

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Caracterização de Novos Rizóbios Isolados de Raízes de
Cana-de-açúcar**

Gustavo Feitosa de Matos

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS RIZÓBIOS ISOLADOS DE RAÍZES
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

GUSTAVO FEITOSA DE MATOS

Sob a Orientação do Pesquisador
José Ivo Baldani

e Co-orientação do Pesquisador
Luc Felicianus Marie Rouws

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ, área de Concentração: Fisiologia da produção.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M425c Matos, Gustavo Feitosa, 18/07/1991-
Caracterização de novos rizóbios isolados de raízes
de cana-de-açúcar / Gustavo Feitosa Matos. - 2017.
70 f.

Orientador: José Ivo Baldani.
Coorientador: Luc Felicianus Marie Rouws.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia, 2017.

1. Bradyrhizobium. 2. taxonomia de procariotos. 3.
promoção de crescimento em cana-de-açúcar. I. Baldani,
José Ivo, 1953-, orient. II. Rouws, Luc Felicianus
Marie, 1976-, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em
Fitotecnia. IV. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

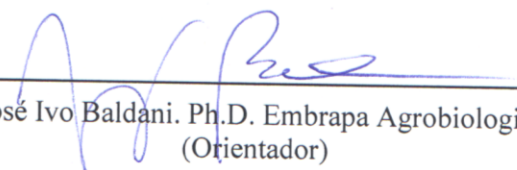
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

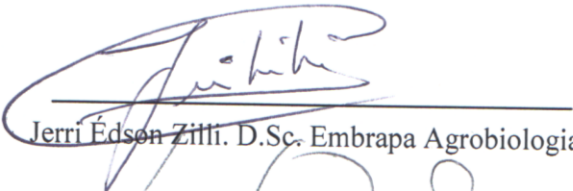
GUSTAVO FEITOSA DE MATOS

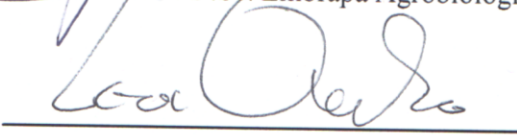
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ, área de Concentração em Fisiologia da Produção.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 23/02/2017

Comissão Examinadora:


José Ivo Baldani. Ph.D. Embrapa Agrobiologia
(Orientador)


Jerri Édson Zilli. D.Sc. Embrapa Agrobiologia


Leonardo Oliveira Medici. D.Sc. UFRRJ

DEDICO

Aos meus pais, Severino Carvalho de Matos e Maria Amélia Feitosa de Matos, pelo amor, carinho, educação, apoio e confiança em todas as minhas decisões.

Aos meus irmãos, Marilene (neném), Mario (bi) e Karina, por sempre me apoiarem e terem plena confiança em minha capacidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela capacidade de aprender que me foi dado, que junto com as oportunidades criadas, me permitiu chegar até aqui.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao PPGF pela oportunidade de estar realizando o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

À Embrapa Agrobiologia pelo suporte para o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

Ao Dr. José Ivo Baldani por ter aceitado ser meu orientador e ter contribuído para o meu desenvolvimento acadêmico.

Ao Dr. Luc Rouws, pela co-orientação, mas que me orientou durante toda a Iniciação Científica, ajudando a desenvolver o gosto pela ciência e por ter acreditado na minha capacidade.

Aos professores, Lucena e Maria Ivone, pela força e oportunidades em meu primeiro momento na universidade.

A dona Ana Maria, que foi um anjo em minha vida, e muito ajudou no meu ingresso no ensino superior.

Ao Dr. Jean Luiz por ter ajudado com os cálculos de ANI, ao pessoal da Embrapa Meio Ambiente pelas análises de perfil de ácidos graxos e à Dra. Janaina Rouws pelas análises estatísticas.

A todo o pessoal do Laboratório de Ecologia Microbiana, em especial para João Luiz e Dra. Karine Freitas pelo suporte que me deram para realizar as atividades no laboratório e pelos momentos de descontração, que nos permite seguir em frente.

Aos grandes amigos Samuel Passos e Jakson Leite, que conheci no laboratório, mas que sempre me apoiaram e ajudaram tornar esse caminho menos difícil.

Aos amigos do alojamento do 232 e 514, por todas as boas lembranças durante a graduação.

Aos *brothers* Adriano Silva e João Antônio, pelo apoio e amizade.

A todos àqueles que direta e indiretamente contribuíram com este trabalho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Gustavo Feitosa de Matos, filho de Maria Amélia Feitosa de Matos e Severino Carvalho de Matos, nasceu em 18 de julho de 1991, na cidade de Paraibano, estado do Maranhão. Em 2010 formou-se em Técnico em Agropecuária pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA), em São Luís-MA. Em 2011 ingressou no curso de Engenharia Agrônômica na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde obteve o título de Bacharel em Engenharia Agrônômica, em quatro anos e meio, no ano de 2015. Entre os anos de 2011 e 2012, fez estágio na área de extensão rural, auxiliando na ampliação de pomares orgânicos de pequenos agricultores do município de Seropédica-Rj, com bolsa concedida pela FAPUR e posteriormente pelo PROEXT sob orientação dos professores Lucena e Maria Ivone. Entre os anos de 2012 e 2015, desenvolveu atividade de pesquisa em microbiologia do solo com isolamento e caracterização de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* de cana-de-açúcar com o objetivo de desenvolver produtos biotecnológicos a serem usados nessa cultura, com bolsa de Iniciação Científica concedida inicialmente pelo CNPq e, posteriormente, pela FAPERJ, sob orientação do Dr. Luc Rouws. Em agosto de 2015, ingressou no Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde desenvolveu, como bolsista do CNPq, sua dissertação “*Caracterização de novos rizóbios isolados de raízes de cana-de-açúcar*” no Laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia sob a orientação do Dr. José Ivo Baldani e Dr. Luc Rouws.

RESUMO

MATOS, Gustavo Feitosa. **Caracterização de novos rizóbios isolados de raízes de cana-de-açúcar**. 2017. 70p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Estudos recentes de biologia molecular indicaram que bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* também podem ter um papel no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) quando associadas à cana-de-açúcar. O uso de plantas de *Vigna unguiculata* como “isca” possibilitou a obtenção de uma coleção diversa de *Bradyrhizobium* spp. endofíticos a partir de raízes de cana-de-açúcar. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar um grupo de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* proveniente de raízes de cana-de-açúcar, assim como avaliar a capacidade de uma estirpe representante desse grupo e de um isolado do gênero *Rhizobium* em promover efeito de crescimento nessa cultura. Para definir o posicionamento taxonômico dos isolados do grupo, análises filogenéticas foram realizadas com os genes individuais 16S rRNA, ITS, *nodC* e *recA* e análise de sequência de multilocus (MLSA) envolvendo quatro genes ‘housekeeping’ (*recA*, *dnaK*, *glnII* e *atpD*), em quatro isolados representantes (BR 10280^T, BR 10266, BR10555 e BR 10556). Além disso, foram realizados testes bioquímicos e morfofisiológicos. Experimento onde os isolados P9-20 (BR 10280) (*Bradyrhizobium* sp.) e P5-2 (*Rhizobium* sp.) foram inoculados em minitoletes de cana-de-açúcar foi conduzido em casa de vegetação. Foram realizadas coletas aos 30 e 75 dias após transplantio (DAT). Entre as variáveis analisadas estão o índice de velocidade de brotamento (IVB), massa seca e Nitrogênio (N) total. Análises filogenéticas posicionaram os isolados no super clado de *B. japonicum* em um ramo independente próximo a *B. huanghuaihaiense*, um microssimbionte de soja. Apesar da proximidade do grupo em estudo com *B. huanghuaihaiense*, estes isolados não induziram nodulação em *Glycine max*. Além disso, diferente de *B. huanghuaihaiense*, os novos isolados induziram a formação de nódulos em *Phaseolus vulgaris*. Em estudos morfofisiológicos foram demonstradas diferenças significativas entre os isolados representantes do grupo em estudo e *B. huanghuaihaiense*. Em experimento em casa de vegetação, observou-se na primeira coleta um incremento sobre o IVB e massa seca da raiz no tratamento inoculado com o isolado P5-2, embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas. Na segunda coleta, incrementos foram encontrados na massa seca de raiz e volume de raiz, assim como, no N total das raízes e parte aérea, no tratamento inoculado com P5-2, embora não tenham apresentado diferença estatística. Massa seca da parte aérea do tratamento inoculado com P5-2 apresentou incremento na primeira e segunda coleta, em relação aos controles, embora não tenha sido detectada diferença estatística. Os resultados da caracterização do grupo indicam que os isolados de cana-de-açúcar do gênero *Bradyrhizobium* representam uma nova espécie desse gênero. Em relação ao experimento em casa de vegetação, o isolado do gênero *Rhizobium* sp. apresentou potencial como promotor de crescimento na cultura de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Bradyrhizobium*, taxonomia de procariotos, promoção de crescimento em cana-de-açúcar.

ABSTRACT

MATOS, Gustavo Feitosa. **Characterization of new rhizobia isolated from sugarcane roots.** 2017, 70. Dissertation (Masters in Plant Science). Institute of Agronomy, Department of Plant Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Recent molecular biology studies have indicated that bacteria of the genus *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* may also play a role in the biological nitrogen fixation process (BNF) when associated with sugarcane. The use of *Vigna unguiculata* trap plants allowed obtaining a diverse collection of endophytic *Bradyrhizobium* spp. from sugarcane roots. The present work aimed to characterize a group of bacteria of the genus *Bradyrhizobium* from sugarcane roots, as well as to evaluate the ability of a representative strain of this group and an isolate of the genus *Rhizobium* to promote growth in this crop. To define the taxonomic position of the isolates of the group, phylogenetic analyzes were performed with the individual 16S rRNA, ITS, *nodC* and *recA* genes and multilocus sequence analysis (MLSA) involving four housekeeping genes (*recA*, *dnaK*, *glnII* and *atpD*), in four representative isolates (BR 10280^T, BR 10266, BR 10555 and BR 10556). In addition, biochemical and morphophysiological tests were performed. Experiments in which the isolates P9-20 (BR 10280) (*Bradyrhizobium* sp.) and P5-2 (*Rhizobium* sp.) were inoculated in sugarcane seedlings were conducted in a greenhouse to evaluate the growth promoting effect of these isolates. Two harvests were performed at 30 and 75 days after transplanting (DAT). Among the analyzed variables were the budding speed index (BSI), dry mass and total nitrogen (N). Phylogenetic analyzes positioned the isolates in the superclade of *B. japonicum* in an independent branch close to *B. huanghuaihaiense*, a soybean micro-symbiont. Despite the proximity of the group under study to *B. huanghuaihaiense*, these isolates did not induce nodulation in *Glycine max*. In addition, unlike *B. huanghuaihaiense*, the new isolates induced nodule formation in *Phaseolus vulgaris*. In morphophysiological studies, significant differences were demonstrated between the representative isolates from this study and *B. huanghuaihaiense*. In the greenhouse experiment, an increase on BSI and root dry mass of the inoculated treatment with the P5-2 isolate was observed in the first harvest. In the second harvest, increments were found in the root dry mass and root volume, as well as in the total N of the roots and aerial part, in the treatment inoculated with P5-2, although no statistical difference was detected. These results of the characterization indicate that the sugarcane isolates of the genus *Bradyrhizobium* represent a new species of this genus. In relation to the greenhouse experiment, the isolate of the genus *Rhizobium* sp. presented potential as a growth promoter in the sugarcane crop.

Key words: *Bradyrhizobium*, taxonomy of prokaryotes, Promotion of growth in sugarcane.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Filograma *Maximum likelihood* (ML) estimado a partir de 369 posições de pares de bases do gene *recA*. Valores de *bootstrap* são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo de Kimura 3- parâmetros + G + I, como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA 6. Isolados obtidos de raízes de cana-de-açúcar com uso de plantas isca estão mostrados em negrito.....19

Figura 2. Filograma *Maximum likelihood* (ML) estimado a partir de 1224 posições de pares de bases do gene 16S rRNA. Valores de *bootstrap* são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo de Kimura 3- parâmetros + G + I, como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA 6. *Microvirga vignae* BR 3299^T foi usado como grupo externo. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site....20

Figura 3. Filograma *Maximum likelihood* (ML) estimado a partir das sequências concatenadas dos genes *recA* (375 nt), *glnII* (479 nt), *dnaK* (207 nt) e *atpD* (428 nt). Valores de *bootstrap* são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida através do modelo GTR + G + I. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site.....21

Figura 4. Filograma *Maximum likelihood* (ML) estimado a partir de 583 posições de nucleotídeos do espaçador interno transcrito (ITS) entre os genes de 16S e 23S rRNA. Valores de *bootstrap* são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo de Kimura 2-parâmetro + G. *Rhodopseudomonas palustris* NTUIOB YSCA foi usado como grupo externo. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site. 22

Figura 5. Filograma *Maximum likelihood* (ML) estimado a partir de 441 posições de nucleotídeos do gene *nodC*. Valores de *bootstrap* são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida usando o modelo Kimura 3-parâmetro + G+ I. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site.....25

Figura 6. Micrografia em microscópio eletrônico de uma célula da estirpe BR 10280^T manchada de uranila carregando um flagelo. A imagem foi obtida usando um Evo LS 10 ambiental microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss), equipado com um detector STEM.....28

Figura 7. Índice de velocidade de brotamento (IVB) de minitoletes de cana-de-açúcar variedade RB867515. Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si pelo teste t a 5%. CV: 16,24 %. +N: não inoculado com alta dose de N; -N: não inoculado com baixa dose de N; 5Estir: inoculante para cana-de-açúcar composto por cinco espécies de bactérias, *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe BR 11281^T (PAL -5^T), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335 = HRC54), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504 = HCC103), *Paraburkholderia tropica* (BR 11366^T = PPe 8^T) e *Nitrospirillum amazonense* (BR 11145 = CBAMc).....31

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Identificação das estirpes estudadas, plantas da qual foram isoladas e a coleção de cultura que foram depositadas.....	9
Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes usados nesse estudo, suas respectivas sequências, condições de amplificação e referências.....	11
Tabela 3. Percentual de similaridade de nucleotídeos em diferentes genes entre a estirpe BR 10280 ^T e outras estirpes. As duas últimas colunas mostram valores para as sequências concatenadas de três ou quatro genes. Valores de similaridade foram determinadas usando o software MEGA 6 ‘continua’.....	23
Tabela 4. Experimento de inoculação cruzada com isolados obtidos de raízes de cana-de-açúcar em sementes de espécies de leguminosas.....	26
Tabela 5. Identidade nucleotídica (%) entre a BR 10280 ^T e as estirpes tipo das espécies mais próximas.....	27
Tabela 6. Perfis de ácidos graxos (%) obtidos para as estirpes em estudo e a estirpe mais próxima <i>B. huanghuaihaiense</i>	27
Tabela 7. Características distintivas entre as estirpes em estudo e a estirpe tipo da espécie mais próxima <i>B. huanghuaihisense</i>	28
Tabela 8. Resistência a antibióticos (antibiograma) das estirpes em estudo e da espécie mais próxima <i>B. huanghuaihisense</i>	29
Tabela 9. Diferenças quanto a capacidade de uso de fontes de carbono, por meio do teste Biolog GN2, entre as estirpes em estudo e estirpes tipo da espécie mais próxima <i>B. huanghuaihisense</i>	30
Tabela 10. Variáveis analisadas em coletas de cana-de-açúcar realizadas aos 30 DAT. (CTR) comprimento total de raiz. (MSR) massa seca de raiz. (MSPA) massa seca de parte aérea. (ATSR) área total da superfície da raiz. (CPA) comprimento parte área. (VL) volume de raiz. (EP) erro padrão.....	32
Tabela 11. Variáveis analisadas em coleta de cana-de-açúcar realizada aos 75 DAT. (MSMT) massa seca do minitotele. (MSR) massa seca de raiz. (MSPA) massa seca de parte aérea. (MST) massa seca total. (TeorNMT) teor de N do minitotelete. (TeorNR) teor de N da raiz. (TeorNPA) teor de N da parte aérea. (TeorNT) teor de N total. (NTMT) N total do minitotelete. (NTR) N total da raiz. (NTPA) N total da parte aérea. (NTS) N total soma. (DC) diâmetro do colmo. (CPA) comprimento da parte aérea. (AF) área foliar. (VR) volume de raiz. (EP) erro padrão.....	33

SUMÁRIO

BIOGRAFIA vii

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Gênero <i>Bradyrhizobium</i>	3
2.2 Uso de Bactérias Endofíticas na Promoção de Crescimento	3
2.3 Histórico e Métodos de Isolamento de Bactérias Promotoras de Crescimento em Cana-de-açúcar	5
2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas (Poaceae)	5
2.5 Uso de Genes como Marcadores Moleculares para Estudo de Filogenia	6
2.5.1 Gene 16S rRNA e ITS	6
2.5.2 Genes <i>housekeeping</i> e análise de sequências multilocus (MLSA)	7
2.5.3 Gene <i>nifH</i>	7
2.5.4 Diversidade dos genes <i>nod</i>	7
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Estirpes Estudadas	9
3.2 Caracterização Genética	9
3.2.1 Extração de DNA	9
3.2.2 Amplificação e sequenciamento de genes	10
3.2.3 Análise das sequências dos genes	11
3.3 Perfis de Ácidos Graxos	12
3.4 Average Nucleotide Identity (ANI) e Conteúdo G + C	12
3.5 Testes Morfológicos e Bioquímicos	12
3.5.1 Características das colônias e da célula	12
3.5.2 Alteração no pH do meio	12
3.5.3 Teste de crescimento em pH variado	13
3.5.4 Teste de crescimento em concentração de NaCl variado	13
3.5.5 Teste de crescimento em temperaturas variadas	13
3.5.6 Teste de tolerância a antibióticos	13
3.5.7 Teste de crescimento com fontes de carbono diferentes e reação enzimática	13
3.6 Determinação da Faixa de Hospedeiro	14
3.7 Experimento de Promoção de Crescimento em Casa de Vegetação Utilizando Minitoleta de Cana-de-Açúcar	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Caracterização Genética	20
4.1.1 Análise filogenética do gene 16S rRNA	20
4.1.2 Análise filogenética por MLSA e região entre os genes 16S e 23S rRNA	21
4.1.3 Análise filogenética do gene <i>nodC</i>	25
4.1.4 Teste de inoculação cruzada	26
4.1.5 <i>Average Nucleotide Identity</i> e Conteúdo G + C	26
4.1.6 Perfil de ácidos graxos	27
4.2 Caracterização Morfofisiológica	27
4.2.1 Características morfofisiológicas das colônias e células	27
4.2.2 Alteração no pH do meio YMA	28
4.2.3 Avaliação de crescimento em diferentes condições de temperatura, pH e salinidade	28
4.2.4 Resistência ou sensibilidade a antibióticos	28
4.2.5 Utilização de fontes de carbono e reação enzimática	29

4.3 Promoção de Crescimento de Cana-de-Açúcar pelas Estirpes P9-20 e P5-2 em Condições de Casa de Vegetação	30
4.3.1 Análise de brotamento dos minitoletes inoculados	30
4.3.2 Efeito da inoculação sobre o sistema radicular	31
4.3.3 Efeito da inoculação sobre a parte aérea	34
4.3.4 Efeito da inoculação sobre o teor de nitrogênio	35
5 CONCLUSÕES.....	37
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
8 ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, áreas ocupadas com pastagens e cana-de-açúcar têm mantido níveis razoáveis de sua produtividade com baixos níveis de aplicação de fertilizantes nitrogenados. Isto é um indicativo de que este fenômeno poderia estar relacionado com a contribuição de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (DÖBEREINER, 1961; LEDGAR & STEELE, 1992). Esta observação levou pesquisadores a sugerirem que a cana-de-açúcar pudesse estar obtendo parte do nitrogênio necessário para seu desenvolvimento a partir do processo de FBN associativa com bactérias diazotróficas, sendo as primeiras bactérias obtidas a partir do solo e da rizosfera e pertencentes ao gênero *Beijerinckia* (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958). A contribuição da FBN para a cultura da cana foi então demonstrada em vários estudos por meio de técnicas envolvendo o isótopo ^{15}N (RUSCHEL *et al.*, 1975; LIMA *et al.*, 1987; URQUIAGA *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.* 2003; PAUNGFOO-LONHIENNE *et al.*, 2014).

Como resultado desses estudos, várias espécies de bactérias diazotróficas endofíticas foram isoladas posteriormente desta cultura e uma mistura de cinco espécies (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Nitrospirillum amazonense* e *Paraburkholderia tropica*) vem sendo testada em experimentos de campo em escala de produção (REIS *et al.*, 2009).

Estudos aplicando métodos independentes de cultivo e baseados na abundância de filotipos de RNA mensageiro do gene *nifH*, sugeriram que bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* poderiam ser responsáveis por uma parte importante da FBN associada à cana-de-açúcar (ANDO *et al.* 2005; BURBANO *et al.*, 2011; FISCHER *et al.*, 2011; THAWEENUT *et al.*, 2011). A atividade de nitrogenase em isolados de gênero *Bradyrhizobium* obtidos de plantas da família das gramíneas já foi relatada previamente por ensaio de redução de acetileno (CHARENTREUIL *et al.*, 2000; ROUWS *et al.*, 2013).

O isolamento de *Rhizobium* spp. (crescimento rápido em meio de cultivo) a partir de plantas de cana foi relatado no sul do Brasil (BENEDUZI *et al.*, 2013). No entanto, isolados do gênero *Bradyrhizobium* (crescimento lento em meio de cultivo) não foram obtidos dessa cultura pelos métodos de isolamento tradicionais, incluindo o meio de cultura semissólido livre de nitrogênio (N), que são semisseletivos para determinados grupos de bactérias. Esses meios semissólidos são muito utilizados para isolar estas bactérias diazotróficas de tecidos de plantas não-leguminosas. Porém, se bactérias diazotróficas de crescimento lento e crescimento rápido estiverem presentes no mesmo inóculo introduzido num frasco com meio semissólido, as bactérias de crescimento rápido podem inibir as de crescimento lento (DAVIS *et al.*, 2011). Isso pode explicar por que *Bradyrhizobium* spp. não tenham sido isolados a partir de cana-de-açúcar pelo uso desses métodos. Além disso, *Bradyrhizobium* spp. não têm a capacidade de crescer em condições *in vitro* sem fonte de nitrogênio combinado.

Dados fornecidos por técnicas moleculares puderam servir como um guia para as estratégias de isolamento desse gênero (BOMAR *et al.*, 2011) e uma coleção de bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Methylobacterium* foi previamente isolada de raízes de cana-de-açúcar e alguns dos isolados apresentaram atividade de nitrogenase *in vitro* e capacidade de induzir a formação de nódulos ativos em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) (ROUWS *et al.* 2013). A atividade da nitrogenase *in vitro* indicou que alguns desses isolados têm a capacidade de fixar nitrogênio sem estarem associados a nódulos de plantas leguminosas e esta característica é essencial para FBN em gramíneas como cana-de-açúcar.

Este trabalho teve como hipótese de que: há uma nova espécie de bactéria do gênero *Bradyrhizobium* na coleção de isolados obtida de raízes de cana-de-açúcar e que esses

isolados podem promover efeito benéfico no crescimento dessa cultura, assim como um isolado do gênero *Rhizobium*, também, dessa coleção.

O objetivo foi caracterizar um grupo de bactérias do gênero *Bradyrhizobium* proveniente de raízes de cana-de-açúcar, assim como avaliar a capacidade de uma estirpe representante desse grupo e de um isolado do gênero *Rhizobium* em promover efeito de crescimento nessa cultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Bradyrhizobium*

No final do século XIX ocorreu o primeiro relato de isolamento de bactérias a partir de nódulos radiculares de leguminosas e foi determinado que elas fossem responsáveis pelo fornecimento de nitrogênio atmosférico para plantas. Essas bactérias foram inicialmente nomeadas de *Bacillus radícolá* (BEIJERINCK, 1888), mais tarde mudadas para o gênero *Rhizobium*, sendo todas representadas por apenas uma espécie, *R. leguminosáram* (FRANK, 1889).

O gênero *Rhizobium* foi utilizado para representar as bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas até a década de 1980. As espécies desse gênero eram compostas pelas estirpes que induziam nodulação nas mesmas plantas. Até então esse gênero incluía seis espécies: *R. leguminosárum* (induzem nodulação em *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* e *Lens*), *R. meliloti* (*Melilotus*, *Medicago* e *Trigonella*), *R. trifolii* (*Trifolium*), *R. phaseoli* (*Phaseolus*), *R. lupini* (*Lupinus*) e *R. japonicum* (*Glycine max*). Então, de um gênero e seis espécies em 1982, estudos taxonômicos de rizóbios levaram a um total de seis gêneros e 28 espécies reconhecidas em pouco tempo (ZAKHIA & LAJUDIE, 2001).

Entre os novos gêneros formados a partir do novo estudo taxonômico dos rizóbios, foi criado o gênero *Bradyrhizobium* (JORDAN, 1982a), para incluir os isolados de crescimento lento que eram da espécie *Rhizobium japonicum*. Durante muito tempo esse gênero foi representado somente pela espécie *B. japonicum* (JORDAN, 1982b). Somente na década de 1990 foi criada uma nova espécie, *B. elkanii* (KUYKENDALL *et al.*, 1992). Ao passar dos anos novas espécies foram descritas para esse gênero, como por exemplo: *B. liaoningense* (XU *et al.*, 1995), *B. yuanmingense* (YAO *et al.*, 2002), *B. betae* (RIVAS *et al.*, 2004) e *B. canariense* (VINUESA *et al.*, 2005).

A descrição de novas espécies do gênero *Bradyrhizobium* tinha algumas complicações, uma de grande importância era o fato das estirpes desse gênero apresentarem alto grau de similaridade do gene 16S rRNA, o que dificultava a análise taxonômica entre as estirpes (WILLEMS, 2006). Outro fator problemático é o crescimento muito lento dessas estirpes, que atrapalha o uso de testes fenotípicos padrões (como o Biolog e API systems) (WILLEMS *et al.*, 2001).

Para resolver esses problemas, as análises filogenéticas passaram a ser complementadas com genes codificadores de proteínas, denominados de genes *housekeeping*, mostrando grande eficiência na distinção entre espécies próximas (DELAMUTA *et al.*, 2013). Porém, antes de determinar a taxonomia de qualquer grupo de estirpes é necessário um estudo polifásico. Para esse tipo de estudo, são consideradas as características genotípicas, fenotípicas e filogenéticas (VANDAMME *et al.*, 1996; GEVERS *et al.*, 2005). Logo, devido a esses avanços nos estudos taxonômicos, a distinção entre espécies próximas, assim, como a classificação de novas do gênero *Bradyrhizobium*, passou a ser mais eficiente. Hoje são apresentadas 31 espécies desse gênero cadastradas no LPSN (2017) (<http://www.bacterio.net/bradyrhizobium.html>), havendo ainda espécies já descritas a serem cadastradas na lista.

2.2 Uso de Bactérias Endofíticas na Promoção de Crescimento

A interação benéfica entre plantas e bactérias mais conhecida e estudada é a interação simbiótica entre plantas da família Fabaceae (leguminosas) e os rizóbios, na qual a planta forma uma estrutura especializada (nódulo) para hospedar bactérias que fixam nitrogênio

atmosférico em benefício da planta, enquanto a bactéria recebe fotossintetizados da planta (OLDROYD *et al.*, 2011).

Os rizóbios são bactérias da classe alfa e betaproteobacteria e pertencem a gêneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* (alfaproteobacteria) e *Paraburkholderia* (betaproteobacteria). Hoje se sabe que além dos rizóbios existe uma grande variedade de bactérias associadas às plantas que mesmo não formando estruturas especializadas, desempenham funções importantes na planta. Essas bactérias ocorrem na proximidade das plantas, por exemplo, na rizosfera, no rizopiano (superfície da raiz) ou filopiano (superfície das folhas) ou ainda nos tecidos internos, sendo esse último grupo de microrganismos conhecidos como endofíticos (BALDANI *et al.*, 1997). As bactérias do solo que são benéficas para as plantas são conhecidas na literatura como, “bactérias promotoras do crescimento de plantas” (BPCP) ou “plant growth-promoting bacteria” (PGPB) em inglês.

A utilização de BPCP representa uma estratégia sustentável importante na produção agrícola, uma vez que cresce a diligência por insumos que possibilitem a diminuição da aplicação de fertilizantes químicos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Dentro do grupo das BPCP encontram-se as denominadas diazotróficas endofíticas, reportando-se à capacidade de alguns diazotróficos em colonizarem o interior de plantas e em associação a elas, fixarem nitrogênio (DÖBEREINER, 1992). Assim, como existem, também, muitas espécies de BPCP endofíticas que não são diazotróficas e usam de outros mecanismos promotores de crescimento vegetal (SANTOYO *et al.*, 2016).

As bactérias endofíticas podem ser definidas como aquelas que vivem no interior das plantas sem causar danos visíveis (HALLMANN *et al.*, 1997). Por definição é excluído o grupo das bactérias fitopatógenas, que apesar de também estarem dentro dos tecidos vegetais, podem causar doenças às plantas. Porém, essa definição do endofitismo não é definitiva uma vez que a relação da bactéria com a planta também depende das condições ambientais ou da própria população das bactérias na planta (HARDOIM *et al.*, 2015). Na cana-de-açúcar, por exemplo, pode ser citado o fato de a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum rubrisubalbicans* ser o agente causal da doença conhecida como estria mosqueada em um genótipo suscetível (OLIVARES *et al.*, 1997).

Embora as bactérias endofíticas invadam os tecidos vegetais, elas são diferentes das endossimbiontes. Um dos motivos é pelo fato de não induzirem formação de qualquer estrutura diferenciada na planta (REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998, 2011). Mesmo assim, algumas bactérias endofíticas também podem apresentar capacidade de induzir a formação de nódulos simbióticos fixadores de N em Fabaceae (ROUWS *et al.*, 2013; PIROMYOU *et al.*, 2015).

Microrganismos endófitos são promissores para aumentar a produtividade das culturas, remover contaminantes, inibir patógenos e fixar nitrogênio (ROSENBLUETH & MARTINEZ-ROMERO, 2006). Em contraste com sua capacidade em comum de fixar N₂ do ambiente, bactérias endofíticas diazotróficas associativas são geneticamente diversas. Elas são identificadas em vários gêneros de alfa-beta e gama-proteobactérias incluindo *Azospirillum*, *Azorhizobium*, *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (BALDANI *et al.*, 1986; CAVALCANTE & DOBEREINER, 1988; VESSEY, 2003; KENNEDY *et al.*, 2004; MAGNANI *et al.*, 2010; SANTI *et al.*, 2013; ROUWS *et al.*, 2013).

Bactérias endofíticas diazotróficas associativas estão presentes nas raízes, colmos e folhas das plantas (REIS *et al.*, 2000). A inoculação com microrganismos endófitos é importante para diversas culturas com importância econômica como arroz, cana-de-açúcar e trigo, pois esta prática pode reduzir a entrada de fertilizantes nitrogenados no cultivo (YANNI *et al.* 1997; BALDANI *et al.*, 2000; MATTHEWS *et al.*, 2001; SALEH *et al.*, 2001; GOVINDARAJAN *et al.*, 2006, 2007).

2.3 Histórico e Métodos de Isolamento de Bactérias Promotoras de Crescimento em Cana-de-açúcar

Por causa dos diversos benefícios da inoculação com BPCP, diversos pesquisadores buscam o isolamento e caracterização de bactérias que possam ser utilizadas nos cultivos agrícolas. A cana-de-açúcar foi umas das culturas que se tornaram alvo dessa pesquisa. Dentre as bactérias associadas à cana-de-açúcar que foram isoladas destacam-se *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Nitrospirillum amazonense* (MAGALHÃES *et al.*, 1983; BALDANI *et al.*, 1986; GILLIS *et al.*, 1989; BANDANI *et al.*, 1996).

Ainda há um grande potencial a ser explorado da diversidade microbiana presente na cultura de cana-de-açúcar, assim como os seus benefícios (SOUSA *et al.*, 2016). Esses autores encontraram mais de 35000 unidades taxonômicas operacionais (OTUs), representando entre fungos e bactérias, associados a essa cultura. Se tratando da diversidade microbiana do solo, em uma grama, por exemplo, estima-se que podem existir até 10 bilhões de microrganismos, que podem representar milhares de espécies (ROSSELÓ-MORA & AMANN, 2001). Esses mesmos autores estimaram que pudessem existir até 2 milhões de espécies de microrganismos, sendo que tinham sido descritos apenas entre 0,1 a 10% desse total.

Os isolamentos de bactérias diazotróficas, tradicionalmente, era realizado com meio de cultura semissólido livre de nitrogênio e que variavam em suas fontes de carbonos e pH. Assim, vários meios de cultura foram desenvolvidos com diferentes fontes de carbono, tampões, concentrações de minerais, ocorrendo, ou não, adição de vitaminas (BALDANI *et al.*, 2014). No entanto, os meios de cultivo são de alguma forma seletivos a grupos particulares de microrganismos. Com isso, quando se tem um determinado organismo como alvo, podem ser excluídas das análises algumas estirpes que ainda não tenham sido cultivadas (COUTINHO *et al.*, 1999).

Esse problema se agrava quando o microrganismo de interesse tem como característica crescimento lento no meio de cultivo utilizado no isolamento e no mesmo inoculo há microrganismos com características de crescimento rápido. Dessa forma o microrganismo alvo pode ter seu crescimento inibido pela presença dos microrganismos que apresentem crescimento rápido. Como alternativas a esse problema em isolar bactérias de crescimento lento que possam ser eficientes em promover crescimento na cana-de-açúcar, novas técnicas foram desenvolvidas (ROUWS *et al.*, 2013) e para caracterização se destaca o uso dos ácidos nucleicos. Entretanto, para a identificação de uma nova espécie de bactéria é necessário obter as informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas (VANDAMME *et al.*, 1996).

2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio em Gramíneas (Poaceae)

O nitrogênio (N) é o macronutriente de maior requerimento pela maioria das culturas e se torna um fator limitante para a produtividade, principalmente para países de clima tropical, representando um alto custo para os produtores (ROBERTSON & VITOUSEK, 2009). Esse elemento representa aproximadamente 78% do ar atmosférico (N₂), mas que as plantas não conseguem utilizar.

A transformação do N₂ na forma utilizável amônia (NH₃) necessita da quebra de sua tripla ligação com posterior combinação com átomos de hidrogênio, o que requer um alto nível de energia de ativação. Biologicamente, apenas microrganismos diazotróficos, conseguem mediar essa reação, conhecida como fixação de nitrogênio.

O processo de redução do nitrogênio realizado por bactérias diazotróficas é catalisado pela enzima nitrogenase, que é uma metaloenzima complexa com características mecânicas e estruturais conservadas (REES & HOWARD, 2000; LAWSON & SMITH, 2002; DIXON & KAHN, 2004). O complexo nitrogenase é extremamente sensível ao oxigênio e foi observado

que esses microrganismos diazotróficos têm preferência de ocupação por sítios onde a concentração de oxigênio (O₂) seja baixa (DOBEREINER *et al.*, 1995). Devido à capacidade de plantas da família Fabaceae em formarem nódulos radiculares em simbiose com rizóbios, muitas espécies dessa família conseguem adquirir o N suficiente para suprir suas necessidades metabólicas. A principal função do nódulo é produzir um ambiente propício para a fixação de N pela bactéria, impondo restrições ao fluxo livre de O₂, que inativa a nitrogenase (OLDROYD, 2013).

Culturas economicamente importantes da família Poaceae podem obter uma parte significativa de sua necessidade do N por FBN através de associação com bactérias diazotróficas endofíticas (REIS *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2010). Embora esse valor de N fixado não seja tão grande quanto os obtidos em plantas leguminosas, aumentos no rendimento da produção dessas culturas vêm sendo relatado no campo (DOBBELAERE *et al.*, 2003; VESSEY, 2003; ROESCH *et al.*, 2005; BHATTACHARYYA & JHA, 2012). Já foram encontrados efeitos de promoção de crescimento com a inoculação de bactérias diazotróficas equivalentes a adubação com 120 Kg.ha⁻¹ de N, embora não esteja claro em que medida esse efeito é diretamente ligado ao processo de FBN (SCHULTZ *et al.*, 2014).

2.5 Uso de Genes como Marcadores Moleculares para Estudo de Filogenia

A caracterização genética de microrganismos é de extrema importância para estudos taxonômicos e para conhecer melhor suas características fisiológicas e ecológicas. Esta prática é fundamental para o estudo da ecologia de microrganismos do solo, pois permite o conhecimento de sua diversidade (VAN BELKUM *et al.*, 2001).

O desenvolvimento da técnica conhecida como reação em cadeia da polimerase (PCR) foi um dos grandes avanços dos métodos moleculares que facilitou na descrição da diversidade microbiana (MULLIS *et al.*, 1986). Essa técnica permite a obtenção de várias cópias de determinada região do DNA, por meio da amplificação de pequenos fragmentos do genoma. Por ser muito específica, a PCR permite a amplificação de sequências de nucleotídeos de interesse, mesmo que estes estejam misturados em uma amostra com grande diversidade de sequências.

A amplificação de determinadas sequências do DNA de microrganismos ocorre com o uso de iniciadores (*primers*) que complementam aquelas localizadas em locais de interesse do genoma.

2.5.1 Gene 16S rRNA e ITS

Os genes dos ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNAs) são muito usados para estudos de diversidades de bactérias, sendo moléculas de alto grau de conservação (WOESE, 1987). O gene procaríoto que codifica o 16S rRNA, integra a subunidade ribossomal menor, e tem aproximadamente 1500 nucleotídeos, portando grande quantidade de informações úteis para inferências filogenéticas (AMANN & LUDWIG, 2000).

Embora outro gene ribossomal, que codifica o 23S rRNA, apresente o dobro de nucleotídeos que o 16S rRNA, este último é mais utilizado para estudos filogenéticos por apresentar maior facilidade de sequenciamento (REIS JUNIOR *et al.*, 2002). Também, existem mais sequências de gene 16S rRNA nos bancos de dados que podem ser usadas para fins comparativos.

Análises com 23S rRNA são realizadas como complemento para estudos de organismos com grau de evolução muito próximos. Mesmo o gene 16S sendo o rRNA mais utilizado nas análises filogenéticas, apresenta um alto grau de conservação havendo poucas diferenças de sequências nucleotídicas entre espécies estreitamente relacionadas (STACKEBRANDT & GOEBEL, 1994).

Em contraste com o 16S rRNA, a região interna transcrita (ITS, do Inglês *Internally Transcribed Spacer*) situada entre os genes de 16S rRNA e 23S rRNA exibe uma variabilidade de sequência maior entre espécies próximas, que deixa esse fragmento um marcador genético informativo para estudos filogenéticos comparativos entre estirpes próximas (NAGPAL *et al.*, 1998). Devido a suas características, o ITS pode ser uma ferramenta poderosa para ajudar os pesquisadores em seu trabalho a discernir as relações entre os microrganismos (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 1999).

2.5.2 Genes *housekeeping* e análise de sequências multilocus (MLSA)

Uma limitação do uso do gene 16S rRNA nos estudos filogenéticos de bactérias é o seu alto grau de conservação, o que dificulta uma diferenciação entre espécies e/ou estirpes filogeneticamente próximas (RIVAS *et al.*, 2009). Por isso, análises de sequências multilocus estão sendo utilizadas para complementar as realizadas pelas sequências do 16S rRNA (VAN BERKUM *et al.*, 2003; GEVERS *et al.*, 2005; DALL'AGNOL *et al.*, 2012). Essas análises baseiam-se no sequenciamento de vários genes com funções essenciais para o funcionamento celular das bactérias, os quais são denominados em conjunto de genes *housekeeping*. Tais genes são encontrados em qualquer organismo e têm origem evolutiva comum (ALMEIDA *et al.*, 2010; MARCELLETTI *et al.*, 2010).

A análise dos genes *housekeeping* se tornou uma prática muito importante para os estudos filogenéticos dos procariotos, permitindo descobertas e reclassificações de espécies (MENNA *et al.*, 2009). Isso é possível devido à alta taxa de evolução desses genes, quando comparado com os genes ribossomais, sem perder informações evolutivas (STEPKOWSKI *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005).

Em populações de bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, por exemplo, a combinação dos genes *recA* (recombinase A), *atpD* (subunidade β da F1-Fo ATP sintase) e *glnII* (expressa glutamina sintetase) são usados para discriminar estirpes com elevado nível de similaridade do gene 16S rRNA (WANG *et al.*, 2013; CHAHBOUNE *et al.*, 2012). Assim, a técnica de análise de sequências multilocus (MLSA) é mais adequada para separação de espécies (CHRISTENSEN *et al.*, 2007).

2.5.3 Gene *nifH*

O gene *nifH* faz parte de um conjunto de genes responsáveis pelo processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN). É bastante utilizado nos estudos de relações filogenéticas entre bactérias diazotróficas, já que apresenta a vantagem de ser um gene funcional e permite a correlação entre a estrutura e a função da comunidade microbiana estudada (ROSADO, 1999). Por esse motivo, o gene *nifH* tem sido largamente estudado por diversos pesquisadores, de forma independente, buscando uma melhor compreensão de rizóbios (TOLEDO, 2008).

2.5.4 Diversidade dos genes *nod*

Os fatores *nod* são lipo-quito-oligossacarídeos (LCOs) que consistem de um complexo oligomérico de resíduos de *N*-acetil-D-glucosamina ligados por ligações β 1-4, que são *N*-acetilados no terminal não redutor (DÉNARIÉ *et al.*, 1996; KAMST *et al.*, 1998; BROUGHTON *et al.*, 2006). São fundamentais para liberação dos sinais envolvidos no início do desenvolvimento do nódulo e a invasão do tecido vegetal pela bactéria. Os genes *nod*, *nol* e *noe* são responsáveis pelos passos iniciais da nodulação mediando a síntese e o transporte dos fatores Nod.

Em diferentes espécies de *Rhizobium*, muitos dos genes responsáveis pela nodulação estão presentes em megaplasmídeos conhecidos como plasmídeos simbióticos (Sym) (UEDA

et al., 1995). Porém, as espécies de *Bradyrhizobium*, assim como de alguns outros gêneros, geralmente carregam muitas das informações relacionadas a processos simbióticos em regiões específicas no cromossomo (KANEKO *et al.*, 2002).

Embora já tenham sido identificados mais de 50 genes relacionados à nodulação, os genes considerados “comuns” (*nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodM* e *nodN*) são indispensáveis para a síntese da estrutura básica da molécula sinal. Segundo Fisher *et al.* (1985), os genes *nod* compartilham um alto grau de homologia, podendo ser trocados entre as espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* sem perderem suas propriedades funcionais.

O gene *nodC* é um dos genes *nod* mais utilizado nos estudos de simbiose e filogenia em espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Entretanto não é recomendado usar apenas sequências dos genes *nod* como base, pois frequentemente não são congruentes com estudos baseados em sequências do 16S rRNA (LAGUERRE *et al.*, 2001).

O gene *nodC* (essencial à nodulação em plantas da família Fabaceae), está diretamente envolvido na determinação do hospedeiro específico dessa família de plantas (KAMST *et al.*, 1997; LAGUERRE *et al.*, 2001). Esta correlação com a planta hospedeira é devido o gene *nodC* apresentar importância no controle do comprimento da cadeia dos LCOs e esta cadeia ser fator determinante no reconhecimento entre bactérias e planta hospedeira (KAMST *et al.*, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises bioquímicas, morfológicas e filogenéticas foram realizadas no Laboratório de Ecologia Microbiana (LEMI) e Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular da Embrapa Agrobiologia, no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro. As análises objetivando avaliar o perfil de ácidos graxos foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente.

Para o estudo as estirpes foram crescidas em meio de cultura YMA ou YM (VINCENT, 1970). As quatro estirpes foram depositadas no Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD, Embrapa Agrobiologia) e a estirpe tipo BR 10280^T foi depositada também na Coleção de Cultura HAMBI, Finland.

3.1 Estirpes Estudadas

Para a realização do estudo, quatro estirpes do gênero *Bradyrhizobium* sp. foram selecionadas (Tabela 1) de um grupo composto de 36 isolados, sendo todas isoladas a partir das raízes de cana-de-açúcar cv. RB867515, cultivada na estação experimental da Embrapa Agrobiologia, em Seropédica, Brasil.

Em estudos prévios essas estirpes demonstraram mesmo perfil ERIC-PCR e atividade da nitrogenase *in vitro* em ensaio de redução de acetileno (ROUWS *et al.*, 2013).

Tabela 1. Identificação das estirpes estudadas, plantas da qual foram isoladas e a coleção de cultura que foram depositadas.

Identificação da estirpe	Planta hospedeira	Nome comum da planta hospedeira	Coleção provedora
BR 10280 ^T			
BR 10266	<i>Saccharum</i>	Cana-de-açúcar	Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner
BR 10555	<i>officinarum</i>		
BR 10556			

3.2 Caracterização Genética

3.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir de colônias puras, obtidas após crescimento em meio de cultura contendo extrato de levedura, manitol e ágar (meio YMA) (VINCENT, 1970) durante sete dias a 28°C. Para extração do DNA foi utilizado o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, EUA).

O protocolo de extração consistiu numa etapa inicial de lise das células com adição de 600 µl *Nuclei Lysis Solution* e incubação por 5 minutos a 80°C. Após a lise, 3 µl de *RNase Solution* foram adicionados e as amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos em temperatura ambiente. Uma etapa de limpeza foi realizada com adição de 200 µl de *Protein Precipitation Solution* e incubação das amostras em gelo por 5 minutos seguida de centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos em microcentrífuga a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL contendo 600 µl de isopropanol para precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. O DNA

foi lavado com 600 µl de etanol 70% e centrifugado a 13.000 rpm. O etanol foi removido e o DNA seco à temperatura ambiente por 30 minutos. Após secagem, o DNA foi re-hidratado com 100 µl de *Rehydration Solution*. A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 0,8% a 90 volts por 1,5 horas em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X). Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 µg ml⁻¹) e as imagens capturadas sob luz ultravioleta em fotodocumentador Kodak Logic 100 (Kodak®). As amostras de DNA extraídas foram separadas em alíquotas para evitar descongelamentos sucessivos e provocar degradação. Seu armazenamento foi realizado em freezer a -20°C.

3.2.2 Amplificação e sequenciamento de genes

Todas as reações de PCR foram preparadas usando como molde o DNA extraído dos isolados do grupo em estudo, utilizando o Kit Gotaq DNA polimerase (Promega), para um volume final de 50 µl, com concentração por reação: buffer 1X; dNTP 0,25 mM; 1,50 U Taq DNA polimerase e 1,0 µL de amostra de DNA. Água ultrapura estéril foi usada para completar o volume final para 50 µl. As concentrações finais de todos os iniciadores utilizados para a PCR variaram de acordo com o gene de interesse. As PCRs foram realizadas em termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). As configurações do termociclador foram realizadas de acordo com as condições de amplificação para cada gene (Tabela 2).

A PCR do gene codificador do 16S rRNA foi realizada utilizando os iniciadores 27F e 1492R (FURUSHITA *et al.*, 2003), na concentração final de 0,2 µM para cada primer.

A PCR para a região intergênica 16S-23S (ITS) foi realizada utilizando os iniciadores ITSF e ITSReub (CARDILANE *et al.*, 2004), na concentração de 0,25 µM de cada iniciador.

Estudos com mais detalhes analisando as sequências multilocus foram realizados para as estirpes em estudo. A relação filogenética foi realizada considerando as sequências dos genes *recA* (recombinase A), *atpD* (subunidade β da F1-Fo ATP sintase), *glnII* (glutamina sintetase) e *dnaK* (chaperonas).

A PCR do gene *recA* foi realizada com os primers TSRecAf e TSRecAr (STEPKOWSKI *et al.*, 2005), na concentração final de 0,25 µM para cada primer.

PCR para os genes *atpD*, *dnaK* e *glnII* foi realizado seguindo todos os procedimentos realizados para a amplificação do gene *recA*, com a diferença que foram utilizados para amplificação o gene *atpD* os iniciadores TsatpDf e TsatpDr (STEPKOWSKI *et al.*, 2005), para amplificação do gene *glnII* os primers TSglnIIf e TSglnIIr (STEPKOWSKI *et al.*, 2005) e para amplificação do gene *dnaK* os primers 1411F e 1905R (MENNA *et al.*, 2009).

A PCR para o gene *nodC* foi realizada com os primers NodCFor540 e NodCRev1160 (SARITA *et al.*, 2005), na concentração final de 0,50 µM para cada primer.

Todos os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,0% durante 50 minutos a 100 Volts em tampão TAE 1X. Em seguida, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg.ml⁻¹) e as imagens capturadas com fotodocumentador Kodak® Logic 100.

Os produtos de PCR foram sequenciados com o kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 3.1 v (Applied Biosystems – ABI) em sequenciador automático de DNA ABI 3730x1 (Applied Biosystems), de acordo com o manual do fabricante. As sequências foram analisadas manualmente com a ajuda do software BioNumerics 7.5 (Applied Maths, Bélgica).

Tabela 2. Iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes usados nesse estudo, suas respectivas sequências, condições de amplificação e referências.

Gene	Iniciador	Sequência 5'-3'	Ciclos	Referência
16S	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	94°C 5', 30x (94°C 1', 58°C 1', 72°C 2'), 72°C 5'.	FURUSHITA <i>et al.</i> , 2003
	1492R	TACGGYTACCTTGTACGACTT		
ITS	ITSF	GTCGTAAGGTAGCCGTA	94°C 3', 30x (94°C 45'', 55°C 1', 72°C 2'), 72°C 5'.	CARDILANE <i>et al.</i> , 2004
	ITSReub	GCCAAGGCATCCACC		
recA	TSTecAf	CAACTGCMYTGCGTATCGTCGAA GG	95°C 5', 30x (95°C 1', 60°C 2' e 72°C 2'), 72°C 2'.	STEPKOWSK I <i>et al.</i> , 2005
	TSTecAr	CGGATCTGGTTGATGAAGATCAC CATG		
atpD	TsatpDf	TCTGGTCCGYGGCCAGGAAG	95°C 5', 30x (95°C 1', 60°C 2' e 72°C 2'), 72°C 2'.	STEPKOWSK I <i>et al.</i> , 2005
	TsatpDr	CGACACTTCCGARCCSGCCTG		
glnII	TSglnII _f	AAGCTCGAGTACATCTGGCTCGA CGG	95°C 5', 30x (95°C 1', 60°C 2' e 72°C 2'), 72°C 2'.	STEPKOWSK I <i>et al.</i> , 2005
	TSglnII _r	SGAGCCGTTCCAGTCGGTGTCG		
dnaK	1411 F	TTCGACATCGACGCSAACGG	95°C 5', 30x (95°C 1', 60°C 2' e 72°C 2'), 72°C 2'.	MENNA <i>et al.</i> , 2009
	1905 R	GCCTGCTGCKTGTACATGGC		
nodC	540 F	TGATYGAYATGGARTAYTGCT	95°C 3', 30x (95°C 1', 60°C 2' e 72°C 1'30''), 72°C 2'.	SARITA <i>et al.</i> , 2005
	1160 R	CGYGACARCCARTCGCTRRTG		

3.2.3 Análise das sequências dos genes

As sequências de todos os genes foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e verificadas com análises de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov.Blast.cgi>) (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Alinhamento e análise filogenética foram conduzida usando o software MEGA 6 (TAMURA, *et al.*, 2013). Alinhamentos de sequências foram gerados usando *Muscle* (EDGAR, 2004). Árvores filogenéticas foram calculadas usando os métodos de construção *maximum-likelihood* (ML) e *neighbor joining* (NJ) (FELSENSTEIN, 1985; SAITOU & NEI, 1987) e uma vez que observados resultados semelhantes em ambos os métodos, apenas os resultados para as análises ML foram mostrados.

O modelo mais adequado para o cálculo das árvores filogenéticas foi determinado para o alinhamento das sequências usando a ferramenta de seleção modelo integrado do MEGA 6. A força da topologia das árvores filogenéticas foi avaliada utilizando o método de inicialização através da aplicação de 500 pseudoreplicatas (FELSENSTEIN, 1985).

Para análise de sequencia multilocus (MLSA) dos genes *housekeeping recA*, *glnII*, *dnaK* e *atpD*, as sequências obtidas foram alinhadas com as sequências de genes homólogos de estirpes tipo de todas as espécies descritas do gênero *Bradyrhizobium* e cortadas para o mesmo tamanho (*recA*, 375 nt; *glnII*, 479 nt; *dnaK*, 207 nt e *atpD*, 428 nt).

As sequências alinhadas dos genes foram concatenadas utilizando o programa Seaview (GALTIER *et al.*, 1996). Além da MLSA, uma análise individual do gene *housekeeping recA* foi realizada utilizando além dos quatro isolados representantes do grupo de interesse, mais 42 isolados obtidos de raízes de cana-de-açúcar com o uso de feijão-caupi como “planta isca” (ROUWS *et al.*, 2013). Esses 42 isolados passaram por extração de DNA como mostrado em 4.2.1. A metodologia no estudo filogenético foi a mesma utilizada para os demais genes.

3.3 Perfis de Ácidos Graxos

Para determinar a composição do ácido graxo celular total, as estirpes do grupo em estudo foram crescidas por cinco dias a 28°C em placas com meio de cultura YMA (Vincent, 1970) sólido.

Os ácidos graxos foram extraídos e analisados na Embrapa Meio Ambiente. Foi utilizado o protocolo MIDI (http://www.microbialid.com/PDF/TechNote_101.pdf) para extração. A composição de ácidos graxos dos extratos foi analisada utilizando um cromatógrafo Agilent (modelo 6850) e os componentes foram identificados usando o banco de dados TSBA versão 6.10 (Sistema de Identificação Microbiana; MIDI).

3.4 Average Nucleotide Identity (ANI) e Conteúdo G + C

O genoma da estirpe tipo BR 10280^T foi sequenciado usando serviço de sequenciamento da Macrogen Inc. (Seul, Coreia do Sul). A sequência genômica foi comparada com genomas de espécies de *Bradyrhizobium* próximas por análise de *Average Nucleotide Identity* (ANI), de forma a apoiar a diferenciação de uma espécie nova (KONSTANTINIDIS *et al.*, 2007).

O conteúdo de C + G do genoma da estirpe BR 10280^T foi determinado, conforme descrito anteriormente (DALL’AGNOL *et al.*, 2014). Para isso sequências do genoma de *B. arachidis* CCBAU 051107^T (ID do projeto:1071222), *B. yuanmingense* CCBAU 10071^T (Project ID: 1052901) e *B. daqingense* CCBAU 15774^T (Project ID: 1041378) foram recuperados como arquivos FASTA do Portal de Genoma de *Joint Genome Institute*, do Departamento de Energia dos Estados Unidos (<http://jgi.doe.gov/>).

3.5 Testes Morfológicos e Bioquímicos

Foram realizados, para todas as estirpes do grupo em estudo, testes que visam o melhor entendimento de seu comportamento em condições diversificadas, assim como, permitir a sua comparação com outras espécies descritas. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.5.1 Características das colônias e da célula

A estirpe tipo do grupo em estudo BR 10280^T, foi inoculada no meio de cultura YMA (VINCENT, 1970) e incubada a 28°C. Após sete dias de crescimento as colônias foram medidas com auxílio de um paquímetro e seu diâmetro foi registrado em milímetros (mm). Também foi classificado quanto sua forma e cor. Foi realizada coloração de gram nas células, além de visualização em microscópio eletrônico incubadas com acetado de uranila. As células com flagelos foram visualizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura Evo LS 10 (Carl Zeiss), equipado com um detector STEM.

3.5.2 Alteração no pH do meio.

Para realização deste teste todas as estirpes do grupo em estudos foram inoculadas em meio de cultura YMA (VINCENT, 1970) sólido com indicador azul de bromotimol

inicialmente com pH sete, apresentando cor esverdeado. Após o crescimento das estirpes, a cor final do meio de cultura foi registrada. Meio de cultura azulado foi alcalinizado, amarelado foi acidificado. E os que permaneceram esverdeados, não houve reação.

3.5.3 Teste de crescimento em pH variado

Para realização deste teste todas as estirpes do grupo em estudos foram inoculadas em meio de cultura sólido (YMA) (VINCENT, 1970) para pH 5 a 13 e líquido (YM) para pH 3 e 4. Com isso, pôde ser verificado a faixa de pH ótimo de crescimento, assim como, o menor e o maior valor de pH em que as estirpes ainda apresentaram crescimento. Após a inoculação, as estirpes cresceram por sete dias a 28°C.

3.5.4 Teste de crescimento em concentração de NaCl variado

Para realização deste teste todas as estirpes do grupo em estudos foram inoculadas em meio de cultura YMA (VINCENT, 1970). Porém, no final do preparo do meio a concentração de sal foi ajustada para 0,1%, 0,3%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, e 2,5%. Com isso, foi possível verificar a faixa de salinidade ótima de crescimento, assim como, a menor e a maior concentração em que as estirpes ainda apresentaram crescimento. Após a inoculação, as estirpes cresceram por sete dias a 28°C.

3.5.5 Teste de crescimento em temperaturas variadas

Para realização deste teste todas as estirpes do grupo em estudos foram inoculadas em meio de cultura YMA (VINCENT, 1970). Após inoculação, foi avaliado o crescimento nas temperaturas 15, 20, 25, 28, 32, 37 e 40°C. Com isso, pôde ser verificada a faixa de temperatura ótima de crescimento, assim como, a menor e a maior temperatura em que as estirpes ainda apresentaram crescimento.

3.5.6 Teste de tolerância a antibióticos

Para realização deste teste todas as estirpes do grupo em estudos foram crescidas em meio de cultura YM líquido sob agitação de 100 rpm na temperatura de 28°C durante 4 dias. Após o crescimento, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 6 ml de solução salina a 0,85% e novamente centrifugadas. Após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e as células foram novamente suspensas em solução salina 0,85% e desta vez, após ajustadas a densidade óptica no comprimento de onda 600nm ($D.O_{600}$), inoculadas (50µl) em meio de cultura YMA (VINCENT, 1970). O espalhamento foi realizado com alça de Drigalski por toda superfície do meio. A placa de petri foi dividida em quatro quadrantes e um disco de antibiótico com concentração especificada foi colocado no centro de cada quadrante. O halo formado em volta do disco de antibiótico indicou a resistência ou sensibilidade de cada estirpe testada.

Foi utilizado para esse teste o kit Sistema *Sensidisc dispenser* (Oxoid) com bio-discos (Oxoid). Os antibióticos testados foram: ampicilina (10 e 25 µg/disco), eritromicina (15 e 30 µg/disco), chloramfenicol (30 e 50 µg/disco), gentamicina (10 e 30 µg/disco), kanamicina (30 µg/disco), rifampicina (5 e 30 µg/disco), estreptomina (10 e 25 µg/disco) e tetraciclina (10 e 30 µg/disco). As placas foram incubadas a 28°C e a leitura foi feita após 10 dias.

3.5.7 Teste de crescimento com fontes de carbono diferentes e reação enzimática

Para realização deste teste todas as estirpes do grupo em estudos foram inoculadas em meio de cultura YMA (VINCENT, 1970) e acondicionadas a 28°C durante sete dias. Para

determinar as fontes de carbono utilizadas pelas estirpes foi utilizado o teste com o kit Biolog GN II (Biolog, Hayward CA, EUA). Esse kit consiste em placas de 96 poços contendo diferentes fontes de carbono. Após a adição de suspensão bacteriana de interesse, a alteração colorimétrica (de incolor para violeta) indica um resultado positivo. Esse teste indicou a capacidade de cada estirpe em metabolizar e crescer sob diferentes fontes de carbono que estavam presentes em cada poço da microplaca do kit.

Para preparo do inóculo, foram utilizadas colônias puras de cada estirpe que foram ressuspensas em solução nutritiva acompanhante do kit, que teve a D.O₆₀₀ ajustada de acordo com as recomendações do fabricante. Em cada poço foi inoculado 150 µl da suspensão bacteriana. As microplacas foram acondicionadas a 28°C durante sete dias.

O resultado foi analisado de acordo com a intensidade da alteração de cor nos poços, sendo positivo (a estirpe metaboliza a fonte de carbono) quando há mudança de cor, negativo (a estirpe não metaboliza a fonte de carbono) quando não houver mudança de cor, ou fraco (a estirpe é capaz de metabolizar pouco desta fonte de carbono) há uma fraca alteração de cor.

Como análise auxiliar, a turbidez de cada poço foi medido através do semi-automático Microstation™, verificando o crescimento das estirpes. Independente do tipo de leitura foi usado como referência o poço em que apresenta água como reagente e não é esperado mudança de cor.

A atividade de oxidase foi testada usando o kit BactiDrop™ Oxidase (Thermo Scientific), aplicando algumas gotas da solução acompanhada no kit sobre uma colônia em uma superfície limpa e misturando. Mudança de cor para roxeado, o efeito é positivo.

A atividade da catalase foi testada por contato das colônias com solução de H₂O₂ a 10% (v/v) e a avaliação foi realizada observando a formação de bolhas de gás. Testes de enzimas adicionais foram realizados usando tiras API 20NE (bioMérieux). O ensaio foi realizado segundo recomendações do fabricante, com inóculo ajustado para densidade 5 na escala de MacFarland. As leituras dos resultados foram feitas com 2 e 7 dias.

3.6 Determinação da Faixa de Hospedeiro

Foi realizado teste da capacidade individual dos isolados de induzirem nodulação em espécies da família das Fabaceae (*Crotalaria juncea*, *Arachis hypogaea*, *Lupinus albus*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, *Cajanus cajan*, *Pueraria phaseoloides*), utilizando garrafas tipo “long neck” com 350 mL de solução de Norris (NORRIS & DATE 1976).

As garrafas foram montadas utilizando sacos de papel em sua volta para impedir a entrada de luz para as raízes e tiras de papel no seu interior para permitir a ascensão da solução nutritiva por capilaridade até as sementes em sua fase de desenvolvimento inicial. Foi colocada na boca da garrafa uma pequena rolha de algodão para segurar a semente e manter umidade.

As garrafas montadas foram esterilizadas em autoclave. As sementes das espécies testadas foram desinfestadas por imersão por 30 segundos em álcool 70% seguida de imersão por dois minutos e meio em hipoclorito 2,5% com seis lavagens posteriores com água esterilizada. As sementes foram pré-germinadas em ágar e água (0,8%) durante três dias a 28°C. Plântulas com sinais de contaminação e/ou com crescimento anormal foram descartadas.

Todas as estirpes do grupo em estudo foram purificadas em meio de cultura YMA sólido. As sementes pré-germinadas foram colocadas nas garrafas já esterilizadas. E a inoculação foi com aplicação de 1 ml de suspensão de células das estirpes em água autoclavada. O experimento foi montado com quatro repetições. As plantas cresceram em sala com luzes de leds e fotoperíodo controlado (12 horas) durante 20 dias. A presença ou ausência de nódulos foi avaliada após 21 dias.

3.7 Experimento de Promoção de Crescimento em Casa de Vegetação Utilizando Minitoletes de Cana-de-Açúcar

Em 24/05/2016 foi conduzido um experimento em casa de vegetação para avaliar a capacidade das estirpes BR 10280 (*Bradyrhizobium*) e BR 10268 (*Rhizobium*) em promoverem o crescimento da cana-de-açúcar. O experimento foi realizado com toletes de cana-de-açúcar (cv. RB867515, 12 meses após plantio), cada um composto por uma única gema (minitolete).

Os minitoletes foram separados em três classes de acordo com o tamanho e diâmetro de cada um, para garantir a homogeneidade entre os tratamentos. Para cada tratamento foram separados 20 minitoletes de cada classe (tamanho). Os minitoletes foram submetidos a tratamento térmico (52°C durante 30 minutos) e, em seguida, tratados com fungicida (Comet a base de Piraclostrobina, 1 ml/litro) durante três minutos para diminuir a incidência de fungos patogênicos e bactérias naturalmente associados.

As estirpes BR 10280 e BR 10268 foram cultivadas a 28°C em meio de cultura líquido TY (VINCENT, 1970) sob agitação de 150 rpm. Como controle também foi avaliada a mistura de cinco estirpes do inoculante da cana-de-açúcar desenvolvido pela Embrapa (REIS *et al.*, 2009). Essas estirpes (*Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe BR 11281^T (PAL-5^T), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335 = HRC54), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504 = HCC103), *Paraburkholderia tropica* (BR 11366T = PPe 8^T) e *Nitrospirillum amazonense* (BR 11145 = CBAMc), nesse estudo designadas de 5Estir. Essas cinco estirpes foram cultivadas separadamente em meio de cultura DYGS (RODRIGUEZ *et al.*, 1986) líquido por 2 dias a 30°C.

Para a inoculação, minitoletes de cada tratamento foram colocados em sacos plásticos contendo o inoculante que consistiu das respectivas culturas bacterianas em meio TY com concentração 100x diluída num volume final de 1 litro (L) de água estéril por um período de uma hora. Para as estirpes do inoculante de cinco estirpes, a diluição foi realizada para as cinco no mesmo recipiente. Os minitoletes referentes aos controles não inoculados foram imersos em meio TY 100x diluído, sem cultura bacteriana presente.

Após a inoculação os minitoletes foram transferidos para bandejas contendo 13 kg uma mistura de areia e vermiculita (2:1 v/v) autoclavada. Para cada tratamento foram usadas quatro bandejas contendo 15 minitoletes (cinco de cada classe de tamanho), sendo o total de 60 minitoletes. As bandejas foram organizadas em casa de vegetação, delineamento experimental em blocos ao acaso e irrigadas com água esterilizada de acordo com a necessidade das plantas, sempre aplicando o mesmo volume de água para todas as bandejas.

A emergência das plantas foi acompanhada diariamente até o transplantio para vasos, que ocorreu 24 dias após o plantio (DAP). Foi determinado então o índice de velocidade de emergência (IVE), aqui denominado de índice de velocidade de brotação (IVB), pela fórmula $IVB = \sum(Gt / Tt)$ (MAGUIRE, 1962) sendo Gt o número de plantas com broto emergido na superfície do substrato no dia t da contagem e Tt o número de dias percorridos naquele dia após o plantio.

Após a emergência, plantas representativas de cada tratamento foram selecionadas e cuidadosamente transplantadas individualmente para vasos contendo 3 ou 10 litros de uma mistura de areia e vermiculita (2:1 v/v) livre de nitrogênio conforme análise realizada após autoclavagem. As plantas transplantadas para vasos de 3 litros (10 por tratamento) foram coletadas 30 dias após o transplantio (DAT) e as que foram transplantadas para vasos de 10 litros (10 por tratamento) foram coletadas aos 75 DAT.

O substrato foi suplementado com adição separadamente em cada vaso de superfosfato simples (3,8 g/litro), sulfato de potássio (0,23 g/litro), calcário agrícola (0,9 g/litro) e solução de micronutrientes (FRANCO e DOBEREINER, 1967) acrescentado de MnSO₄ (0,5g/L). O nitrogênio foi adicionado na forma de uma solução de (NH₄)₂SO₄ para o equivalente de 40 kg

N/ha (tratamento controle baixo N e tratamentos inoculados) ou 120 kg N/ha (tratamento não inoculado alto N). O experimento consistiu em cinco tratamentos:

1. (+N) Não inoculado com maior nível de N (120kg/ha) aplicado em forma de solução com concentração de 60mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
2. (-N) Não inoculado com menor nível de N (40kg/ha) aplicado em forma de solução com concentração de 20mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
3. Inoculação com o inoculante de cinco estirpes da cana (*Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Nitrospirillum amazonense* (BR 11145) e *Paraburkholderia tropica* (BR 11366));
4. Inoculado com a estirpe BR 10268 (P5-2) (*Rhizobium* sp.) com a mesma dose de N aplicada no tratamento -N;
5. Inoculado com a estirpe BR 10280 (P9-20) (*Bradyrhizobium* sp.) com a mesma dose de N aplicada no tratamento -N.

Os vasos com as plantas foram organizadas em casa de vegetação da Embrapa Agrobiologia, em blocos casualizados contendo os cinco tratamentos em cada bloco.

Na primeira coleta, aos 30 DAT, avaliou-se o volume das raízes (por deslocamento de água) (VR), massa seca das raízes (MSR), comprimento da parte aérea (CPA) e massa seca da parte aérea (MSPA). As raízes, ainda foram escaneadas e as imagens analisadas usando o software Winrhizo (Regent Systems, Quebec, Canadá), onde foi determinado comprimento total (CTR) e área total da superfície das raízes (ATSR).

A segunda coleta foi realizada aos 75 DAT e foram avaliados: diâmetro do colmo (DC), comprimento da parte aérea (CPA), volume (deslocação de água) e massa seca das raízes (MSR), massa seca dos minitoletes (MSMT), massa seca da parte aérea, área foliar (AF), teor de N nos minitoletes (TeorNMT), nas raízes (TeorNR), e parte aérea (TeorNPA), além de nitrogênio total dos minitoletes (NTMT), raízes (NTR) e parte aérea (NTPA). Os teores de N de todas as partes da planta foram somados para determinar o teor de nitrogênio total (TeorNT). O mesmo foi feito para determinar o nitrogênio total das plantas (NTS).

Para determinar o volume das raízes por deslocação de água, o sistema radicular de cada planta, após lavagem com água corrente para remoção de areia e vermiculita, foi submerso individualmente em uma proveta com água e a diferença do volume de antes e após a submersão foi registrada (em ml).

Para as determinações de massa seca, as plantas (sistemas radicular e parte aérea) foram secadas a 65°C em estufas com circulação forçada até atingirem peso constante e, em seguida, pesadas utilizando uma balança de precisão. Após pesagem, foram passadas em moinho de facas tipo Willey, com peneiras de 2 mm.

O comprimento da parte aérea foi determinado utilizando uma régua graduada, foi medido da base da planta até o ápice da folha +1. O diâmetro do colmo foi obtido utilizando um paquímetro.

A área foliar foi calculada a partir de dados obtidos da folha +1. Utilizando a fórmula $AF = C \times L \times 0,75 \times (N + 2)$, em que C é o comprimento da folha +1, L é a largura da folha +1, 0,75 é o fator de correção para área foliar da cultura, e N é o número de folhas abertas com pelo menos 20% de área verde.

O teor de N das partes das plantas aos 75 DAT foi determinado utilizando o método de Semi-micro Kjeldahl (NOGUEIRA & SOUZA, 2005) no laboratório de Química Agrícola na Embrapa Agrobiologia em Seropédica-RJ. Para determinar o nitrogênio total de cada parte da planta, foi multiplicada a massa seca pelo teor de N determinado.

Antes de serem realizadas as análises estatísticas, verificou-se as pressuposições de normalidade e homogeneidade de variâncias dos resíduos pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett com uso do programa R (R Core Team, 2016), a 5% de probabilidade. As análises de variâncias e teste de medias foram realizadas com o software SISVAR (FERREIRA, 2014). As médias foram comparadas utilizando o teste t, a 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudo anterior, utilizando feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) como “planta isca” para isolamento de rizóbios naturalmente associados a raízes de cana-de-açúcar, foi obtida uma coleção de bactérias, que incluiu os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Trinta e seis (36) desses isolados compuseram um grupo de alto nível de similaridade genético baseado no seu perfil ERIC-PCR e alguns representantes apresentaram atividade de nitrogenase *in vitro* (ROUWS *et al.*, 2013).

Um experimento com inoculação de minitoletes de cana-de-açúcar com o isolado BR 10280^T (representante do grupo) foi conduzido em casa de vegetação durante 30 dias. Esse experimento mostrou a capacidade desse isolado em aumentar o volume radicular e massa seca de raízes da cana-de-açúcar (MATOS *et al.*, 2015).

No intuito de melhor conhecer a posicionamento taxonômico desses isolados obtidos de cana-de-açúcar, uma análise filogenética com o gene *recA* foi realizada. Nessa análise, foi observado que alguns grupos desses novos isolados ficaram distantes de qualquer espécie já descrita (Figura 1), inclusive o grupo de isolados que se mostrou com maior abundância de perfil ERIC-PCR, atividade de nitrogenase *in vitro* e capacidade de promover efeito positivo em cana-de-açúcar.

Usando essas informações como referência, quatro estirpes representantes desse grupo (P9-20=BR 10280^T, P4-7=BR 10266, P5-24=BR 10555 e P7-18=BR 10556) foram selecionadas para estudos mais detalhados.

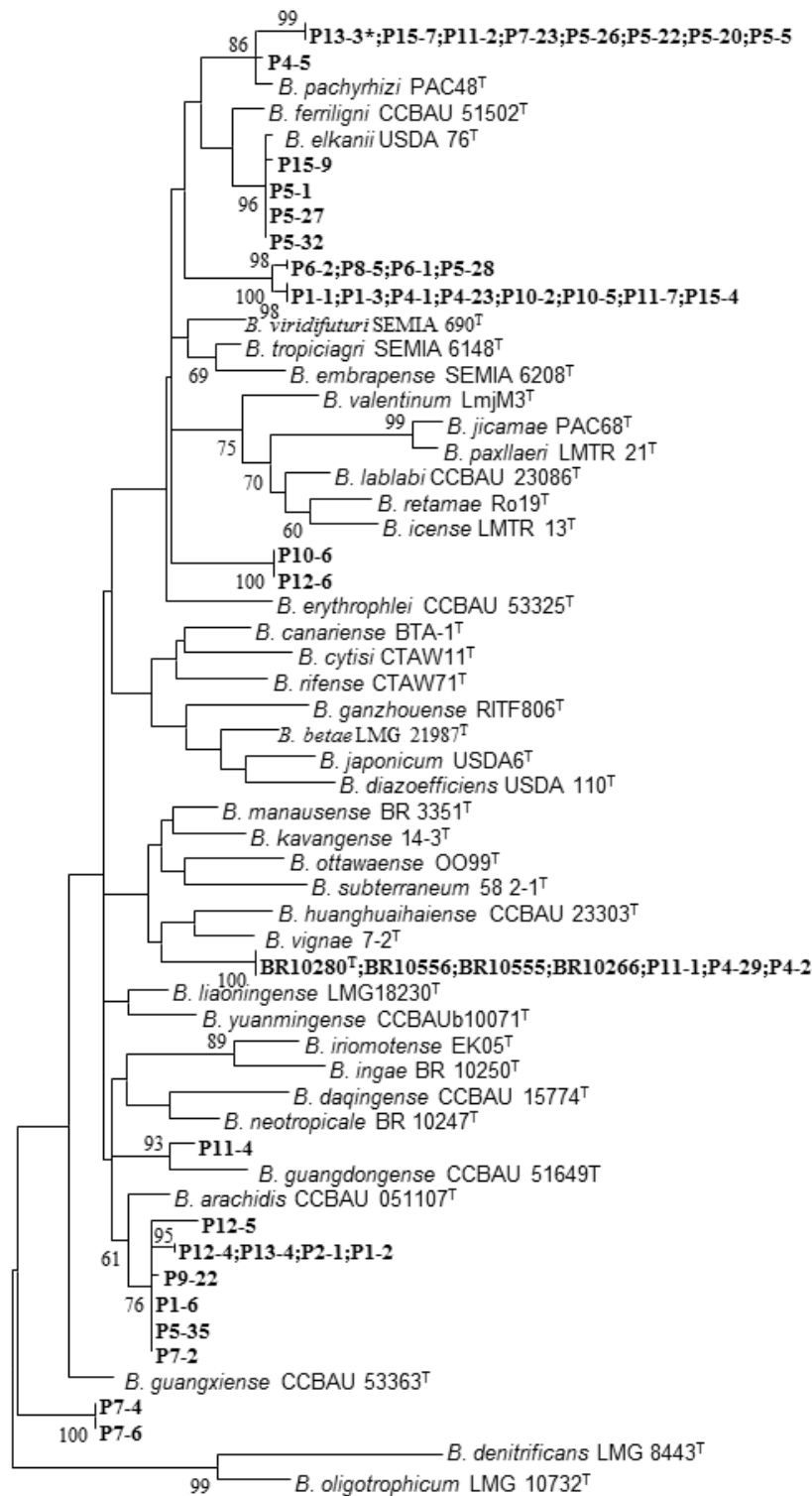


Figura 1. Filograma *Maximum likelihood* (ML) estimado a partir de 369 posições de pares de bases do gene *recA*. Valores de *bootstrap* são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo de Kimura 3- parâmetros + G + I, como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA 6. Isolados obtidos de raízes de cana-de-açúcar com uso de plantas isca estão mostrados em negrito.

4.1 Caracterização Genética

4.1.1 Análise filogenética do gene 16S rRNA

Com base em análise filogenética com o gene *recA*, que mostrou diferenças entre as estirpes tipo das espécies já descritas do gênero *Bradyrhizobium*, as estirpes BR 10280^T, BR 10266, BR 10555 e BR 10556 foram selecionadas para melhor caracterização taxonômica.

Análise das sequências quase completas (1224 nucleotídeos (nt)) do gene que codifica o 16S rRNA das quatro estirpes as colocaram no super clado de *Bradyrhizobium japonicum* e com 100% de similaridade com as sequências de *B. iriomotense* e *B. ingae* (Figura 2). Porém, o 16S rRNA tem se mostrado pouco informativo para a classificação de estirpes de *Bradyrhizobium* ao nível de espécies, enquanto a MLSA tem sido utilizada para fornecer uma classificação mais informativa deste gênero (WILLEMS *et al.*, 2001, MENNA *et al.* 2009, RIVAS *et al.*, 2009).

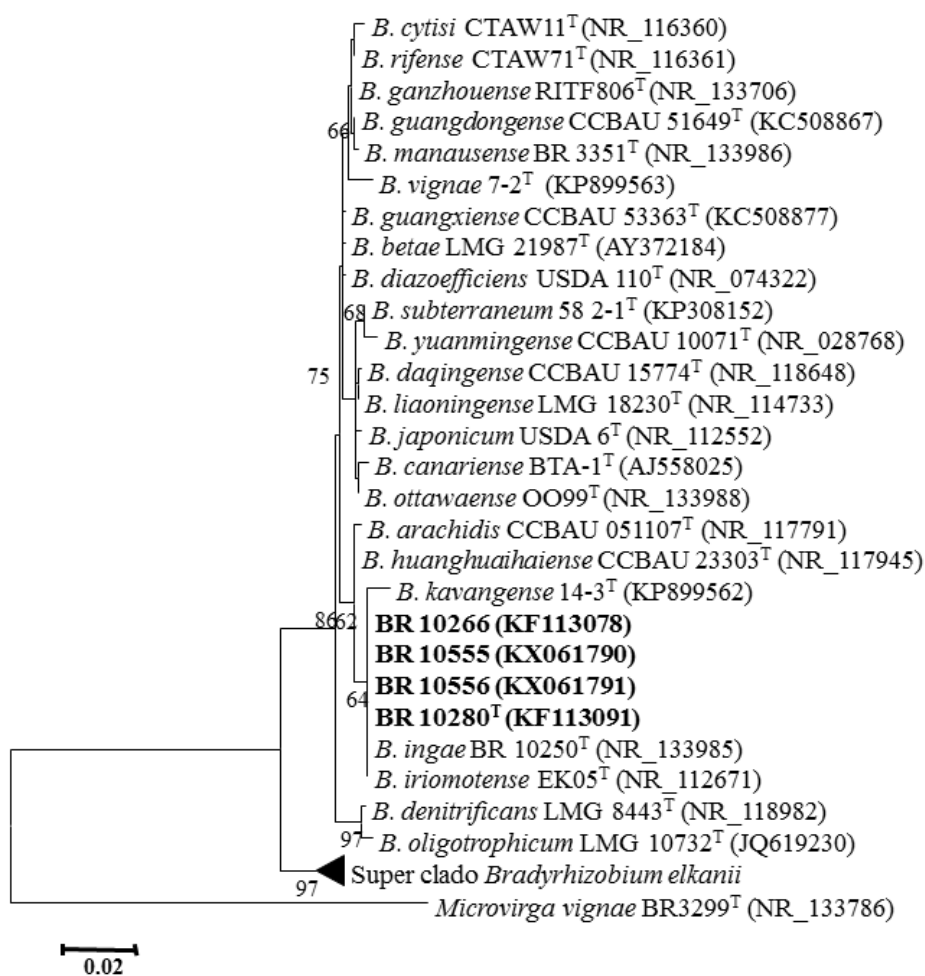


Figura 2. Filograma *Maximum likelihood* (ML) estimado a partir de 1224 posições de pares de bases do gene 16S rRNA. Valores de *bootstrap* são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo de Kimura 3- parâmetros + G + I, como indicado pela função de teste modelo do programa MEGA 6. *Microvirga vignae* BR 3299^T foi usado como grupo externo. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site.

4.1.2 Análise filogenética por MLSA e região entre os genes 16S e 23S rRNA

As análises filogenéticas foram conduzidas inicialmente usando sequências alinhadas de três genes *housekeeping* concatenados (*recA*, *glnII* e *dnaK*), dos quais sequências estavam disponíveis para todas as estirpes tipo do super clado do *B. japonicum* (Anexo A). Nesta análise, as novas estirpes foram agrupadas em um clado com a espécie mais próxima sendo *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T, com 95,23% de similaridade de sequência (anexo B; Tabela 3). Quando foi realizada a concatenação utilizando os quatro genes *housekeeping*, incluindo o gene *atpD* na análise, foi obtido um resultado similar ao anterior, com semelhança de sequência com *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T de 95,85% (Figura 3; Tabela 3).

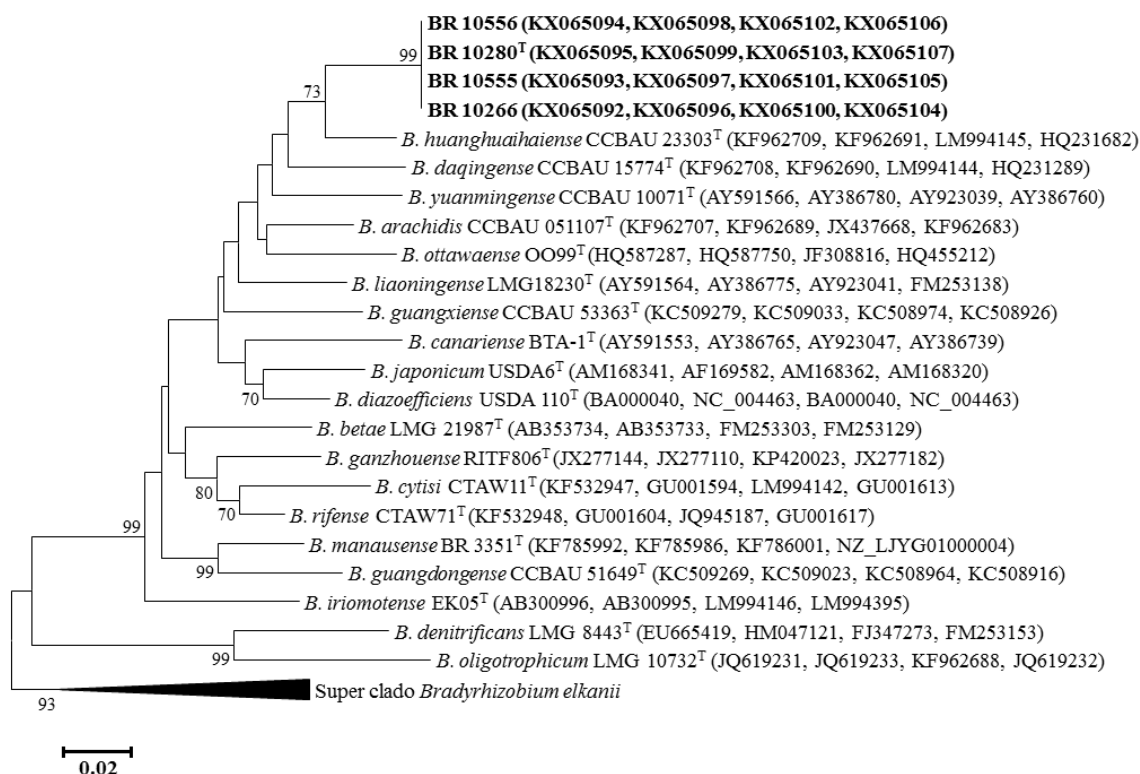


Figura 3. Filograma *Maximum likelihood* (ML) estimado a partir das sequências concatenadas dos genes *recA* (375 nt), *glnII* (479 nt), *dnaK* (207 nt) e *atpD* (428 nt). Valores de *bootstrap* são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida através do modelo GTR + G + I. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site.

Como as sequências dos genes acima se mostraram idênticos nos estudos filogenéticos realizados entre as novas estirpes obtidas de cana, assumiu-se que estas quatro estirpes são geneticamente idênticas ou muito semelhantes e, portanto, as informações da sequência do genoma da estirpe tipo BR 10280^T foram utilizadas em outras análises filogenéticas.

O espaço interno transcrito (ITS) entre os genes 16S e 23S rRNA é considerado um marcador filogenético importante, em geral, dando resultados coerente com a técnica de hibridização DNA-DNA (WILLEMS *et al.*, 2003).

A análise das sequências do ITS agrupou as estirpes em estudo, em um clado mais próximo de *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T com 98,78% de semelhança de sequência, sendo semelhante com os resultados obtidos na MLSA (Figura 3; Tabela 3).

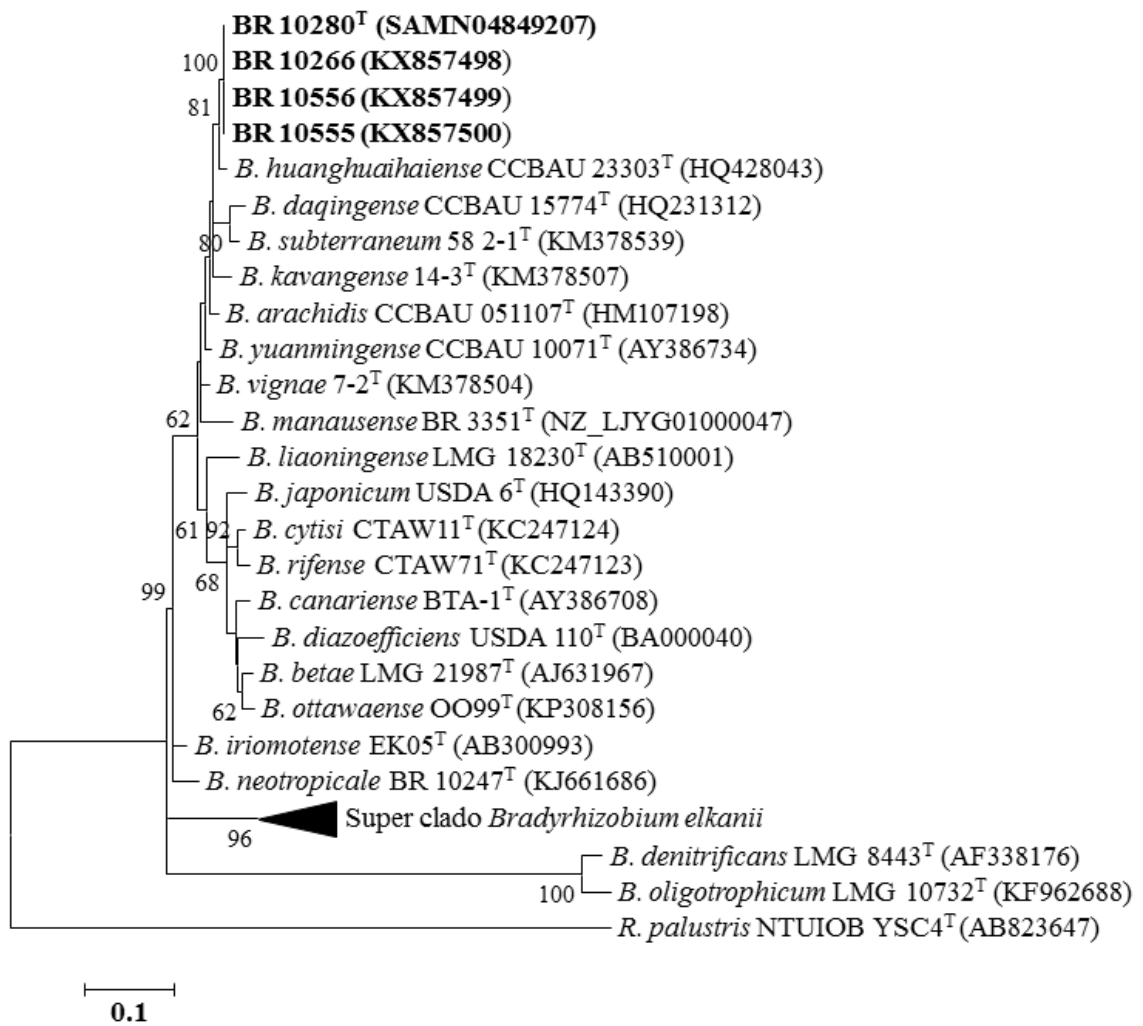


Figura 4. Filograma *Maximum likelihood* (ML) estimado a partir de 583 posições de nucleotídeos do espaçador interno transcrito (ITS) entre os genes de 16S e 23S rRNA. Valores de *bootstrap* são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida utilizando o modelo de Kimura 2-parâmetro + G. *Rhodopseudomonas palustris* NTUIOB YSCA foi usado como grupo externo. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site.

Tabela 3. Percentual de similaridade de nucleotídeos em diferentes genes entre a estirpe BR 10280^T e estirpes representantes. As duas últimas colunas mostram valores para as sequências concatenadas de três ou quatro genes. Valores de similaridade foram determinadas usando o software MEGA 6 ‘continua’.

Estirpes/genes	16S rRNA	ITS	recA	glnII	dnaK	atpD	nodC	recA, glnII, dnaK	recA, glnII, dnaK e atpD
BR 10280 ^T (P9-20)									
BR 10555 (P5-24)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
BR 10556 (P7-18)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
BR 10266 (P4-7)	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	99,51%	98,10%	91,81%	95,92%	94,99%	95,42%	88,97%	94,30%	94,62%
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T	99,18%	93,40%	92,12%	94,14%	90,76%	94,42%	-	92,72%	93,21%
<i>B. canariense</i> BTA-1 ^T	98,76%	94,90%	90,00%	93,23%	93,41%	94,42%	69,00%	92,09%	92,76%
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T	98,85%	93,90%	90,27%	91,84%	89,10%	94,67%	68,85%	90,71%	91,86%
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	98,76%	97,60%	92,13%	95,04%	97,04%	95,42%	89,51%	94,38%	94,68%
<i>B. diaoefficiens</i> USDA110 ^T	98,51%	78,70%	86,26%	87,78%	84,44%	93,39%	-	86,40%	88,50%
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T	99,18%	92,80%	88,44%	94,80%	96,01%	96,65%	89,51%	92,86%	93,98%
<i>B. elkani</i> USDA 76 ^T	96,83%	87,90%	90,58%	88,48%	86,80%	92,10%	83,19%	88,87%	89,81%
<i>B. embrapense</i> SEMIA 6208 ^T	97,08%	88,40%	89,95%	89,46%	86,23%	91,86%	77,51%	89,00%	89,79%
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T	97,08%	88,60%	92,71%	90,18%	-	-	74,36%	-	-
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T	94,67%	88,00%	90,88%	86,77%	-	-	82,91%	-	-
<i>B. ganzhouense</i> RITF806 ^T	99,01%	-	91,23%	94,36%	88,52%	95,17%	67,68%	92,09%	92,99%
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T	98,93%	-	89,69%	94,36%	87,97%	94,66%	-	91,45%	92,40%
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T	99,18%	-	94,17%	93,45%	95,00%	94,92%	-	93,99%	94,26%
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	99,67%	98,80%	92,98%	95,69%	98,04%	97,38%	89,51%	95,23%	95,85%
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	97,00%	-	88,11%	89,48%	85,08%	93,39%	74,30%	88,03%	89,60%
<i>B. ingae</i> BR 10280 ^T	100,00%	-	90,60%	94,14%	89,66%	93,92%	67,21%	91,98%	-
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T	100,00%	95,20%	91,22%	93,00%	91,30%	-	68,45%	91,99%	92,54%

-: Dados não disponíveis

Continuação tabela 3...

Estirpes/genes	16S rRNA	ITS	recA	glnII	dnaK	atpD	nodC	recA, glnII, dnaK	recA, glnII, dnaK e atpD
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	98,76%	95,60%	89,05%	94,81%	96,03%	93,91%	89,51%	93,06%	93,30%
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	96,74%	87,20%	86,89%	88,25%	86,25%	93,92%	70,28%	87,21%	89,19%
<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T	99,42%	97,60%	92,41%	95,26%	95,01%	-	88,14%	94,19%	-
<i>B. lablabi</i> CCBAU 23086 ^T	96,91%	85,60%	89,69%	89,45%	86,24%	93,15%	73,86%	88,81%	90,07%
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	98,85%	94,50%	93,59%	94,14%	96,03%	94,92%	62,76%	94,30%	94,47%
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T	98,85%	95,40%	95,04%	95,92%	87,40%	94,92%	67,28%	93,99%	94,26%
<i>B. neotropicae</i> BR 10247 ^T	97,84%	95,20%	92,13%	94,36%	89,66%	90,80%	66,66%	92,60%	-
<i>B. oligotrophicus</i> LMG 10732 ^T	98,43%	77,50%	87,51%	84,77%	87,40%	94,17%	-	86,04%	87,42%
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T	98,85%	94,10%	92,72%	94,57%	95,51%	-	89,51%	94,10%	94,11%
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	96,91%	89,00%	90,62%	87,47%	86,80%	92,62%	82,00%	88,41%	89,64%
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	97,00%	86,20%	87,21%	88,50%	86,25%	92,37%	73,90%	87,42%	88,87%
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	97,17%	85,90%	87,77%	88,75%	82,68%	92,07%	73,62%	87,09%	88,57%
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T	98,93%	93,90%	90,02%	93,23%	90,21%	96,41%	70,68%	91,43%	92,90%
<i>B. subterraneum</i> 58 2-1 ^T	98,68%	96,70%	91,52%	95,04%	89,09%	-	-	92,62%	-
<i>B. tropiciagri</i> SEMIA 6148 ^T	96,48%	88,80%	90,90%	88,00%	88,52%	93,14%	80,41%	89,08%	90,25%
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	96,74%	86,60%	89,99%	82,40%	87,40%	90,54%	73,99%	85,95%	87,27%
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	98,51%	97,40%	94,17%	96,36%	90,21%	-	87,60%	94,39%	-
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	97,08%	88,80%	90,58%	88,98%	88,53%	-	-	89,39%	-
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	98,34%	97,90%	92,72%	93,68%	96,53%	94,17%	89,74%	93,88%	93,95%
<i>Microvirga vignae</i> BR3299 ^T	91,05%	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodopse. palustris</i> NTUIOB YSC4	-	74,00%	-	-	-	-	-	-	-

-: Dados não disponíveis

4.1.3 Análise filogenética do gene *nodC*

A análise filogenética das sequências do gene *nodC* das novas estirpes as agruparam em um ramo separado perto de *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T, *B. ottawaense* OO99^T, *B. diazoefficiens* USDA 110^T, *B. daqingense* CCBAU 15774^T, *B. japonicum* USDA6^T e *B. yuanmingense* CCBAU 10071^T, com 89% de semelhança de sequências para todas estas estirpes (Figura 5; Tabela 3).

Além de *B. yuanmingense* CCBAU 10071^T, todas estas espécies formam nódulos eficientes em soja (*Glycine max*) (YAO *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2012; DELAMUTA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013 YU *et al.*, 2014), sendo as estirpes em estudo incapazes de induzirem nodulação nessa cultura. O motivo das sequências do gene *nodC* de nenhuma das espécies já descritas do gênero *Bradyrhizobium* não se agruparem com as do grupo desse estudo pode ser relacionado ao fato de terem sido obtidos de gramíneas e o gene *nodC* está envolvido na determinação do hospedeiro específico (KAMST *et al.*, 1997; LAGUERRE *et al.*, 2001).

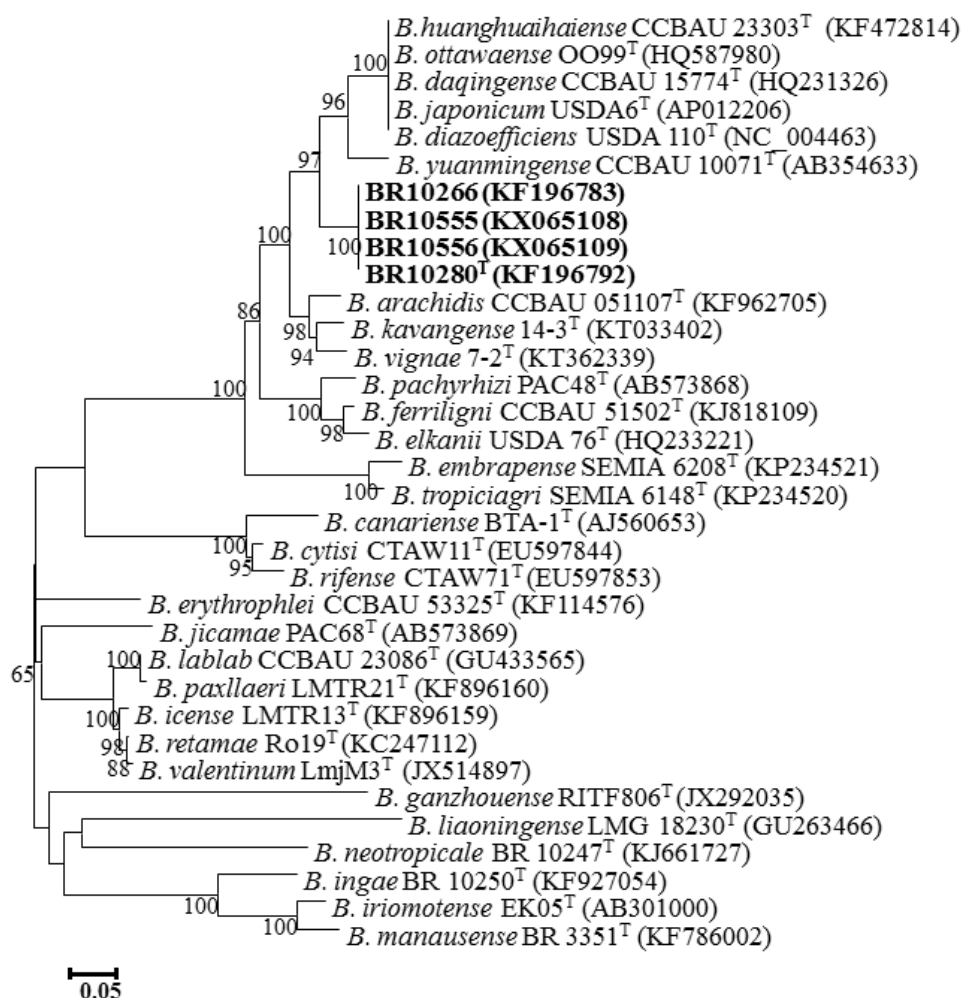


Figura 5. Filograma *Maximum likelihood* (ML) estimado a partir de 441 posições de nucleótidos do gene *nodC*. Valores de *bootstrap* são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida usando o modelo Kimura 3-parâmetro + G+ I. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site.

4.1.4 Teste de inoculação cruzada

Outro ensaio realizado foi o teste de inoculação cruzada, onde foram inoculadas as estirpes BR 10280^T e BR 10266 em algumas espécies de leguminosas. Os resultados mostraram que nenhuma das estirpes testadas (BR 10280^T e BR 10266) induziu a formação de nódulos em *Glycine max* em contraste com *B. huanghuaihaiense*, *B. ottawaense*, *B. diazoefficiens*, *B. daqingense* e *B. japonicum*. No entanto, as estirpes BR 10280^T e BR 10266 induziram a formação de nódulos ativos em *Vigna unguiculata* e *Cajanus cajan* e nódulos ineficientes em *Phaseolus vulgaris* (Tabela 4). Portanto, o teste de inoculação cruzada claramente funciona para fortalecer as diferenças entre as novas estirpes destas e de outras espécies de *Bradyrhizobium*.

Tabela 4. Experimento de inoculação cruzada com isolados obtidos de raízes de cana-de-açúcar em sementes de espécies de leguminosas.

Estirpes: 1, BR 10280^T; 2, BR 10266; 3, BR 10555; 4, BR 10556; 5, *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T.

Espécies testadas	1	2	3	4	5*
<i>Crotalaria juncea</i>	nod+	nod+	nod+	nod+	nd
<i>Arachis hypogaea</i>	nod+	nod+	nod+	nod+	nd
<i>Cajanus cajan</i>	fix+	fix+	fix+	fix+	nd
<i>Phaseolus vulgaris</i>	nif-	nif-	nif-	nif-	nod-
<i>Glycine max</i>	nod-	nod-	nod-	nod-	nif+*
<i>Vigna unguiculata</i>	nif+	nif+	nif+	nif+	nif+*

nod+ =induz nodulação; nod- = não induz nodulação; nif+ = nódulos ativos; nif- =nódulos não ativos; nd= não determinado; * Dados obtidos a partir do estudo de Zhang et al. (2012).

4.1.5 Average Nucleotide Identity e Conteúdo G + C

A análise de ANI diferenciou claramente a estirpe BR 10280^T da espécie *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T com uma ANI de 90,84%. Valores de ANI menores que 95-96% tem sido considerados correspondentes a 70% de similaridade pela técnica de hibridização DNA-DNA, que é o nível padrão para a diferenciação de espécies procarióticas (RICHTER & ROSSELLÓ-MORA, 2009). Análise de ANI também foram realizadas comparando o genoma da estirpe BR 10280^T com outras espécies próximas e em todos estes casos, os valores ficaram abaixo do limite para a definição das espécies: *B. arachidis* CCBAU 051107^T (87,46% ANI), *B. yuanmingense* CCBAU 10071^T (86,81 % ANI) e *B. daqingense* CCBAU 15774^T (86,7%). Os valores de ANI (%) encontrados entre a comparação do genoma da estirpe BR 10280^T e as demais espécies relacionadas estão na Tabela 5.

Tabela 5. Identidade nucleotídica (%) entre a BR 10280^T e as estirpes tipo das espécies mais próximas.

Estirpes relacionadas	BR 10280 ^T
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	90,84%
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	87,46%
<i>B. yuanmingense</i> CCBAU 10071 ^T	86,81%
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	86,70%

O genoma da estirpe BR 10280^T apresentou teor de G+C de 60,92 mol%, o que está de acordo com a sua classificação no gênero *Bradyrhizobium* e diferente de *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T, que apresenta um conteúdo de 63,9 mol%.

4.1.6 Perfil de ácidos graxos

Os ácidos graxos celular mais abundantes detectados foram a fração molecular total 8 (C18:1 ω 6c/C18:1 ω 7c) (81.96-85.1%) e C16:0 (12.99-14.73%). Pequenas quantidades da fração individual C19:0cyclo ω 8c (0.75-3.3%), também foram detectados em todas as estirpes. A presença da funcionalidade da fração molecular total 8 e C16: 0 é consistente com o gênero *Bradyrhizobium* (TIGHE *et al.*, 2000). Os valores referentes aos perfis de ácidos graxos estão na Tabela 6.

Tabela 6. Perfis de ácidos graxos (%) obtidos para as estirpes em estudo e a estirpe mais próxima *B. huanghuaihaiense*.

Estirpes: 1, BR 10280^T; 2, BR 10266; 3, BR 10555; 4, BR 10556; 5, *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T.

Ácido graxo (%)	1	2	3	4	5
C16:0	14.11	12.99	13.38	14.73	10.65*
C17:1 ω 8c	0.6	0	0.81	0	1.45*
C17:0	0	0	0.78	0	0.71*
C18:0	1.04	0	0.96	0	0.85*
C19:0 cyclo ω 8c	1.39	1.91	0.75	3.30	0.66*
Fração total 8**	82.86	85.1	83.32	81.96	75.92*

Dados obtidos a partir do estudo de Zhang *et al.* (2012)*

Fração total 8= C18:1 ω 6c/C18:1 ω 7c **

4.2 Caracterização Morfofisiológica

4.2.1 Características morfofisiológicas das colônias e células.

As colônias da estirpe tipo BR 10280^T, representante do grupo em estudo, se mostraram brancas, opacas, circulares e convexas com um diâmetro de 1,5 mm após o crescimento por sete dias a 28°C em meio de cultura YMA. As suas células apresentam forma de bastonetes Gram-negativas aeróbicas medindo aproximadamente 1,8 x 0,8 μ m e se movimenta por flagelos polares (Figura 6).

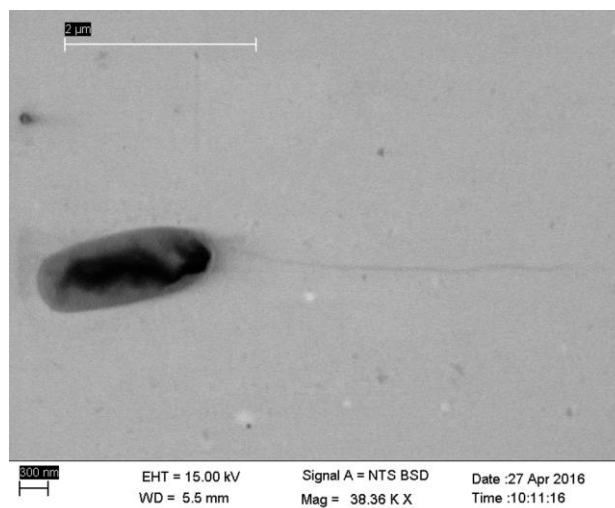


Figura 6. Micrografia em microscópio eletrônico de uma célula da estirpe BR 10280^T manchada de uranila carregando um flagelo. A imagem foi obtida usando um Evo LS 10 ambiental microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss), equipado com um detector STEM.

4.2.2 Alteração no pH do meio YMA

Todas as estirpes em estudo provocaram alteração no pH do meio de cultura YMA, que inicialmente era neutro com pH 7 e coloração esverdeada. Aos sete dias de crescimento das estirpes a 28°C foi verificada a coloração azulada, indicativo de alcalinização do meio. Sendo esta, uma característica comum do gênero *Bradyrhizobium*.

4.2.3 Avaliação de crescimento em diferentes condições de temperatura, pH e salinidade

As quatro estirpes cresceram fracamente a 20°C e a temperatura de crescimento ótima estava entre 28 e 30°C, o que é comum no gênero *Bradyrhizobium*. O crescimento ocorreu a 37°C, mas não a 40°C.

A concentração máxima tolerável de sal foi de NaCl 0,3%. O crescimento ocorreu em valores de pH de 5 a 12. Algumas das características fenotípicas das novas estirpes que as diferenciam da espécie mais próxima *B. huanghuaihaiense* são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Características distintivas entre as estirpes em estudo e a estirpe tipo da espécie mais próxima *B. huanghuaihaiense*.

Estirpes: 1, BR 10280^T; 2, BR 10266; 3, BR 10555; 4, BR 10556; 5, *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T.

Características de crescimento	1	2	3	4	5*
Temp. de crescimento (°C)	20-37	20-37	20-37	20-37	10-37*
Tolerância NaCl (% w/v)	0,3	0,3	0,3	0,3	<1*
Faixa de crescimento em pH	5-12	5-12	5-12	5-12	6-9*

Dados obtidos a partir do estudo de Zhang et al. (2012)*.

5.2.4 Resistência ou sensibilidade a antibióticos

Todas as estirpes do grupo em estudos apresentaram a mesma reação aos antibióticos e concentrações usadas. Na tabela 8 estão os resultados observados, comparados aos que foram

determinados para a estirpe mais próxima *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T em estudo realizado por Zhang et al. (2012).

Tabela 8. Resistência a antibióticos (antibiograma) das estirpes em estudo e da espécie mais próxima *B. huanghuaihaiense*.

Estirpes: 1, BR 10280^T; 2, BR 10266; 3, BR 10555; 4, BR 10556; 5, *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T.

Resistencia a antibioticos (µg/disco)	1	2	3	4	5*
Ampicilina (10)	+	+	+	+	+
Ampicilina (25)	+	+	+	+	+
Cloramfenicol (30)	+	+	+	+	+
Cloramfenicol (50)	+	+	+	+	+
Eritromicina (15)	+	+	+	+	+
Eritromicina (30)	w	w	w	w	+
Gentamicina (10)	-	-	-	-	nd
Gentamicina (30)	-	-	-	-	+
Kanamicina (30)	-	-	-	-	nd
Rifampicina (30)	-	-	-	-	nd
Rifampicina (5)	-	-	-	-	nd
Estreptomicina (10)	-	-	-	-	nd
Estreptomicina (25)	-	-	-	-	+
Tetraciclina (10)	w	w	w	w	nd
Tetraciclina (30)	-	-	-	-	nd

(+) indica resistência, (-) indica sensibilidade. (w) indica pouca sensibilidade. (nd) não determinado (*) Dados obtidos a partir do estudo de Zhang et al. (2012). Nome de antibiótico marcado em negrito representa diferença encontrada entre as estirpes do grupo em estudos e a estirpe mais próxima.

4.2.5 Utilização de fontes de carbono e reação enzimática

No que diz respeito à atividade enzimática, as estirpes foram positivas para oxidase e catalase, bem como para a hidrólise da esculina, atividade da uréase, hidrólise de gelatina e atividade de β -galactosidase. Atividade de nitrato redutase foi negativa.

Como fonte de carbono, as estirpes apresentaram resultados positivos para L-arabinose, D-arabitol, D-manitol, D-mannose, ácido urânico, ácido bromo succinic, metil piruvato, Mono-metil-succinato, ácido acético, ácido cis-aconítico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido D-glucónico, ácido β e λ -hidroxidobutírico, ácido p- hidroxifenilacético, ácido D,L-láctico, Ácido malónico, ácido propiónico, ácido quínico, ácido D-sacarico, ácido sebácico e ácido succínico. Resultados negativos foram obtidos para D-melibiose, β -metil-D-glucósido, D-psicose, D-rafinose, L-ramnose, D-sorbitol, sacarose, D-trealose, turanose, xilitol, m-inositol, α -D-lactose, lactulose, maltose, N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina, D- e L-Alanina, L-alanil-glicina, L-treonina, D,L-carnitina, inosina, uridine, timidina, feniletilamina, putrescina e 2-aminoetanol.

Alguns resultados de utilização de fontes de carbono distintas entre as estirpes estudadas e a estirpe tipo da espécie mais próxima *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T são mostrados na Tabela 9. Lista com todas as fontes de carbono testadas estão no anexo C.

Tabela 9. Diferenças quanto a capacidade de uso de fontes de carbono, por meio do teste Biolog GN2, entre as estirpes em estudo e estirpes tipo da espécie mais próxima *B. huanghuaihisense*.

Estirpes: 1, BR 10280^T; 2, BR 10266; 3, BR 10555; 4, BR 10556; 5, *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T.

Utilização de fontes de carbono	1	2	3	4	5
L-Asparagina	w	w	w	w	+
Ácido L-Aspartico	w	+	w	w	+
Ácido L-Glutamico	w	w	w	w	+
Timidina	-	-	-	-	+
Glicerol	-	w	-	w	+
D-L- α -Glicerol Fosfato	-	-	-	w	+
Ácido Acético	+	+	+	+	-
Ácido Cis-Aconítico	+	+	-	+	-
Ácido α -Hidroxido Butírico	-	-	-	-	w
Ácido α -Keto Valérico	-	-	-	-	w
Ácido p-Hidroxi fenilacético	+	+	+	+	w

(+) indica capacidade de metabolizar a fonte de C, (-) indica incapacidade de metabolizar a fonte de C. (w) indica fraca capacidade de metabolizar a fonte de C.

4.3 Promoção de Crescimento de Cana-de-Açúcar pelas Estirpes P9-20 e P5-2 em Condições de Casa de Vegetação

Realizou-se um experimento em casa de vegetação para ser avaliado o potencial de promoção de crescimento dos rizóbios P5-2 (BR 10268) e P9-20 (BR 10280) em cana-de-açúcar comparando com o efeito do inoculante composto por cinco estirpes desenvolvido na Embrapa Agrobiologia (5estir).

Minitoletes de cana foram inoculadas ou não e brotados em bandejas com substrato autoclavado e então transplantados para um substrato similar com nível baixo de nitrogênio (40Kg/ha, -N). Como controle, plantas não inoculadas foram transferidas para vasos com maior dosagem de N (120Kg/ha, +N). Coletas foram realizadas aos 30 e 75 dias após o transplântio (DAT).

4.3.1 Análise de brotamento dos minitoletes inoculados

Ao determinar o índice de velocidade de brotamento (IVB) através dos dados de brotamento dos minitoletes de cana-de-açúcar ao longo de 24 dias após o plantio (DAP), o isolado P5-2 (*Rhizobium* sp.) demonstrou uma média superior em relação aos demais tratamentos, embora não tenha sido estatisticamente diferente (Figura 7). Esse maior valor médio no IVB sugere um potencial no isolado P5-2 em aumentar a velocidade de brotamento em gemas de cana-de-açúcar, embora sejam necessários novos ensaios com mais repetições para que seja possível a diminuição de variabilidade.

Aumento na velocidade de brotamento induzido em cana inoculada com o isolado P5-2 já foi observado anteriormente em experimento prévio com as mesmas condições avaliadas nesse estudo (MATOS, 2015), embora não tenham sido realizados testes para determinar o mecanismo promotor desse efeito em nenhum dos casos. Resultados, onde bactérias promotoras de crescimento são capazes de influenciar no brotamento de minitoletes de cana-

de-açúcar estão presentes, também, em Chaves *et al.* (2015). Esses autores ainda avaliaram a produção de compostos indólicos *in vitro* de seus isolados e detectaram relação entre a produção desses compostos indólicos e a velocidade de brotamento de minitolete de cana-de-açúcar.

Dentre os efeitos associados do ácido 3 indol acético (AIA) à planta, destacam-se a indução de raízes laterais e adventícias, o estímulo à divisão celular, e o alongamento de raízes e colmos (TEALE *et al.*, 2006). Considerando o uso de sistema de produção de mudas pré-brotadas (LANDELL *et al.*, 2012), que trás como vantagem a necessidade de um menor volume de colmos para serem utilizados como material propagativo no plantio, devido a uma alta taxa de aproveitamento desses colmos. Além disso, esse sistema proporciona produção de mudas mais vigorosas e ainda permite um plantio uniforme, com a possibilidade de escolha de gemas de maior qualidade e livres de patógenos.

Nesse sentido, a diminuição do tempo de viveiro dessas mudas, por meio do aumento na velocidade de brotação dos minitoletes, é um fator favorável para esse novo sistema de produção de mudas que está sendo incrementado nas áreas de plantio de cana-de-açúcar.

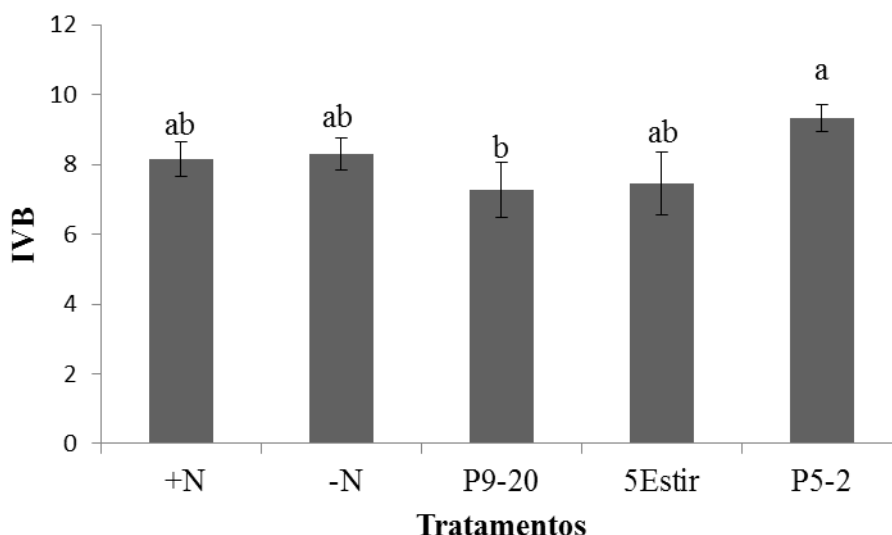


Figura 7. Índice de velocidade de brotamento (IVB) de minitoletes de cana-de-açúcar variedade RB867515. Médias seguidas de diferentes letras diferem entre si pelo teste t a 5%. CV: 16,24 %. +N: não inoculado com alta dose de N; -N: não inoculado com baixa dose de N; 5Estir: inoculante para cana-de-açúcar composto por cinco espécies de bactérias, *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe BR 11281^T (PAL -5^T), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335 = HRC54), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504 = HCC103), *Paraburkholderia tropica* (BR 11366^T = PPe 8^T) e *Nitrospirillum amazonense* (BR 11145 = CBAMc).

4.3.2 Efeito da inoculação sobre o sistema radicular

Na coleta realizada com 30 DAT o tratamento inoculado com o isolado P5-2 apresentou uma maior média na MSR em relação aos outros tratamentos, embora não tenha apresentado diferença estatística (Tabela 10). Esse efeito persistiu até a coleta aos 75 DAT (Tabela 11). Os tratamentos inoculados com 5Estir ou P9-20 apresentaram resultados de MSR equivalentes ao tratamento não inoculado com aplicação de baixa dose de N (-N) e maiores que do tratamento não inoculado com aplicação de alta dose de N (+N) na coleta aos 30 DAT

(Tabela 10), embora não tenham sido encontradas diferenças significativas. Esse valor obtido de MSR indica que a maior dose de N interferiu de forma negativa, em relação aos outros tratamentos, no desenvolvimento do sistema radicular até os 30 DAT. Entretanto, na coleta aos 75 DAT os tratamentos inoculados com 5Estir ou P9-20 e o tratamento +N apresentaram médias similares na MSR e maiores que a do tratamento controle -N, mas sem diferenças estatísticas (Tabela 11).

Tabela 10. Variáveis analisadas em coletas de cana-de-açúcar realizadas aos 30 DAT. (CTR) comprimento total de raiz. (MSR) massa seca de raiz. (MSPA) massa seca de parte aérea. (ATSR) área total da superfície da raiz. (CPA) comprimento parte área. (VL) volume de raiz. (EP) erro padrão.

Tratamento	CTR	EP	MSR	EP	MSPA	EP
(cm).....	(grama por planta).....			
N+	2474,77 a	± 167,22	0,49 b	± 0,030	1,22 a	± 0,072
N-	2689,06 a	± 162,13	0,56 ab	± 0,040	1,14 a	± 0,064
Est5	2905,72 a	± 184,46	0,57 ab	± 0,032	1,23 a	± 0,081
P5-2	2898,69 a	± 192,04	0,58 a	± 0,031	1,36 a	± 0,121
P9-20	2827,82 a	± 182,56	0,57 ab	± 0,036	1,33 a	± 0,083
CV(%)	19,44		16,92		22,29	
Tratamento	ATSR	EP	CPA	EP	VR	EP
(cm ²).....	(cm).....	(cm ³).....	
N+	333,49 b	± 16,95	59,40 a	± 2,46	7,95 a	± 0,51
N-	361,86 ab	± 18,03	55,60 a	± 2,20	8,27 a	± 0,46
Est5	378,65 ab	± 18,01	59,80 a	± 2,05	8,56 a	± 0,60
P5-2	386,66 a	± 22,29	62,55 a	± 3,75	8,85 a	± 0,45
P9-20	368,31 ab	± 21,58	59,55 a	± 2,63	9,05 a	± 0,47
CV(%)	14,96		14,91		15,47	

-Médias seguidas de letras distintas, para cada variável, diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação ao CTR aos 30 DAT. Entretanto, a média do CTR do tratamento +N foi bem menor em relação aos demais tratamentos (Tabela 10). Linkohr *et al.* (2002), em estudos com *Arabidopsis* avaliando o efeito no sistema radicular da distribuição e disponibilidade de nitrato e fosfato no meio, demonstraram que ao aumentar a disponibilidade de N, há diminuição do comprimento da raiz primária e supressão do alongamento das raízes laterais, quando em alta concentração de N. Esse efeito do N no sistema radicular, quando em maiores concentrações e disponibilidade, pode ser relacionado com o efeito negativo na MSR encontrado no tratamento +N até os 30 DAT em relação aos demais tratamentos.

Oliveira *et al.* (2002), em experimento em vasos com solo que durou 400 dias, utilizando cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas com sete combinações com as cinco estirpes do inoculante da cana-de-açúcar, observaram que há um maior acúmulo de MSR nessa cultura até os 45 dias após inoculação, quando utilizada apenas a estirpe *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Esses autores sugerem que a competição por nutrientes entre planta hospedeira e uma elevada população de bactérias endofíticas pode afetar o desenvolvimento da cultura nesse estágio inicial de desenvolvimento. Marques Junior *et al.* (2008), mostraram que tratamento térmico em minitoletes para redução da microbiota naturalmente associada a cana-de-açúcar antes da inoculação, melhorou o efeito promotor de

crescimento pelas bactérias. Portanto, o uso de uma única estirpe na inoculação no plantio pode ser mais eficiente no ganho de biomassa devido a uma menor população de bactérias endofíticas na fase inicial da cultura, que ainda se apresenta em fase de aclimatização.

Tabela 11. Variáveis analisadas em coleta de cana-de-açúcar realizada aos 75 DAT. (MSMT) massa seca do minitotele. (MSR) massa seca de raiz. (MSPA) massa seca de parte aérea. (MST) massa seca total. (TeorNMT) teor de N do minitotele. (TeorNR) teor de N da raiz. (TeorNPA) teor de N da parte aérea. (TeorNT) teor de N total. (NTMT) N total do minitotele. (NTR) N total da raiz. (NTPA) N total da parte aérea. (NTS) N total soma. (DC) diâmetro do colmo. (CPA) comprimento da parte aérea. (AF) área foliar. (VR) volume de raiz. (EP) erro padrão.

Tratamento	MSMT	EP	MSR	EP	MSPA	EP	MST	EP
(g por planta).....							
N+	3,26 a	± 0,253	4,49 ab	± 0,39	13,65 a	± 1,06	21,34 a	± 1,62
N-	3,20 a	± 0,218	3,84 b	± 0,31	11,53 a	± 1,15	18,42 a	± 1,61
5Estir	2,89 a	± 0,198	4,37 ab	± 0,31	12,56 a	± 0,79	20,09 a	± 1,06
P5-2	3,06 a	± 0,203	4,71 a	± 0,34	13,02 a	± 0,89	21,04 a	± 1,32
P9-20	3,31 a	± 0,191	4,07 ab	± 0,25	11,55 a	± 0,66	18,50 a	± 0,92
CV(%)	22,47		20,79		21,9		19,62	
Tratamento	TeorNMT	EP	TeorNR	EP	TeorNPA	EP	TeorNT	EP
(%).....							
N+	0,54 a	± 0,04	0,93 a	± 0,02	1,70 a	± 0,033	3,16 a	± 0,07
N-	0,41 b	± 0,02	0,67 b	± 0,03	1,30 bc	± 0,049	2,38 b	± 0,05
5Estir	0,35 bc	± 0,01	0,67 b	± 0,03	1,24 bc	± 0,046	2,26 bc	± 0,07
P5-2	0,31 c	± 0,01	0,62 b	± 0,02	1,19 c	± 0,039	2,12 c	± 0,05
P9-20	0,40 bc	± 0,04	0,68 b	± 0,02	1,33 b	± 0,041	2,40 b	± 0,10
CV(%)	24,87		10,19		9,96		9,98	
Tratamento	NTMT	EP	NTR	EP	NTPA	EP	NTS	EP
(mg).....							
N+	17,09 a	± 1,54	41,71 a	± 3,62	229,96 a	± 17,63	288,7 a	± 21,96
N-	12,33 b	± 0,88	25,42 b	± 1,63	144,82 b	± 9,01	182,5 b	± 10,94
5Estir	11,45 b	± 0,80	28,60 b	± 1,63	151,82 b	± 5,15	191,8 b	± 5,86
P5-2	10,49 b	± 1,06	28,87 b	± 1,78	152,36 b	± 8,13	191,7 b	± 10,33
P9-20	11,49 b	± 1,81	27,14 b	± 1,07	151,43 b	± 5,20	190,0 b	± 5,41
CV(%)	33,65		22,03		18,5		18,25	
Tratamento	DC	EP	CPA	EP	AF	EP	VR	EP
(mm por planta).....			(mm ²).....	(cm ³).....	
N+	8,23 ab	± 0,33	151,03 a	± 5,43	1837,78 a	± 114,13	53,80 a	± 4,41
N-	7,28 b	± 0,44	140,55 a	± 6,92	1276,30 b	± 71,59	43,00 b	± 3,21
5Estir	8,47 a	± 0,35	148,55 a	± 5,13	1393,91 b	± 97,42	50,60 ab	± 3,50
P5-2	8,23 ab	± 0,40	149,91 a	± 5,94	1364,68 b	± 70,05	54,00 a	± 3,92
P9-20	7,45 ab	± 0,31	141,18 a	± 4,66	1362,27 b	± 82,52	47,60 ab	± 2,39
CV(%)	14,85		11,32		18,83		20,1	

-Médias seguidas de letras distintas, para cada variável, diferem entre si pelo teste t a 5% de probabilidade.

Foi observada maior ATSR no tratamento inoculado com P5-2, mesmo não diferindo significativamente em relação aos outros tratamentos. Os tratamentos inoculados e tratamento controle -N apresentaram médias de ATSR equivalentes e todas maiores que a do tratamento +N (Tabela 10), embora não tenham sido estatisticamente diferentes. Gírio et al. (2015), observaram que a inoculação com bactérias promotoras de crescimento proporcionou um sistema radicular com raízes mais finas na cana-de-açúcar do que os tratamentos não inoculados, levando a uma maior superfície de contato com o solo, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo. Segundo Bhattacharjee et al. (2008), um sistema radicular composto por raízes mais finas, resulta em maior superfície de contato com o solo e permite captar mais água e nutrientes.

Aos 30 DAT os valores médios de VR se mostraram ligeiramente maiores para os tratamentos inoculados e o -N, embora essas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas (Tabela 10). Na coleta aos 75 DAT o tratamento inoculado com P5-2 e o tratamento +N apresentaram maiores médias no VR em relação aos demais tratamentos, ainda sem diferença estatística significativa (Tabela 11). Incrementos significativos em volume de raízes de milho inoculado com bactérias endofíticas, em relação ao controle não inoculado, foi encontrado por Araújo et al. (2016).

A exploração de um maior volume de solo pelo aumento no comprimento das raízes ou da superfície de contato no solo é uma das principais estratégias para melhorar a aquisição de nitrogênio e fósforo pelas plantas (RICHARDSON *et al.*, 2009). Esses dois nutrientes são essenciais e responsáveis pela limitação da produção sustentável de alimento em muitos países (TILMAN *et al.*, 2002). Ainda segundo Richardson et al. (2009), as plantas utilizam da associação com microrganismos promotores de crescimento para que estes estimulem o suprimento direto de nutrientes ou melhorem o seu acesso a estes com o aumento em seu volume da raiz, ou ainda, por influência direta nos níveis hormonais das plantas. Os modos de ação incluem a fixação biológica de nitrogênio, aumentando a disponibilidade de nutrientes na rizosfera, influenciando positivamente o crescimento e a morfologia radicular e promovendo outras simbioses benéficas entre plantas e microrganismos (VESSY, 2003).

Provavelmente a estirpe P5-2 tem um efeito de promoção de crescimento hormonal, possivelmente envolvendo a produção de ácido-indol-acético e/ou outras substâncias moduladoras do crescimento vegetal. Apoiando essa visão, estudos anteriores realizados na Embrapa Agrobiologia mostraram a produção *in vitro* por essa estirpe de substâncias indólicas (como ácido-indol-acético), além da capacidade de solubilizar fosfatos e de produzir sideróforos. Ao mesmo tempo os resultados não indicam um papel de FBN na promoção de crescimento observado.

4.3.3 Efeito da inoculação sobre a parte aérea

Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os tratamentos avaliados, em relação à MSPA, foi possível observar aos 30 DAT um incremento em torno de 10 ou 8% com a inoculação dos isolados P5-2 ou P9-20, respectivamente, em relação ao tratamento +N (Tabela 10). Porém, aos 75 DAT a MSPA do tratamento +N apresentou média superior aos demais tratamentos. Mesmo não sendo encontradas diferenças significativas na MSPA, pôde ser notado um incremento de 15,6%, 10,9% ou 7,5% nos tratamentos +N, P5-2 e 5Estir, respectivamente, em relação ao tratamento controle -N (Tabela 11).

No CPA não houve diferenças significativas, mas as médias dos tratamentos inoculados e o controle +N foram superiores ao do tratamento controle -N tanto na primeira quanto na segunda coleta (Tabela 10; Tabela 11).

Ao ser analisada a MST aos 75 DAT não foi verificada nenhuma diferença significativa entre os tratamentos, embora a MST média dos tratamentos inoculado com P5-2

e tratamento +N tenham sido equivalentes e superiores às dos demais tratamentos, representando um incremento de 12,3% ou 13,7%, respectivamente, em relação ao controle -N (Tabela 11). Oliveira et al. (2016), em experimento de campo, encontraram incrementos significativos na MSPA nos tratamentos inoculado e adubado com N e no apenas inoculado, em relação ao tratamento apenas com N. Esses autores sugerem que a inoculação com bactérias promotoras do crescimento tenha melhorado o vigor da cana, aumentando o seu acúmulo de matéria seca. É importante frisar que não houve diferença significativa entre a MSMT entre nenhum dos tratamentos nesse estudo (Tabela 11). Pois, segundo Gírio et al. (2015), além da inoculação, a quantidade de reserva nas gemas influencia na MSPA e MST, onde encontraram piores resultados para tratamentos cujos minitoletes apresentaram menor massa seca.

Em relação ao DC, não houve diferença significativa, embora a média do tratamento inoculado com 5Estir tenha sido maior que a dos demais tratamentos aos 75 DAT. Os tratamentos inoculados com P5-2 ou P9-20 foram equivalentes ao tratamento +N, e superiores ao tratamento -N (Tabela 11). Aos 75 DAT, foi verificada uma diferença significativa da área foliar no tratamento +N em relação aos demais (Tabela 11).

4.3.4 Efeito da inoculação sobre o teor de nitrogênio

O teor de N no minitolete (TeorNMT) aos 75 DAT foi determinado para ser utilizado na avaliação da remobilização de N desse tecido para a nova planta em desenvolvimento. O tratamento +N apresentou a maior média no TeorNMT, sendo o único tratamento que apresentou diferença significativa estatisticamente (Tabela 11). O segundo maior valor foi encontrado no tratamento -N (Tabela 11). Os tratamentos inoculados com 5Estir ou P9-20 apresentaram teores similares e maiores que o do tratamento inoculado com P5-2 (Tabela 11).

Em relação ao TeorNR apenas o tratamento +N apresentou diferença significativa, embora o tratamento inoculado com P5-2 apresentou teor de N 8% menor nas raízes em relação aos demais tratamentos inoculado (Tabela 11). As diferenças no teor de N na parte aérea (TeorNPA) foram similares as observadas no TeorNMT, com a diferença que a média do tratamento inoculado com 5Estir foi similar a do tratamento controle -N, e não à média do tratamento inoculado com P9-20 (Tabela 11). Como esperado, o TeorNT do tratamento +N apresentou diferença significativa em relação aos demais tratamentos (Tabela 11).

O menor teor de N obtido nos minitoletes do tratamento inoculado com o isolado P5-2 (Tabela 11), pode ter sido consequência do efeito que esse isolado promoveu no IVB, levando a um melhor aproveitamento dessa reserva do minitolete antes do transplantio para os vasos aos 24 DAP, onde ocorreu adubação nitrogenada.

O tratamento inoculado com o isolado P5-2 apresentou os menores teores de N em todas as partes da planta analisada, inclusive em comparação com o tratamento -N, embora tenha apresentado maiores médias na MSR e MSPA nas duas coletas, com exceção para a MSPA na segunda coleta do tratamento +N. Esses valores refletiram em maiores médias da quantidade de NTR e NTPA no tratamento inoculado com P5-2, em comparação com os demais tratamentos inoculados e -N, embora não tenha sido detectada diferença estatística (Tabela 11). Esses dados sugerem uma maior eficiência no uso do nitrogênio pelas plantas inoculadas com P5-2 até os 75 DAT.

Picos de acúmulo nos teores de N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas foram observados entre os 90 e 360 DAP (REIS JUNIOR *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2016), o que sugere uma maior incorporação deste nutriente pela planta antes desse período. Isso pode ser explicado pelo fato que a cana-de-açúcar produz sacarose e não acumula altos teores de nitrogênio em nenhum de seus órgãos (GOMES *et al.*, 2005).

Os efeitos das bactérias promotoras de crescimento nas plantas podem ser expressos de forma direta ou indireta (GLICK, 1995). A promoção direta envolve mecanismos nos quais as bactérias produzem compostos que facilitem a assimilação dos nutrientes do ambiente para as plantas. Tais mecanismos incluem a fixação biológica de nitrogênio (FBN), síntese de substâncias promotoras do crescimento, incluindo fitohormônios como auxinas e ácidos giberélicos, solubilização de minerais como fósforo e produção de sideróforos (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999; URQUIAGA *et al*, 1992; WANG *et al*, 1993; GUTIÉRREZ-MAÑERO *et al.*, 2001; FERRARA *et al.*, 2012). De outro modo, a promoção indireta ocorre quando as bactérias diminuem ou impedem os efeitos deletérios de microrganismos patogênicos, este processo é realizado pela liberação de substâncias antagonistas ou de revestimento, que atuam na proteção da planta e, por conseguinte no aumento de seu crescimento (QUECINE *et al.*, 2012). As bactérias podem promover o desenvolvimento da planta utilizando um ou mais desses mecanismos em diferentes momentos durante o ciclo vegetal.

5 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados indicam que os isolados BR 10280^T, BR 10266, BR 10555, BR 10556 do gênero *Bradyrhizobium* obtidos de cana-de-açúcar representam uma nova espécie desse gênero.

O isolado P5-2 é capaz de promover o crescimento na cultura de cana-de-açúcar nas condições avaliadas, afetando principalmente a velocidade de brotação dos minitoletes e variáveis relacionadas ao sistema radicular, embora não tenham sido detectadas diferenças estatisticamente significantes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições aplicadas nesse estudo, a estirpe BR 10280^T (P9-20) não teve efeito significativo nas variáveis analisadas, embora a inoculação com essa estirpe tenha aumentado valores médios de volume e massa seca do sistema radicular de cana-de-açúcar em experimentos anteriores.

Estudos mais avançados precisam ser realizados com o isolado P5-2 para determinar se esse efeito promotor de crescimento persiste ao ser utilizado substratos nutricionalmente mais ricos. Além de experimentos laboratoriais para identificar especificamente o mecanismo promotor de crescimento deste isolado que atua para o aumento na velocidade de brotamento. Serão necessários, também, estudos de microscopia que possam determinar a localização desses isolados nos tecidos vegetais da cana-de-açúcar.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, N. F.; YAN, S. C.; CAI, R. M.; CLARKE, C. R.; MORRIS, C. E.; SCHAAD, N. W.; SCHUENZEL, E. L.; LACY, G. H.; SUN, X. A.; JONES, J. B.; CASTILLO, J. A.; BULL, C. T.; LEMAN, S.; GUTTMAN, D. S.; SETUBAL, J. C.; VINATZER, B. A. A multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated Microbes. **Phytopathology**, v. 100, n. 3, p. 208-215, 2010.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; AND LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.

AMANN, R. AND W. LUDWIG. Ribossoma RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 5, p. 555-565, 2000.

ANDO, S.; GOTO, M.; MEUNCHANG S.; THONGRA-AR, P.; FUJIWARA, T.; HAYASHI, H.; YONEYAMA, T. Detection of *nifH* sequences in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). **Soil Science & Plant Nutrition**, v. 51, n. 2, p. 303-308, 2005.

ARAUJO, E.O.; ROCHA, J. R.; GEROLA, J. G.; MATTE, L. C. Diazotrophic bacteria inoculation associates with acids and nitrogen in corn. **African Journal of Plant Science**, v. 10, n. 8, p. 162-166, 2016.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen.nov., a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 911- 922, 1997.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSÉN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HASTE, B.; KERSTERS, K.; HORTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*, inclusion of (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.

BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; VIDEIRA, S.S.; BODDEY, L.H.; BALDANI, V.L.D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, p. 413-431, 2014.

BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp.. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5, p. 485-491, 2000.

BEIJERINCK, M.W. Cultur des *Bacillus radicola* aus den Kno llchen. **Bot. Ztg.**, v. 46, p. 740–750, 1888.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P.B.; VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; FAVRETO, R. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.63, p. 94–104, 2013.

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

BHATTACHARYYA, P.N.; JHA, D.K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327–1350, 2012.

BOMAR, L.; MALTZ, M.; COLSTON, S.; GRAF, J. Direct culturing of microorganisms using metatranscriptomics. **MBio**, v. 2, n. 2, p. e00012-11, 2011.

BROUGHTON, W.J.; HANIN, M.; RELIC, B.; KOPCINSKA, J.; GOLINOWSKI, W.; SIMSEK, S.; OJANEN-REUHS, T.; REUHS, B.; MARIE, C.; KOBAYASHI, H.; BORDOGNA, B.; LE QUERE, A.; JABBOURI, S.; FELLAY, R.; PERRET, X.; DEAKIN, W.J. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. Strain NGR234- Legume Symbioses. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 10, p. 3654-3663, 2006.

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

CARDINALE, M.; BRUSETTI, L.; QUATRINI, P. Comparison of different primer sets for use in automated ribosomal intergenic spacer analysis of complex bacterial communities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 6147–56, 2004.

CAVALCANTE, V.A.; DOBEREINER, J.A. New acid-tolerant nitrogenfixing bacterium associated with sugar-cane. **Plant and Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHAHBOUNE, R.; CARRO, L.; PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M.H.; BARRIJAL, S.; VELÁZQUEZ, E.; BEDMAR, E. J. *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. **Systematic and Applied Microbiology**, v.35, p.302-305, 2012.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.; BÂ, A.; GILLIS, M.; LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic *Bradyrhizobia* are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5437–5447, 2000.

CHAVES, V.; SANTOS, S.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J.; MONTEIRO, R.; REIS, V. Desenvolvimento Inicial de Duas Variedades de Cana-de-açúcar Inoculadas com Bactérias Diazotróficas. **Revista Brasileira Ciência do Solo, Viçosa-MG**, v. 39, n. 6, p. 1595-1602, 2015.

CHRISTENSEN, H.; KUHNERT, P.; BUSSE, H-J.; FREDERIKSEN, W.C.; BISGAARD, M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the *Pasteurellaceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 57, p. 166-178, 2007.

COUTINHO, H.L.C.; OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P.; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais da Academia de Ciência**, v.71, p.491-503, 1999.

DALL'AGNOL, R.F.; RIBEIRO, R.A.; DELAMUTA, J.R.M.; ORMENO-ORRILLO, E.; ROGEL, M.A.; ANDRADE, D.S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium paranaense* sp. nov., an effective N₂-fixing symbiont of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with broad geographical distribution in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 3222-3229, 2014.

DALL'AGNOL, R.F.; DELAMUTA, J.R.M.; RIBEIRO, A.R.; HUNGRIA, M. Diversidade e filogenia de estirpes de rizóbios pela metodologia de MLSA. Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso. **responsabilidade socioambiental da pesquisa agrícola: anais. Viçosa: SBCS**. 2014.4. Trab.1212, 2012.

DAVIS, K.E.R.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P.H. *Acidobacteria*, *Rubrobacteridae* and *Chloroflexi* are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 3, p. 798-805, 2011.

DELAMUTA, J.R.M.; RIBEIRO, R.A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MELO, I.S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3342–3351, 2013.

DÉNARIÉ, J.; DEBELLÉ, F.; PROMÉ, J.C. *Rhizobium* lipochitoooligosaccharide nodulation factors: signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 65, p. 503- 535, 1996.

DIXON, R. AND KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621-631, 2004.

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.

DOBEREINER J.; RUSCHEL A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, v. 1, p. 261-272, 1958.

DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, v. 15, p. 211, 1961.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 310-313, 1992.

DOBEREINER, J.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. **Embrapa SPI**, 1995.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, p. 783-791, 1985.

FERRARA, F.I.; OLIVEIRA, Z.M.; GONZALES, H.H.S.; FLOH, E.I.S.; BARBOSA, H.R. Endophytic and rhizospheric enterobacteria isolated from sugar cane have different potentials for producing plant growthpromoting substances. **Plant and Soil**, v. 353, p. 409–417, 2012.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M. et al. Molecular characterization of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 83-99, 2012.

FRANK, B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Bulletin der Akademie der Wissenschaft in Erakau**, 1889.

FURUSHITA, M.; SHIBA, T.; MAEDA, T.; YAHATA, M.; KANEOKA, A.; TAKAHASHI, Y.; TRII, K.; HASEGAWA, T.; OHTA, M. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5336–5342, 2003.

GALTIER, N.; GOUY, M.; GAUTIER, C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. **Computer applications in the biosciences: CABIOS**, v. 12, n. 6, p. 543-548, 1996.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J.; ACINAS, S.G.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Use of the 16S–23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 36, p. 55-64, 1999.

GEVERS, D.; COHAN, F.M.; LAWRENCE, J.G.; SPRATT, B.G.; COENYE, T.; FEIL, E.J.; STACKEBRANDT, E.; de PEER, Y.V.; VANDAMME, P.; THOMPSON, F.L.; SWINGS, J. Re-evaluating prokaryotic species. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.733-739, 2005.

GILLIS, M.; KERSTIRS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R.M.; STEPHOM, M.P.; TEXEIRA, K.R.S.; DOBEREINER, J.; LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp.nov., a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p.361-364, 1989.

GÍRIO, L.A.S.; DIAS, F.L.F.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M.A. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, p. 33-43, 2015.

GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 109–117, 1995.

GOMES, A.A.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R. Relação entre a distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana de açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 1105-1113, 2005.

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

GOVINDARAJAN, M.; KWON, S-W.; WEON, H-Y. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp.. **World Journal Microbiol**, v. 23, p. 997–1006, 2007.

GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.J.; RAMOS-SOLANO, B.; PROBANZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.; TALON, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v. 111, p. 206-211, 2001.

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

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DORING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, p. 293-320, 2015.

JORDAN, D.C. NOTES: transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 136-139, 1982.

KAMST, E.; ESPANHAK, H.P.; KAFETZOPOULOS, D. Biosynthesis and secretion of rhizobial lipochitin-oligosaccharide signal molecules. **Subcellular Biochemistry**, v. 29, p. 29-71, 1998.

KAMST, E.; PILLING, J.; RAAMSDONK, L.M.; LUGTENBERG, B.J.J.; ESPANHAK, H.P. Rhizobium nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis, v.179, p.2103-2108, 1997.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; MINAMISAWA, K.; UCHIUMI, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; IDESAWA, K.; IRIGUCHI, M.; KAWASHIMA, K.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; SHIMPO, S.; TSURUOKA, H.; WADA, T.; YAMADA, M.; TABATA, S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **DNA Research**, v. 9, p. 189-197, 2002.

KENNEDY, I.; CHOUDHURY, A.; KECSKÉS, M. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1229–1244, 2004.

KONSTANTINIDIS K.T.; TIEDJE J.M. Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. **Current opinion in microbiology**, v. 10, p. 504-509, 2007.

KONSTANTINIDIS, K.T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7286–7293, 2006.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan 1982) and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 501-505, 1992.

LAGUERRE, G.; NOUR, S.M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, v. 147, p. 981–993, 2001.

LANDELL, M.G.A.; CAMPANA, M.P., FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M.A.; ANJOS, I.A.; DINARDO-MIRANDA, L.L.; SCARPARI, M.S.; GARCIA, J.C.; BIDÓIA, M.A.P.; SILVA, D.N.; MENDONÇA, J.R.; KANTHACK, R.A.D.; CAMPOS, M.F.; BRANCALIÃO, S.R.; PETRI, R.H.; MIGUEL, P.E.M. Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. **Ribeirão Preto: Instituto Agrônômico de Campinas**, 2012.

LAWSON, D.M. & SMITH, B.E. Molybdenum Nitrogenases. In: **Metals Ions in Biological System: Volume 39: Molybdenum and Tungsten: Their Roles in Biological Processes**.: CRC Press, 2002.

LEDGARD, S.F. & STEELE, K.W. Biological nitrogen fixation in mixed legume/grass pastures. **Plant and Soil**, v. 141, p. 137, 1992.

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

LUDWIG, W.; STRUNK, O.; WESTRAM, R.; RICHTER, L.; MEIER, H.; YADHUKUMAR, A.; *et al.* ARB: a software environment for sequence data. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 4, p. 1363-1371, 2004.

MAGALHÃES, F.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais-Academia Brasileira de Ciências**, 1983.

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

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.*;2:176-7, 1962.

MARCELLETTI, S.; FERRANTE, P.; SCORTICHINI, M. Multilocus sequence typing reveals relevant genetic variation and different evolutionary dynamics among strains of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Diversity*, v. 2, n. 11, p. 1205-1222, 2010.

MARQUES JÚNIOR, R.B.; CANELLAS, L.P.; SILVA, L.G.; OLIVARES, F.P. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, p. 1121-1128, 2008.

MATOS, G. F.; COELHO, M.R.R., BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; ROUWS, L.F.M. Positive effects os endophytic (*Brady*)*rhizobium* isolates on sugarcane sett germination and root growth under glass house conditions. **In: 10th International PGPR Workshop, Liège**. From Omics to the Field, 2015.

MATOS, G.F. Isolamento, caracterização e aplicação de rizóbios naturalmente associadas à cana-de-açúcar, usando novas estratégias de cultivo. **Monografia do curso de graduação em Agronomia. Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica, RJ, 39 p. 2015.

MATTHEWS, S.S; SPARKES, D.L.; BULLARD, M.J. The response of wheat to inoculation with the diazotroph *Azorhizobium caulinodans*. *Aspects Appl Biol*, v. 63, p. 35–42, 2001.

MENNA, P.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of Bradyrhizobium strains based on Multilocus Sequence Analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and gln II, rec A, ATP D and dnaK genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, p. 2934-2950. 2009.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, v. 1, p. 74 – 99, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2. ed. **Lavras: UFLA**, p. 729, 2006.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, v. 51, p. 263-273, 1986.

NAGPAL, M.L.; FOX, K.F.; FOX A. Utility of 16S–23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms? *Journal of Microbiological Methods*, v. 33, 211–219, 1998.

NOGUEIRA, A.R.A.; SOUZA, G.B. Manual de laboratório: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. **Embrapa Pecuária Sudeste**, p. 313, 2005.

NORRIS, D.O.; DATE, R.A. Legume bacteriology. **Tropical Pastures Research; Principles and Methods**. p, p. 134-174, 1976.

OLDROYD G.; SPEAK, F.; ENTER. Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 252–263, 2013.

OLDROYD, G.E.; MURRAY, J.D.; POOLE P.S.; DOWNIE, J.A. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. **Annual Review of Genetics**, v. 45, p. 119-44, 2011.

OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Infection of mottle strip disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New phytologist, Cambridge, Grã-Bretanha**, v.135, p.575-597, 1997.

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

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

OLIVEIRA, R.P.; SCHULTZ, N.; MONTEIRO, R.C.; PEREIRA, W.; DE ARAÚJO, A.P.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Growth analysis of sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, p. 2786-2795, 2016.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; RIBEIRO, R.A.; HELENE, L.C.F.; HUNGRIA, M.; DELAMUTA, J.R.M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; ROGEL, M.A. *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for greenmanure and environmental services. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 65, p. 4441-4448, 2015.

PAUNGFUO-LONHIENNE, C.; LONHIENNE, T.G.A.; YEOH, Y.K.; WEBB, R.I.; LAKSHMANAN, P.; CHAN, C.X.; LIM, P.E.; RAGAN, M.A.; SCHMIDT, S.; HUGENHOLTZ, P. A new species of *Burkholderia* isolated from sugarcane roots promotes plant growth. **Microbial Biotechnology**, v. 7, p. 142–154, 2014.

PIROMYOU, P.T.; GREETATORN, K.; TEAMTISONG, T.; OKUBO, R.; SHINODA, A.; NUNTAKIJ, P.; TITTABUTR, N.; BOONKERD, K.; MINAMISAWA, AND N. TEAUMROONG. Preferential Association of Endophytic Bradyrhizobia with Different Rice Cultivars and Its Implications for Rice Endophyte Evolution. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 9, p. 3049-3061, 2015.

QUECINE, M.C.; ARAÚJO, W.L.; ROSSETTO, P.B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LACAVA, P.T.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Sugarcane Growth Promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 7511–7518, 2012.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria**. URL <https://www.R-project.org/>, 2016.

REES, D.C. & HOWARD, J.B. Nitrogenase: standing at the crossroads. **Current opinion in chemical biology**, v. 4, n. 5, p. 559-566, 2000.

REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current opinion in plant biology**, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology** v. 6, p. 139–144, 1998.

REIS JUNIOR, F.B.; MENDES, I.E.; TEIXEIRA, K.R.S.; REIS, V.M. Uso de Ferramentas Moleculares em Estudos da Diversidade de Microrganismos do Solo. **Planaltina, DF: Embrapa Cerrados**, 2002.

REIS JUNIOR, F.B.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v.219, p.153-159, 2000.

REIS, F.B., SILVA, L.G.; REIS, V.M.; DOBEREINER, J. Occurrence of diazotrophic bacteria in different sugar cane genotypes. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** v. 35, p. 985–994, 2000.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; URQUIAGA, S. Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadores de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR11366). **Embrapa Agrobiologia. Circular Técnica**, 2009.

RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.M.; MCNEILL, A.M. *et al.* Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, p. 305, 2009.

RICHTER, M.; ROSSELLÓ-MÓRA, R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 19126-19131, 2009.

RIVAS, R.; MARTENS, M.; LAJUDIE, P.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic and applied microbiology**, v. 32, p. 101-110, 2009.

RIVAS, R.; MARTENS, M.; LAJUDIE, P.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of the genus *Bradyrhizobium*. **Systematic and applied microbiology**, v. 32, p. 101-110, 2009.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PALOMO, J.L.; GARCÍA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P.F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELÁZQUEZ, E. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 54, p. 1271–1275, 2004.

ROBERTSON, G.P.; VITOUSEK, P.M. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 34, p. 97–125, 2009.

RODRIGUEZ NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; VICTOR, O. Meio Simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. Citri tipo B. **Summa Phytopathol**, v. 12, n. 1-2, p. 32, 1986.

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

ROESCH, L.F.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.S. Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 35, n.5, p. 1201-1204, 2005.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. A moderna microbiologia do solo: Aplicação de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J.D.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIM, V.; FRUTINI-NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (Ed.). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. **Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DSC**. p. 429-448, 1999.

ROSENBLUETH, M. and MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

ROUWS, L.F.M.; LEITE, J.; MATOS, G.F.; ZILLI, J.E.; COELHO, M. R.R.; XAVIER, G. R.; FISCHER, D.; HARTMANN, A.; REIS, V.M., BALDANI, J.I. Endophytic *Bradyrhizobium* spp. isolates from sugarcane obtained through different culture strategies. **Environmental microbiology reports**, v. 6, n. 4, p. 354-363, 2013.

RUSCHEL, A.P.; HENIS, Y.; SALATI E. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugarcane seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 181-182, 1975.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALEH, S.A.; MEKHEMAR G.A.A.; EL-SOUD, A.A.A.; RAGAB, A.A.; MIKHAEEL, F.T. Survival of Azorhizobium and Azospirillum in different carrier materials: inoculation of wheat and Sesbania rostrata. **Bulletin of Faculty of Agriculture**, v. 52, p. 319–338, 2001.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in nonlegume plants. **Annals of Botany**, v. 111, p. 743–767, 2013.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M.C.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016.

SARITA, S.; SHARMA, P.K.; PRIEFER, U.B.; PRELL, J. Direct amplification of rhizobial *nodC* sequences from soil total DNA and comparison to *nodC* diversity of root nodule isolates. **FEMS microbiology ecology**, v. 54, n. 1, p. 1-11, 2005.

SCHULTZ, N.; SILVA, J.A.; SOUSA, J.S.; MONTEIRO, R.C.; OLIVEIRA, R.P.; CHAVES, V.A.; PEREIRA, W.; SILVA, M.; BALDANI, J.I.; BODDEY, R.M.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 407-414, 2014.

SILVA, C., VINUESA, P., EGUIARTE, L.E., SOUZA, V., MARTÍNEZ-ROMERO, E. Evolutionary genetics and biogeographic structure of *Rhizobium gallicum* sensu lato, a widely

distributed bacterial symbiont of diverse legumes. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 4033-4050, 2005.

SOUZA, R.S.C.; OKURA, V.K.; ARMANHI, J.S.L.; JORR, I.N.B.; LOZANO, N.; SILVA, M.J.; GONZ ALEZ-GUERRERO, M.; ARAUJO, L.M.; FERREIRA, N.V.; BAGHERI, H.C.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports** v. 6, p. 28774, 2016.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. Taxonomic note. A place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

STEPKOWSKI, T.; CZAPLINSKA, M., MIEDZINSKA, K.; MOULIN, L. The variable part of the *dnaK* gene as an alternative marker for phylogenetic studies of rhizobia and related alpha *Proteobacteria*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26, p.483-494, 2003.

STEPKOWSKI, T.; MOULIN, L.; KRZYZANSKA, A.; MCINNES, A.; LAW, I.J.; HOWIESON, J. European origin of *Bradyrhizobium* populations infecting lupins and serradella in soils of western Australia and South Africa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7041-7052, 2005.

STEVENSON, B.S.; EICHORST, S.A.; WERTZ, J.T.; SCHMIDT, T.M.; BREZNAK, J.A. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, p. 4748-4755, 2004.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TEALE, W.; PAPONOV, I.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 847-859, 2006.

THAWEENUT, N.; HACHISUKA, Y.; ANDO, S.; YANAGISAWA, S.; YONEYAMA, T. Two seasons study of *nifH* gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): expression of *nifH* genes similar to those of rhizobia. **Plant and Soil**, v. 338, p. 435-449, 2011.

TIGHE, S.W.; DE LAJUDIE, P.; DIPIETRO, K.; LINDSTRÖM, K.; NICK, G.; JARVIS, B. D. Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 50, p. 787-801, 2000.

TILMAN, D.; CASSMAN, K.G.; MATSON, P.A.; NAYLOR, R.; POLASKY, S. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671-677, 2002.

TOLEDO, B.F.B. Identificação de estirpes de rizóbios por sequenciamento parcial dos genes 16S rDNA e *nifH*. Graduate Program in Agronomy – Plant Breeding and Genetics, **UNESP, Jaboticabal**, Brazil, 2008.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Phylogeny of Sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a nodC segment. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 2, p. 468-472, 1995.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 1, p. 105-114, 1992.

VAN BELKUM, A.; STRUELENS, M.; DE VISSER, A.; VERBRUGH, H.; TIBAYRENC, M. Role of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics, and Microbial Epidemiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 547–560, 2001.

VAN BERKUM, P.; TEREFEWORK, Z.; PAULIN, L.; SUOMALAINEN, S.; LINDSTROM, K.; EARDLY, B.D. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of rhizobia. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 2988-2998, 2003.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DEVOS, P.; KERSTERS, K.; SWING, S.J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbial Reviews**, v. 60, p. 407–438, 1996.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, p. 571–586, 2003.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria.**, 1970.

VINUESA, P.; LEÓN-BARRIOS, M.; SILVA, C.; WILLEMS, A.; JARABO-LORENZO, A.; PÉREZ-GALDONA, R.; WERNER, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 55, p. 569–575, 2005.

WANG, J.Y.; WANG, R.; ZHANG, Y.M.; LIU, H.C.; CHEN, W.F.; WANG, E.T., SUI, X. H.; CHEN, W.X. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 63, p. 616-624, 2013.

WANG, K.; YAN, P.S.; DING, Q.L.; WU, Q.X.; WANG, Z.B.; PENG, J. Diversity of culturable root-associated/endophytic bacteria and their chitinolytic and aflatoxin inhibition activity of peanut plant in China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.1-10, 2013.

WANG, Y.; BROWN, H.N.; CROWLEY, D.E.; SZANISZLO, P.J. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. **Plant, Cell & Environment**, v. 16, n. 5, p. 579-585, 1993.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, p. 3-14, 2006.

WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; GILLIS, M. Phylogenetic and DNA-DNA hybridization analyses of *Bradyrhizobium* species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology** v. 51, p. 111-117, 2001.

WILLEMS, A.; DOIGNON-BOURCIER, F.; GORIS, J.; COOPMAN, R.; LAJUDIE, P.; DE VOS, P.; GILLIS, M. DNA-DNA hybridization study of *Bradyrhizobium* strains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 51, p. 1315-1322, 2001.

WILLEMS, A.; MUNIVE, A.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M. In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 203-210, 2003.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 2, p. 221, 1987.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIPHOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; BRUINJ, F.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.M.; MATEOS, P.F.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil** v. 194, p. 99-114, 1997.

YAO, Z.Y.; KAN, F.L.; WANG, E.T.; WEI, G.H.; CHEN, W.X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 2219-2230, 2002.

YAO, Z.Y.; KAN, F.L.; WANG, E.T.; WEI, G.H.; CHEN, W.X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species within the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 52, p. 2219-2230, 2002.

YU, X.; CLOUTIER, S.; TAMBONG, J.T.; BROMFIELD, E.S. *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., a symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 64, p. 3202-3207, 2014.

ZAKHIA, F.; LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, v. 21, n. 6-7, p. 569-576, 2001.

ZHANG, Y.M.; LI JR, Y.; CHEN, W.F.; WANG, E.T.; SUI, X.H.; LI, Q.Q.; ZHANG, Y.Z.; ZHOU, Y.G.; CHEN, W.X. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov. an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 62, p. 1951-1957, 2012.

8 ANEXOS

Anexo A. Número de acesso no Genbank de sequências de genes utilizadas neste estudo ‘continua’.

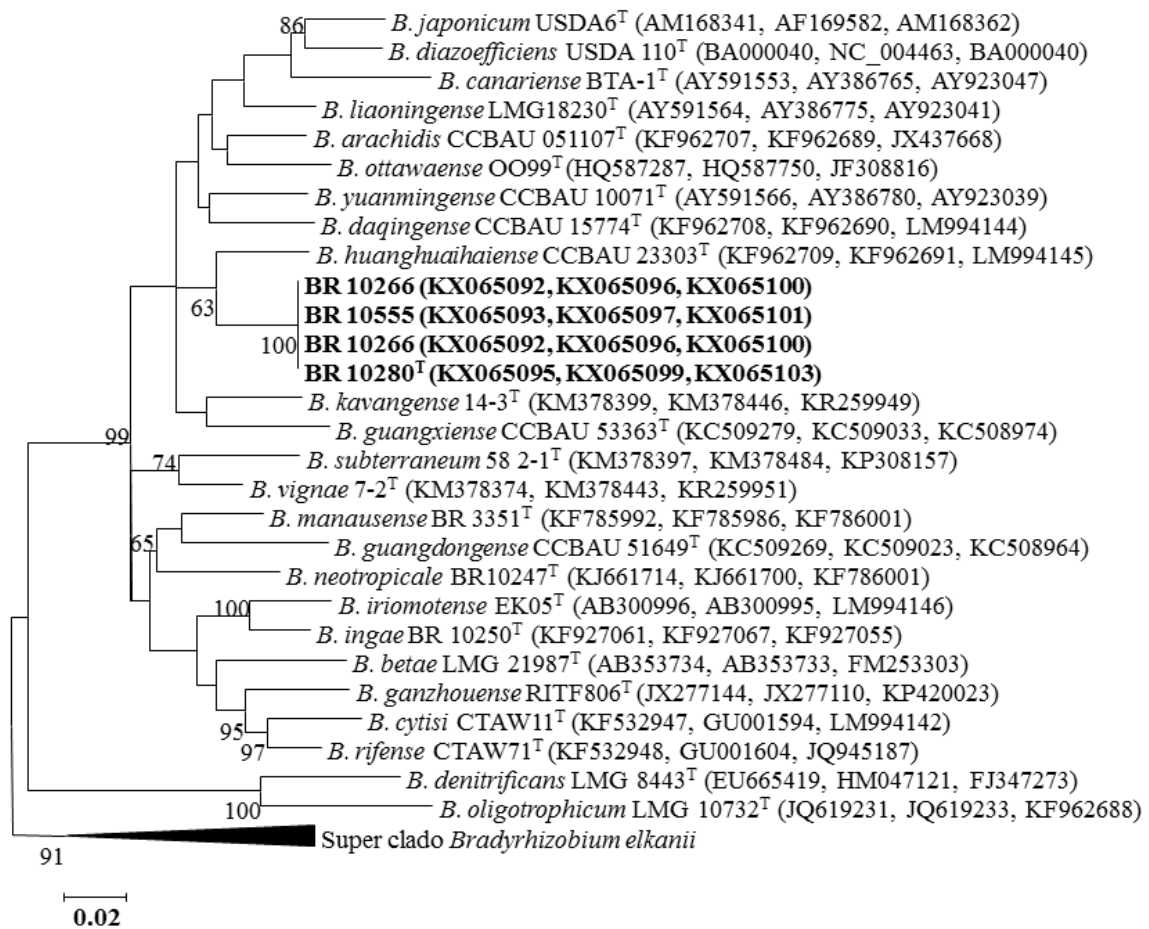
Estirpes	16S	ITS	dnaK	recA	atpD	glnII	nodC
BR 10266 (P4-7)	KF113078	KX857498	KX065100	KX065092	KX065104	KX065096	KF196783
BR 10555 (P5-24)	KX061790	KX857500	KX065101	KX065093	KX065105	KX065097	KX065108
BR 10556 (P7-18)	KX061791	KX857499	KX065102	KX065094	KX065106	KX065098	KX065109
BR 10280 ^T (P9-20)	KF113091	SAMN04849207	KX065103	KX065095	KX065107	KX065099	KF196792
<i>B. arachidis</i> CCBAU 051107 ^T	NR_117791	HM107198	JX437668	KF962707	KF962683	KF962689	KF962705
<i>B. betae</i> LMG 21987 ^T	AY372184	AJ631967	FM253303	AB353734	FM253129	AB353733	-
<i>B. canariense</i> BTA-1 ^T	AJ558025	AY386708	AY923047	AY591553	AY386739	AY386765	AJ560653
<i>B. cytisi</i> CTAW11 ^T	NR_116360	KC247124	LM994142	KF532947	GU001613	GU001594	EU597844
<i>B. daqingense</i> CCBAU 15774 ^T	NR_118648	HQ231312	LM994144	KF962708	HQ231289	KF962690	HQ231326
<i>B. diazoefficiens</i> USDA110 ^T	NR_074322	BA000040	BA000040	BA000040	NC_004463	NC_004463	NC_004463
<i>B. denitrificans</i> LMG 8443 ^T	NR_118982	AF338176	FJ347273	EU665419	FM253153	HM047121	-
<i>B. elkanii</i> USDA 76 ^T	NR_036953	AB100747	AY328392	AY591568	AY386758	AY599117	HQ233221
<i>B. embrapense</i> SEMIA 6208 ^T	AY904773	FJ391129	KP234519	HQ634899	HQ634875	GQ160500	KP234521
<i>B. erythrophlei</i> CCBAU 53325 ^T	KF114645	KF114622	-	KF114669	-	KF114693	KF114576
<i>B. ferriligni</i> CCBAU 51502 ^T	KJ818096	KJ818105	-	KJ818112	-	KJ818099	KJ818109
<i>B. ganzhouense</i> RITF806 ^T	NR_133706	-	KP420023	JX277144	JX277182	JX277110	JX292035
<i>B. guangdongense</i> CCBAU 51649 ^T	KC508867	-	KC508964	KC509269	KC508916	KC509023	-
<i>B. guangxiense</i> CCBAU 53363 ^T	KC508877	-	KC508974	KC509279	KC508926	KC509033	-
<i>B. huanghuaihaiense</i> CCBAU 23303 ^T	NR_117945	HQ428043	LM994145	KF962709	HQ231682	KF962691	KF472814
<i>B. icense</i> LMTR 13 ^T	NR_133707	-	KF896182	JX943615	KF896192	KF896175	KF896159
<i>B. ingae</i> BR 10280 ^T	NR_133985	-	KF927055	KF927061	-	KF927067	KF927054

-, sequências indisponíveis; novas sequências determinadas neste estudo estão em negrito; no caso em que sequências de genes foram obtidos a partir de genomas inteiros, os números de acesso dos genomas são indicados.

Continuação anexo A...

Estirpes	16S	ITS	dnaK	recA	atpD	glnII	nodC
<i>B. iriomotense</i> EK05 ^T	NR_112671	AB300993	LM994146	AB300996	LM994395	AB300995	AB301000
<i>B. japonicum</i> USDA 6 ^T	NR_112552	HQ143390	AM168362	AM168341	AM168320	AF169582	AP012206
<i>B. jicamae</i> PAC68 ^T	NR_043036	AY628094	LM994149	HM590776	FJ428211	FJ428204	AB573869
<i>B. kavangense</i> 14-3 ^T	KP899562	KM378507	KR259949	KM378399	-	KM378446	KT033402
<i>B. lablabi</i> CCBau 23086 ^T	NR_117513	GU433583	LM994147	GU433522	GU433473	GU433498	GU433565
<i>B. liaoningense</i> LMG 18230 ^T	NR_114733	AB510001	AY923041	AY591564	FM253138	AY386775	GU263466
<i>B. manausense</i> BR 3351 ^T	NR_133986	NZ_LJYG01000047	KF786001	KF785992	NZ_LJYG01000004	KF785986	KF786002
<i>B. neotropiale</i> BR 10247 ^T	NR_133987	KJ661686	KF786001	KJ661714	-	KJ661700	KJ661727
<i>B. oligotrophicus</i> LMG 10732 ^T	JQ619230	KF962688	KF962688	JQ619231	JQ619232	JQ619233	-
<i>B. ottawaense</i> OO99 ^T	NR_133988	KP308156	JF308816	HQ587287	HQ455212	HQ587750	HQ587980
<i>B. pachyrhizi</i> PAC48 ^T	NR_043037	AY628092	LM994148	LM994323	FJ428208	FJ428201	AB573868
<i>B. paxllaeri</i> LMTR 21 ^T	NR_133708	KP308155	AY923038	JX943617	KF896186	KF896169	KF896160
<i>B. retamae</i> Ro19 ^T	NR_118548	KF638356	LM994150	KC247094	KC247101	KC247108	KC247112
<i>B. rifense</i> CTAW71 ^T	NR_116361	KC247123	JQ945187	KF532948	GU001617	GU001604	EU597853
<i>B. subterraneum</i> 58 2-1 ^T	KP308152	KM378539	KP308157	KM378397	-	KM378484	-
<i>B. tropiciagri</i> SEMIA 6148 ^T	AY904753	FJ391100	FJ391008	FJ391168	FJ390968	FJ391048	KP234520
<i>B. valentinum</i> LmjM3 ^T	NR_125638	NZ_LLXX01000218	NZ_LLXX01000028	JX518589	JX518561	JX518575	JX514897
<i>B. vignae</i> 7-2 ^T	KP899563	KM378504	KR259951	KM378374	-	KM378443	KT362339
<i>B. viridifuturi</i> SEMIA 690 ^T	FJ025107	NZ_LGTB01000028	KR149128	KR149140	NZ_LGTB01000039	KR149131	-
<i>B. yuanmingense</i> CCBau 10071 ^T	NR_028768	AY386734	AY923039	AY591566	AY386760	AY386780	AB354633
<i>Microvirga vignae</i> BR3299 ^T	NR_133786	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodopse. palustris</i> NTUIOB YSC4	-	AB823647	-	-	-	-	-

-, sequências indisponíveis; novas sequências determinadas neste estudo estão em negrito; no caso em que sequências de genes foram obtidos a partir de genomas inteiros, os números de acesso dos genomas são indicados.



Anexo B. Filograma Maximum likelihood (ML) estimado a partir das sequências concatenadas dos genes *recA* (375 nt), *glnII* (479 nt) e *dnaK* (207 nt). Valores de bootstrap são mostrados quando as relações representadas foram observadas em pelo menos 50% de 500 pseudo-réplicas. A árvore ML foi obtida através do modelo GTR + G + I. A barra de escala representa o número de substituições de pares de base por site.

Anexo C. Uso de fontes de carbono pelas novas estirpes representantes do grupo em estudo e estirpe tipo da espécie mais próxima *B. huanghuaihaiensis*.

Estirpes: 1, BR 10266; 2, BR 10555; 3 BR 10556; 4, BR 10280^T; 5, *B. huanghuaihaiense* CCBAU 23303^T.

Fontes de carbono	1	2	3	4	5
Carboidratos					
N-Acetil-D-galactosamina	-	-	-	-	-
N-Acetil-D-glucosamina	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-
L- Arabinose	+	+	+	+	+
D-Arabitól	+	-	+	w	+
D-Cellobiose	-	w	-	w	-
I-Eritritol	-	-	-	-	-
D-Frutose	w	+	w	w	+
L-Fucose	-	+	w	w	+
D-Galactose	w	+	w	w	+
Gentiobiose	-	-	-	-	-
α -D-Glicose	w	+	w	w	w
m-Inositol	-	-	-	-	-
α -D-Lactose	-	-	-	-	-
Lactulose	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-
D-Manitol	+	w	+	w	w
D-Manose	+	+	+	+	+
D-Melibiose	-	-	-	-	-
β -Methyl-D-Glucoside	-	-	-	-	-
D-Psicose	-	-	-	-	w
D-Rafinose	-	-	-	-	-
L-Ramnose	-	w	-	w	w
D-Sorbitol	-	-	-	-	-
Sucarose	-	-	-	-	-
D-Trealose	-	-	-	-	-
Turanose	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-
Polímeros					
α -Ciclodextrina	-	-	-	-	-
Dextrina	w	w	w	w	w
Glicogênio	-	-	-	-	-
Tween 40	w	+	w	w	+
Tween 80	w	+	w	+	+
Aminoácidos					
D-Alanina	-	-	-	-	w
L-Alanina	-	-	-	-	-
L-Alanil-glicina	-	-	-	-	-

-, reação negativa; +, reação positiva; w, reação fraca.

Continuação anexo C...

Fontes de carbono	1	2	3	4	5
Aminoácidos					
L-Asparagina	w	w	w	w	+
Ácido L-Aspartico	w	+	w	w	+
Ácido L-Glutamico	w	w	w	w	+
Ácido Glicil-L-Aspartico	-	-	-	-	w
Ácido Glicil-L-Glutâmico	-	-	-	w	w
L-Histidina	-	-	-	-	w
Hidroxi-L-Prolina	-	-	-	-	-
L-Leucina	w	+	w	w	+
L-Ornitina	-	-	-	-	-
L- Fenilalanina	w	+	w	w	+
L-Prolina	w	w	w	-	w
Ácido L-Piroglutamico	-	+	w	+	w
D-Serina	-	w	-	w	w
L-Serina	-	-	-	w	-
L-Treonina	-	-	-	-	w
D,L-Carnitina	-	-	-	-	-
Ácido λ -Amino Butirico	-	w	-	w	w
Ácido Urocanico	+	+	+	+	+
Inosina	-	-	-	-	-
Uridina	-	-	-	-	-
Thimidina	-	-	-	-	+
Amidas					
Ácido Succinamico	w	+	w	w	+
Glucuronamida	w	+	w	w	+
L- Alaninamida	-	w	-	w	w
Aminas					
Feniletilamina	-	-	-	-	w
Putrescina	-	-	-	-	-
2-Aminoetanol	-	-	-	-	-
Produtos químicos bromados					
Acido Bromo Succinico	+	+	w	+	+
Álcoois					
2,3-Butanediol	-	-	-	-	-
Glicerol	-	w	-	w	+
Esteres					
Metil Piruvato	+	+	+	+	+
Mono-Methyl-Succinato	+	+	+	+	+
Produtos químicos fosforilados					
D-L- α -Glicerol Fosfato	-	-	-	w	+
Glicose-1- Fosfato	-	-	-	w	-

-, reação negativa; +, reação positiva; w, reação fraca.

Continuação anexo C...

Fontes de carbono	1	2	3	4	5
Glicose-6- Fosfato	-	w	-	w	-
Ácidos carboxílicos					
Ácido Acetico	+	+	+	+	-
Ácido Cis-Aconítico	+	+	-	+	-
Ácido Citrico	w	+	w	+	+
Ácido Formico	+	+	+	+	+
Ácid D-Galactonic lactone	w	w	w	w	+
Ácido D-Galacturonico	-	w	w	w	+
Ácido D-Gliconico	+	+	+	+	+
Ácido D-Glicosamínico	w	w	w	w	w
Ácido D-Glicuronico	w	w	+	+	w
Ácido α -Hidroxi Butirico	-	-	-	-	w
Ácido β -Hydroxy Butirico	+	+	+	+	+
Ácido γ - Hydroxy Butirico	w	+	w	+	+
Ácido p-Hidroxi Fenilacetico	+	+	+	+	w
Ácido Itaconico	w	+	-	+	w
Ácido α -Keto Butirico	-	-	-	-	w
Ácido α -Keto Glutarico	w	+	w	w	+
Ácido α -Keto Valerico	-	-	-	-	w
Ácido D,L-Lactico	+	+	+	+	+
Ácido Malonico	+	+	+	+	+
Ácido Propionico	w	+	-	+	w
Ácido Quínico	+	+	+	+	+
Ácido D-Sacaarico	+	+	w	+	+
Ácido Sebacico	+	+	+	+	+
Ácido Succinico	+	+	w	+	+

-, reação negativa; +, reação positiva; w, reação fraca.