato a síntese de proteínas. Thuler et al. (2003) isolaram uma linhagem de *Azospirillum* sp do interior de raiz de mandioca que apresentava capacidade de liberar diversas substâncias nitrogenadas em meio de cultura, dentre elas aminoácidos. Ferrara (2010) demonstrou *in vitro* a liberação ativa de aminoácidos em meio de cultura por linhagens endofíticas de *Enterobacter* sp. isoladas de cana-de-açúcar. Martins (2007), realizando experimentos com calos de cana-de-açúcar, obteve resultados semelhantes aos encontrados nas plântulas do lote inoculado: calos inoculados com linhagens do gênero *Enterobacter* apresentaram o acréscimo de conteúdo protéico ao final de 60 dias.

Em estudo realizado por Sabino (2003) com plantas de arroz, foi observado que plantas em período vegetativo, que não receberam fonte de N ou receberam em dose reduzida (40 kgN/ha) e que foram inoculadas com bactérias endofíticas diazotróficas (*Azospirillum* e *Herbaspirillum*) obtiveram as maiores concentrações de açúcares nos tecidos em relação àquelas que receberam maiores dosagens de N (em forma de NH_4^+). Dados semelhantes foram obtidos neste trabalho: os grupos adubados com fertilizante orgânico (O e EO) e não adubados (S e ES) apresentaram maiores concentrações de açúcares solúveis em relação aos grupos adubados

convencionalmente (C e EC). Vale ressaltar que em cana-de-açúcar, torna-se importante o acúmulo de açúcares.

A inoculação de *Enterobacter* sp. não exerceu influência sobre as concentrações de açúcares solúveis foliares. Também não foi verificada relação entre os teores de açúcar nos tecidos de raízes e folhas e as concentrações de aminoácidos livres nas diferentes partes da planta. Estes dados correspondem aos obtidos no estudo de Sabino (2003), porém diferem daqueles obtidos por Fernandes (1991), onde o aumento do acúmulo de N-amino livre resultou em redução no teor de açúcar solúvel nos tecidos da planta.

Segundo Gomes (2002) se a disponibilidade de nitrogênio é baixa, mas existe uma adequada síntese de carboidratos e umidade no solo o crescimento vegetativo será lento, tendo as plantas uma aparência verde-amarelada, com abundância em carboidratos de reserva. Esta situação corresponde àquela encontrada no grupo Sem adubação (S). As respostas fisiológicas do vegetal também correspondem àquelas apresentadas pelas plântulas deste grupo. Ao se inocular *Enterobacter* sp. ICB481, as plantas não adubadas (ES) não mais apresentaram os sinais fisiológicos relacionados com a carência de nitrogênio, sem alterar o perfil de açúcares solúveis.

Ainda segundo o autor, se o nitrogênio encontra-se em excesso no solo e existem condições apropriadas para a fotossíntese, as plantas apresentarão um bom crescimento vegetativo, coloração verde-escura, sendo ricas em nitrogênio, porém com menor concentração de carboidratos solúveis. Esta situação pode ser comparada aos grupos adubados com fertilizante convencional (C e EC). Pôde-se observar menor concentração de açúcares solúveis em relação aos demais grupos.

Configura-se como condição ideal para o crescimento e desenvolvimento das plantas se as concentrações de nitrogênio e carboidratos estão em estado de equilíbrio adequado (GOMES 2002). Esta situação foi correspondente àquela dos grupos adubados organicamente (O e EO).

Os dados obtidos com plantas fertilizadas com adubo orgânico mostraram que não houve prejuízo às plantas frente a esse tratamento. Houve respostas iguais à adubação convencional para os parâmetros de crescimento e teores de clorofila total. Estes dados estão de acordo com Pires et al. (2009). Se utilizada juntamente com a inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 há ainda o incremento protéico, tornando esse parâmetro também equivalente ao dos grupos que utilizaram fertilizante convencional (EC e C).

Teste de colonização bacteriana: Os resultados obtidos no teste de colonização de *Enterobacter* sp. ICB481 nos tecidos internos das plântulas de cana comprovam que esta linhagem bacteriana é uma endofítica verdadeira. De acordo com Hallmann et al. (1997), a capacidade de colonizar e viver nos tecidos internos das plantas sem causar-lhes prejuízos caracteriza uma endofítica verdadeira. Estas bactérias ao serem isoladas do interior da planta hospedeira, devem ser capazes de recolonizá-las.

Apesar das populações bacterianas terem variado dentro dos grupos de tratamento ao longo do experimento, após 60 DPI observou-se a tendência dessas populações se manterem nos tecidos do vegetal. *Enterobacter* sp. é descrita na literatura como endofítica de diversas espécies vegetais como plantas cítricas, soja, milho e cana de açúcar (ARAUJO et al., 2002; LIN et al., 2012; ZINNIEL et al., 2002).

6 CONCLUSÕES

- A bactéria endofítica diazotrófica *Enterobacter* sp. ICB481 disponibiliza nitrogênio fixado a plântulas de cana-de-açúcar em situação de carência de N combinado.
- *Enterobacter* sp. ICB481 promove aumento de comprimento foliar, volume radicular, massas fresca e seca e teor de clorofila em plântulas submetidas à carência de N combinado.
- *Enterobacter* sp. ICB481 promove o maior aumento de massa fresca e volume radicular em plântulas fertilizadas orgânica ou convencionalmente em relação às plântulas fertilizadas e não inoculadas.
- *Enterobacter* sp. ICB481 promove maior incremento de conteúdo protéico em plântulas adubadas organicamente e em carência de N combinado, em relação às plântulas não inoculadas e adubadas organicamente ou sem adubação.
- *Enterobacter* sp. ICB481 interfere nos perfis de concentração de nitrato solúvel foliar, aminoácidos livres foliares e radiculares, e açúcares solúveis radiculares.
- A fertilização orgânica atua de forma equivalente à convencional para os parâmetros de crescimento vegetal e clorofila total, tanto em plântulas inoculadas quanto não inoculadas.
- A fertilização convencional promove maior aumento no conteúdo protéico que o tratamento orgânico ou a ausência de N combinado em plântulas não inoculadas.

REFERÊNCIAS

- ANJOS, I. A. et al. Effects of organic fertiliser and harvest date on quality and agricultural yield and of raw-sugar of two sugarcane cultivar (plant cane). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 59-63, 2007.
- ARAÚJO, A. E. et al. **Cultura do algodão herbáceo na agricultura familiar**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Algodao/AlgodaoAgriculturaFamiliar/subprodutos.htm>> Acesso em: 10 maio 2011.
- ARAUJO, W. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 10, p. 4906-4914, 2002.
- ASIS, C. A.; ADACHI, K. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and non diazotroph *Enterobacter asburiae* from sweet potato stem in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 19-23, 2004.
- ASTARITA, L. V.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W. Free amino acids, protein and water content changes associated with seed development in *Araucaria augustifolia*. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 53-59, 2004.
- AZEVEDO, J. L. et al. Endophytic microorganisms a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p.105-110, 2000.
- BARKER, A. V.; MILLS, H. A. Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops. **Horticultural Review**, v. 2, p. 395-423, 1980.
- BARBOSA, H. R. et al. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. **Journal of Microbiology Methods**, v. 22, p. 39-50, 1995.
- BARRAQUIO, W. L et al. Diazotrophic enterobacteria: what is their role in the rhizosphere of rice? In: LADHA, J. K.; REDDY, P. M. (Ed.). **The quest for nitrogen fixation in rice**. Manila: International Rice Research Institute, 2000. p. 93-118.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BASHAN, Y.; SINGH, M.; LEVANONY, H. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, p. 2429-2434, 1989.

¹De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERGERSEN, F. J. Measurement of nitrogen fixation by direct means. In: BERGERSEN, F. J. (Ed.). **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. Michigan, USA: J. Wiley, 1980. p. 65-110.

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

BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in sugarcane: a key to energetically viable biofuel production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, p. 265-279, 1995.

BOKHTIAR, S. M.; SAKURAI, K. Effects of organic manure and chemical fertilizer on soil fertility and productivity of plant and ratoon crops of sugarcane. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 51, p. 325-334, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, p. 365-372, 2000.

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry & molecular biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, p. 1367, 2000.

CARVALHO, G. G. P. et al. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 125-132, 2006.

CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determinations of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.

CHANWAY, C. P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. **Forest Science**, v. 43, p. 99-112, 1997.

CHEESMAN, O. D. The environmental impacts of sugar production: the cultivation and processing of sugarcane and sugar beet. **CAB International**, p. 255, 2004.

CHEN, J. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON SUSTAINED MANAGEMENT OF THE SOIL-RHIZOSPHERE SYSTEM FOR EFFICIENT CROP PRODUCTION AND FERTILIZER USE. Thailand, 2006. **Anais...** Thailand: Land Development Department, 2006. p.16-20.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar. Safra 2011/2012 – primeiro levantamento: maio de 2011.** Brasília. CONAB, 2011.

CONKIN, P. K. **A revolution down on the farm: the transformation of American agriculture since 1929.** Lexington: University Press of Kentucky, 2008. 223 p.

COPERSUCAR. Terceira geração de variedades de cana Copersucar. **Boletim Técnico – edição especial**, p. 1-28, 1991.

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

CRUZ, J. L.; PELACANI, C. R.; ARAÚJO, W. L. Efeito do nitrato e amônio sobre o crescimento e eficiência de utilização de nitrogênio em mandioca. **Bragantia**, v. 65, p. 467-475, 2006.

DALTON, D. A.; KRAMER, S. Nitrogen-fixing bacteria in non-legumes. In: GNANAMANICKAM, S. S. (Ed). **Plant-associated bacteria.** Netherlands: Springer, 2007. p. 105-130.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas.** Brasília. Embrapa. p. 60, 1995.

DONATO, V. M. T. S. et al. Metabolismo de plantas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1373-1379. 2003.

DUBOIS, M. K. A. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FERNANDES, A. A. et al. Sintomatologia das deficiências minerais e quantificação de macronutrientes em mudas de acerola. **Revista Ceres**, v. 47, p. 639-650, 2000.

FERNANDES, M. S. Effects of environmental stress on the relationship of free amino-N to fresh weight of Rice plants. **Journal of Plant Nutrition**, v. 14, p. 1151-1164, 1991.

FERNANDES, M. S.; ROSSIELLO, R. O. P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, p. 111-148, 1995.

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.).** 166 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

FERRARA, F. I. S. et al. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growth-promoting substances. **Plant and Soil**, v. 353, p. 409–417, 2012.

FERREIRA, A. L. **Embrapa desenvolve produto inédito que reduz uso de fertilizantes na produção de cana-de-açúcar**. Disponível em: <www.agrosoft.org.br/?q=node/100825>. Acesso em: 29 jul 2008.

FERREIRA, M. C. B.; FERNANDES, M. S.; DÖBEREINER, J. Role of *Azospirillum* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. **Biology and Fertility of Soils**, v. 4, p. 47-53, 1987.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2011. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>> Acesso em: 02 maio 2012.

GALVÃO L. S., FORMAGGIO A. R., TISOT D. A. Discrimination of sugarcane varieties in southeastern Brazil with EO-1 Hyperion data. **Remote Sensing of Environment**, v. 94, p. 523-34, 2005.

GEORGE, E. F.; HALL, M. A.; DE KLERK, G-J. **Plant propagation by tissue culture: the background**. 3rd ed. Dordrecht, Netherlands. Springer, 2008. 501 p.

GOMES, A. A. **Distribuição de carboidratos e nitrogênio em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas**. 268 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002.

HALLMANN, J. et al. Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biochemistry**, v. 7, p. 925-937, 1998.

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

HALSALL, D. M. Inoculation of wheat straw to enhance lignocellulose breakdown and associated nitrogenase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p. 419-429, 1993.

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

IRVINE, J. E. Sugarcane agronomy. In: JAMES, G. (Ed.) **Sugarcane**. 2nd ed. New York, USA. John Wiley and Sons, 2004. 224 p.

KIELLAND, K. Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. **Ecology**, v. 75, p. 2373-2383, 1994.

KIERS, E. T.; WEST, S. A.; DENISON, R. F. Maintaining cooperation in the legume-rhizobia symbiosis: identifying selection pressures and mechanisms. In: DILWORTH, M. J. et al (Eds). **Nitrogen-fixing leguminous symbioses nitrogen fixation: origins, applications and research progress**. Netherlands: Springer, 2008. 402 p.

KIM, J.; REES, D. C. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. **Biochemistry**, v. 33, p. 379-397, 1994.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effect on plants and uses in agriculture. **Microbial Endophytes**. Washington: Marcel Dekker, 2000. p. 199-233.

KORNDÖRFER, G. H. et al. Resposta da cana-planta à diferentes fontes de fósforo. **Boletim técnico Copersucar**. v. 45, p. 31-37, 1989.

KUKLINSKY-SOBRAI, J. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 12. p. 1244-1251, 2004.

LADHA, J. K. et al. Efficiency of fertilizer nitrogen in cereal production: retrospects and prospects. In: SPARKS, D.L. (Ed). **Advances in agronomy**. Amsterdam. Netherlands. Elsevier Academic Press. 2005, v. 85 , 446 p.

LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. **Nature**, v. 251, p. 614-616, 1974.

LEMAITRE, T. et al. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. **Plant Cell Physiology**, v. 49, p. 1056–1065, 2008.

LEMOS, G. B. de. **Crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio**. 56 f. (Tese de Mestrado). Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais. 1996.

LIMA FILHO O. F.; MALAVOLTA E. Sintomas de desordens nutricionais em estêvia *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. **Scientia Agrícola**, v. 54, p. 53-61, 1997.

LIN, L. et al. Plant Growth-promoting Nitrogen-fixing Enterobacteria Are in Association with Sugarcane Plants Growing in Guangxi, China. **Microbes and Environments**, 2012. In press - doi./10.1264/jsme2.ME11275.

LIPSON, D. A.; NÄSHOLM, T. The unexpected versatility of plants: organic nitrogen use and availability in terrestrial ecosystems. **Oecologia**, v. 128, p. 305-316, 2001.

LODEWYCKX, C. et al. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Science**, v. 21, p. 583–606, 2002.

- MAGALHÃES, J. R., et al. Nitrogen assimilation efficiency in maize genotypes under ammonia stress. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, p. 163-166, 1993.
- MAHFOUZ, S. A; SHARAF-ELDIN, M. A. Effect of mineral vs. biofertilizer on growth, yield, and essential oil content of fennelc (*Foeniculum vulgare* Mill.). **International Agrophysics**, v. 21, p. 361-366, 2007.
- 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.
- MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1995.
- MARTINS, R. C. R. **Associações *in vitro* de bactérias endofíticas diazotróficas com células de cana-de-açúcar**. 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.
- MASTRETTA, C. et al. Endophytic bacteria and their potential application to improve the phytoremediation of contaminated environments. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 23, p. 175–207, 2006.
- MATSUOKA, S. et al. Comportamento de variedades de cana-de-açúcar em um sistema orgânico de produção. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB. Recife, 2002. **Anais...** Recife: STAB, 2002. p. 301-308.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Effect of wild-type and mutant plant growth-promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. **Plant Growth Regulation**, v. 18, p. 49-53, 1999.
- MEHNAZ, S. et al. Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 1848-1856, 2010.
- MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. Bern: International Potash Institute, 1982. 655 p.
- MIRZA, M. S. et al. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, v. 237, p. 47-54, 2001.
- MUNDSTOCK, C. M.; BREDEMEIER, C. Disponibilidade de nitrogênio e sua relação com o afilhamento e o rendimento de grãos de aveia. **Ciência Rural**, v. 31, p. 205-211, 2001.
- NÄSHOLM, T. et al. Uptake of organic nitrogen by plants. **New Phytologist**, v. 182, p. 31-48, 2009.

OLIVEIRA, A. L. M et al. The effect of inoculating endophytic N₂ fixing bacteria on micro propagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, Z. M. et al. Diazotrophic rhizobacteria isolated from sugarcane can release amino acids in a synthetic culture medium. **Biology and fertility of soils**, v. 47, p. 957-963, 2011.

PENG, G. et al. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, p. 1650–1655, 2009.

PIRES, A. A. et al. Efeito da adubação alternativa sobre os componentes de produção do maracujazeiro-amarelo. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 31, p. 655-660, 2009.

POSTGATE, J. R. **Nitrogen Fixation**. Cambridge University Press, 1998. 112 p.

QUADT-HALLMANN, A.; KLOPPER, J. W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1144-1154, 1996.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; REIS, V. M. Fixação biológica de nitrogênio na cana-de-açúcar: um tema interessante em tempos de expansão da cultura. **Jornal Agrosoft**. 2007. Disponível em: <www.agrosoft.org.br/?q=node/24996> Acesso em : 29 jul 2008.

ROSENDAHL, L. et al. Assimilation of fixed nitrogen studied by membrane vesicle transport and in vivo spectroscopy in pea. In: PEDROSA, F. O. et al. (Eds). **Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture**. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Netherlands. Springer, 2000. p. 351-354.

RUPPEL, S. et al. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat – an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, v. 145, p. 261–273, 1992.

RUPPEL, S.; RÜHLMANN, J.; MERBACH W. Quantification and localization of bacteria in plant tissues using quantitative real-time PCR and online emission fingerprinting. **Plant and Soil**, v. 286, p. 21–35, 2006.

SABINO, D. C. C. **Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas**. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rural do Rio de Janeiro. 2003.

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

SAGE R. F.; PEARCY R. W. The Nitrogen Use Efficiency of C₃ and C₄ Plants: II. Leaf nitrogen effects on the gas exchange characteristics of *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). **Plant Physiology**, v. 84, p. 959-963, 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSEL D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed., New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 1448 p.

SANTA-CATARINA, C. et al. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis*. **Plant Growth Regulation**, v. 49, p. 237-247, 2006.

SARMENTO, P. et al. Sistema radicular do *Panicum maximum* Jacq. cv. IPR-86 Milênio adubado com nitrogênio e submetido à lotação rotacionada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 27-34, 2008.

SCHOLZ-SEIDEL, C.; RUPPEL, S. Nitrogenase and phytohormone activities of *Pantoea agglomerans* in culture and their reflection in combination with wheat plants. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v. 147, p. 319–328, 1992.

SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V. et al. (Eds). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba. Livroceres. 2006. p. 19-36.

SEHTIYA, H. L.; GOYAL, S. S. Comparative uptake of nitrate by intact seedlings of C3 (barley) and C4 (corn) plant: Effects of light and exogenously supplied sucrose. **Plant and Soil**, v. 227, p. 185-190, 2000.

SEVILLA, M. et al. Contributions of the bacterial endophyte *Acetobacter diazotrophicus* to sugarcane nutrition: A preliminary study. **Symbiosis**, v. 25, p. 181-191, 1998.

SEVILLA, M. et al. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}\text{N}_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif- mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 358-366, 2001.

SILVEIRA, V. et al. Biochemical changes during development in *Pinus taeda* L. **Plant Growth Regulators**, v. 44, p. 147-156, 2004.

SINGH, K. P. et al. Improving quality of sugarcane-growing soils by organic amendments under subtropical climatic conditions of India. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p. 367–376, 2007.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S. **Enzimas de assimilação de nitrogênio em plantas**. Rio de Janeiro, Artware Projetos Culturais, 2002. 57 p.

SOTO-GONZALES, H. H. **Caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio endofíticas isoladas de *Saccharum* sp. cultivada sob adubação orgânica ou fertilizante nitrogenado ou sem adubação**. 141 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SUÁREZ, H. J.; GÓMEZ, J. I.; FRANCIA, S. S. **Programa de fito-mejoramiento y impacto en la producción azucarera cubana**. Vera Cruz, México. Creaciones Graficas Publinica. 2003. 99 p.

TAGHAVI, S. et al. Genome Sequence of the Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium *Enterobacter* sp. 638. **PLoS Genetics**, v.6, p. 1-15, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**, Sunderland: Sinauer Associates. p. 690, 2002.

TANAKA, K. et al. Incorporation of a DNA sequence encoding green fluorescent protein (GFP) into endophytic diazotroph from sugarcane and sweet potato and the colonizing ability of these bacteria in *Brassica oleracea*. **Microbes and Environment**, v. 21, p. 122-128, 2006.

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 DILLEWIJN, C. **Botany of sugarcane**. Waltham, Mass. The Chronica Botanica Co., 1952. 371 p.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VINALL, K. et al. Amino acids are a nitrogen source for sugarcane. **Functional Plant Biology**, In press. 2012. doi.org/10.1071/FP12042.

VITOSH, M. L. N-P-K Fertilizers: types, uses and characteristics. **Michigan State University Bulletin E-896**, Michigan: Michigan State University Cooperative Extension Service, 1990. 4 p.

WEATHEBURN, M. W. Phenol hypochloride reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 971-974, 1967.

WEYENS, N. et al. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 248–254, 2009.

WIENER, J. et al. Multiple Antibiotic-Resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in Nursing Homes. **Journal of American Medical Association**. v. 281, p. 517-523, 1999.

YOUNG, C. C. et al. Characterization of multifunctional biofertilizer from Taiwan and biosafety considerations. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FUTURE DEVELOPMENT OF AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGY PARK - Pingtung, Taiwan 2004. **Anais...** Taiwan: University of Science and Technology, 2004. p. 373-388

ZAKRIA, M. et al. Influence of inoculation technique on the endophytic colonization of rice by *Pantoea* sp. isolated from sweet potato and by *Enterobacter* sp. isolated from sugarcane. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, p. 224–236, 2008.

ZINNIEL, D. K. et al. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2198-2208, 2002.

ANEXO A – Meios de cultura e reagentes

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 1000 ml
pH é ajustado para 6,5-6,8.	

Para meio sólido: 15 g/l de ágar foram adicionados.

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/l de ágar foram adicionados.

c) Solução de Hoagland sem fonte de nitrogênio combinado

K ₂ HPO ₄	1 ml
Ca(Cl) ₂	5 ml
MgSO ₄	2 ml
KCl	5 ml
Micronutrientes.	5 ml
FeEDTA.	10 ml
Água destilada.	QSP1000 ml

Micronutrientes

CuSO ₄ ·5H ₂ O(316 mM)	0,079 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O(275 mM)	0,212 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O(11 mM)	1,81 g
H ₃ BO ₃ (43 mM)	2,84 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O(0,05 mM)	0,013 g
Água destilada.	QSP 1000 ml

FeEDTA

Na ₂ EDTA.	3,72 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O.	2,78 g
Água destilada.	QSP 1000 ml

d) Soluções para análise em hplc – análise de aminoácidos livres

Eluentes

Eluente A – Acetato de Sódio (4,10 g.l⁻¹), fosfato de sódio (8,96 g.l⁻¹), tetrahidrofurano 0,2% e metanol 0,2% em água deionizada.

Eluente B – metanol 65% em água deionizada.

Solução OPA-Borato

OPA.	140 mg
Tampão borato pH = 9,5.	18,2 ml
β-mercaptoetanol.	166,2 µl
Metanol.	2,8 ml

e) Soluções para análise de concentração de amônio livre

Solução de nitroprussídeo e fenol

Nitroprussiato de sódio.	25 mg
Fenol.	5 g
Água destilada.	QSP 500 ml

Solução de hidrocloreto alcalino

Hidróxido de sódio.	2,5 g
Hipoclorito de sódio.	4,2 ml
Água destilada.	QSP 500 ml

ANEXO B – Quadro: resumo dos resultados

Quadro Anexo – Resumo dos resultados obtidos com os testes de inoculação de *Enterobacter* sp. ICB481 em plântulas de cana de açúcar submetidas às adubações orgânica e convencional.

	O	C	S	EO	EC	ES
Comprimento Foliar (cm)	61,5 ± 8,05	66,2 ± 6,76	36,3 ± 5,50	71,3 ± 3,79	70,3 ± 1,53	76,6 ± 5,75
Teor de Clorofila Total (SPAD)	34,9 ± 0,78	36,0 ± 2,10	17,9 ± 2,20	35,2 ± 1,29	36,3 ± 1,02	35,4 ± 0,79
Volume Radicular (cm ³)	3,6 ± 0,58	3,1 ± 0,29	2,5 ± 0,50	5,6 ± 1,15	4,3 ± 0,58	5,6 ± 1,15
Massa Fresca Foliar (g)	2,86 ± 0,49	2,97 ± 0,19	0,87 ± 0,14	2,95 ± 0,34	2,60 ± 0,18	4,00 ± 0,41
Massa Fresca Radicular (g)	0,88 ± 0,09	0,57 ± 0,06	0,52 ± 0,07	1,23 ± 0,12	1,20 ± 0,10	1,20 ± 0,10
Massa Seca Foliar (g)	0,42 ± 0,05	0,52 ± 0,08	0,18 ± 0,07	0,48 ± 0,04	0,48 ± 0,04	0,47 ± 0,10
Massa Seca Radicular (g)	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,02	0,03 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,14 ± 0,02
Concentração de Nitrato Foliar (µg.g ⁻¹)	133,3 ± 46,19	40,0 ± 10,00	53,3 ± 23,09	106,6 ± 23,09	160,6 ± 10,00	133,3 ± 23,09
Concentração de Nitrato Radicular (µg.g ⁻¹)	280,0 ± 80,00	253,3 ± 23,09	83,3 ± 5,77	176,6 ± 28,87	266,6 ± 83,27	186,6 ± 23,09
Concentração Amônio Livre (µg.g ⁻¹)	Traço	Traço	Traço	Traço	Traço	Traço
Concentração de Aminoácidos Livres Foliares (mg.g ⁻¹)	32,6 ± 1,7	19,4 ± 0,92	7,4 ± 0,11	14,9 ± 0,85	14,5 ± 1,43	19,5 ± 0,25
Concentração de Aminoácidos Livres Radiculares (mg.g ⁻¹)	18,8 ± 1,71	28,0 ± 1,83	10,0 ± 1,01	13,6 ± 0,94	16,7 ± 3,51	8,6 ± 0,52
Quantidade de Proteínas Totais (g.planta ⁻¹)	8,4 ± 1,04	21,0 ± 2,80	6,8 ± 0,79	25,9 ± 4,80	24,6 ± 8,89	21,9 ± 9,29
Concentração de Carboidratos Solúveis Foliares (mg.g ⁻¹)	3,1 ± 0,18	1,8 ± 0,04	2,6 ± 0,29	3,0 ± 0,20	1,8 ± 0,02	2,6 ± 0,31
Concentração de Carboidratos Solúveis Radiculares (mg.g ⁻¹)	2,3 ± 0,16	1,5 ± 0,20	1,7 ± 0,15	1,8 ± 0,18	1,7 ± 0,08	1,4 ± 0,05
Concentração de Proteínas Totais (µg.g ⁻¹)	2,2	5,9	4,9	6,2	6,5	4,2

O = Grupo controle plântulas de cana de açúcar submetidas às adubações orgânica e convencional. O = Grupo controle adubado organicamente; C = Grupo controle adubado convencionalmente; S = Grupo controle sem adubação; EO = Grupo inoculado adubado organicamente; EC = Grupo inoculado adubado convencionalmente; ES = Grupo inoculado sem adubação.

FONTE: Ichiwaki (2012).