

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

TESE

Utilização de Diferentes Técnicas para Monitorar a
Colonização e Estabelecimento de Bactérias
Diazotróficas Endofíticas em Plantas de Cana-de-
Açúcar

Paulo Marcos Fernandes Boa Sorte

2013



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

**UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS PARA
MONITORAR A COLONIZAÇÃO E ESTABELECIMENTO DE
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS EM PLANTAS
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Paulo Marcos Fernandes Boa Sorte

Sob a Orientação da Professora

Vera Lúcia Divan Baldani

e

Co-orientação do Pesquisador

José Ivo Baldani

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2013

633.61
B662u
T

Boa Sorte, Paulo Marcos Fernandes, 1983-

Utilização de diferentes técnicas para monitorar a colonização e estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar / Paulo Marcos Fernandes Boa Sorte. – 2013. 86 f.: il.

Orientador: Vera Lucia Divan Baldani.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo.

Bibliografia: f.58-70.

1. Cana-de-açúcar – Doenças e pragas – Teses. 2. Bactérias diazotróficas – Teses. 3. Bactérias fitopatogênicas – Teses. I. Baldani, Vera Lucia Divan, 1954- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – CIÊNCIA DO SOLO

PAULO MARCOS FERNANDES BOA SORTE

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do solo.

TESE APROVADA EM 27/02/2013.

Vera Lúcia Divan Baldani. Dra. Embrapa Agrobiologia
(Orientadora)

Segundo Sacramento Urquiaga. Dr. Embrapa Agrobiologia

Marcos Gervásio Pereira. Dr. UFRRJ

Kátia Regina dos Santos Teixeira. Dra. Embrapa Agrobiologia

Marcia Reed Rodrigues Coelho. Dra. Embrapa Agrobiologia

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus Pais dona Marilena e Seu Geraldo pelo esforço em me dar uma educação que vai além dos livros e a minha Esposa Leona, que é muito mais do que amiga e companheira, ela é a base que me sustenta nos momentos difíceis. Dedico também aos meus filhos que ainda estão por vir.

A vocês dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as conquistas realizadas durante a realização deste trabalho, e pelos troços também, pois geraram conhecimentos valiosos.

A minha Mãe (Marilena), por tudo que ela fez para que eu chegasse até aqui. Mainha obrigado pelas orações que me deram força para vencer os obstáculos.

A Filhota, que me ensinou a valorizar a vida e conhecer o amor. Meu amor por ti aumenta de forma exponencial.

A minha irmã Adriana, que mesmo distante torceu e orou para que eu conseguisse vencer esta etapa.

Ao meu Pai (Geraldo Boa Sorte), pelos ensinamentos.

Ao meu Tio João, que mesmo distante tem me ajudado e torcido para o meu sucesso.

Agradeço a família Varial de Melo por ter me acolhido, não como genro, mas como filho.

A amiga e Orientadora Vera Baldani, pelos grandes momentos vividos juntos neste nosso casamento de 4 anos. Obrigado pelo apoio, pelos ensinamentos, pela ajuda, pela confiança e pela grande colaboração na finalização deste trabalho. Agradeço ainda a grande força quando fui fazer o concurso do IFAL, desde o empréstimo do “data show” aos ensinamentos de como dar uma boa aula.

Ao Dr. José Ivo Baldani pela orientação durante estes quase 10 anos, pela confiança e compreensão.

Ao Dr. Jean pelo papel informal de co-orientador e pela amizade.

Aos amigos de sempre: Cândido, Wardsson, Khalil, Carlos Bahiano, Neguim, Nivaldo e Samuel Ribeiro. Em especial ao Samuel Ribeiro, pela grande contribuição que sempre somou e nunca negou ajuda por mais ocupado que estivesse.

Aos amigos Jackson Leite e João Luiz pela amizade, pelos momentos de alegria e ajuda.

Aos meus amigos e colegas formadores da família Bioquímica / Gramíneas: Anita, Helma, Carlos, Vivi, José Rodrigo, Mauro, Fernando, Helder, Marcela, Patty Galvão, Pat Gitahy, Aline, Tatiana, Cleiton, Sandy, Joilson, Dani, Gabí, William, Lambari, Cecília, Laís, Camila e aos técnicos Lúcio e Wilson, pela ajuda e pelos momentos alegres do dia a dia. Em especial a Gabí, pela imensa contribuição nas análises estatísticas.

A Anita e ao Esdras, pela ajuda nas análises de NMP.

Ao grande amigo Geraldo Baêta que sempre ajudou independente da hora ou do dia.

Ao amigo Péricles, onde você estiver quero que saiba que eu não tenho dúvidas que sem a sua ajuda eu não teria conseguido a tempo. Infelizmente você não está mais entre nós, mas tenho certeza que está torcendo por nós. Saudades eternas.....

Aos amigos da sala de autoclaves Claudinho e Marildo. Claudinho, grande amigo sempre pronto a ajudar.

Aos amigos da manutenção Mazinho e Carlinhos (Perigoso) e aos amigos da casa de vegetação, Roberto e Aurélio pela ajuda nos experimentos de casa-de-vegetação, assim como toda galera do campo experimental da Embrapa Agrobiologia.

Aos pesquisadores: Stefan, Marcinha, Verônica Massena Reis, Luc, pelos ensinamentos passados. A pesquisadora Kátia pelos ensinamentos e amizade.

Ao pesquisador Dr. Segundo Urquiaga pela ajuda na interpretação dos dados durante o exame de qualificação e por enxergar à frente.

Aos amigos de coleta Lineu, Andriely, Zaqueu e Zé. Bons momentos, sob chuva ou sob sol a alegria reinava. Ao seu Tales e dona Gladis pela amizade e companhia nos momentos frios de Santa Maria-RS.

Ao Instituto Federal de Alagoas - IFAL, principalmente aos Campi Piranhas e Muricí, pela liberação de um dia na semana para dedicar a este trabalho durante o final do terceiro e o quarto ano, apesar de ainda estar no estágio probatório. A todos os colegas professores do campus Murici que ficaram na torcida e/ou tentaram ajudar aplicando minhas avaliações na semana da defesa. Muito obrigado.

Aos amigos Vinicius Dantas, Tharcila Leão, Emanuel (Bob Marley), Paulo Aparecido, David Gomes, Morgana e Rodrigo pela amizade e torcida.

Ao Dr. Paulo Albuquerque que abriu as portas da Embrapa Tabuleiros Costeiros e do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas – CECA, para que eu pudesse continuar este trabalho enquanto atuava como professor do IFAL.

Ao amigo professor Gildemberg (Jupará) pela estrutura disponibilizada na Clínica fitopatológica do CECA e pela confiança depositada mesmo sem me conhecer, e ao amigo Siumar Tironi pelos debates e pela força.

Aos demais amigos que fiz no CECA: Paulo, Paula, Fred, Jean, Carlos, Welinton, Lucas, Sara.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas – IAC e a Universidade Federal de Santa Maria, onde foram conduzidos os experimentos de campo.

A professora Lúcia Helena dos Anjos pelas correções e ensinamentos. Ao professor e amigo Marcos Gervasio. Muito obrigado pela força, apoio quando fui assumir a vaga de professor no IFAL e pela sua amizade.

A Embrapa pelo suporte logístico. A CAPES pela bolsa concedida, a FAPERJ e CNPq por custear as despesas de viagens.

Ao CPGACS pela aprendizagem com uma equipe de professores altamente qualificada. A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ por ser minha casa nestes últimos 11 anos de trajetória

A todos que de alguma forma direta ou indireta contribuíram com a realização deste trabalho o meu mais sincero MUITO OBRIGADO.

RESUMO

BOA SORTE, Paulo Marcos Fernandes. **Utilização de diferentes técnicas para monitorar a colonização e estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar.** 85f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o estabelecimento das bactérias diazotróficas endofíticas BR 11504, BR 11335, BR 11115, BR 11281 e BR 11366 inoculadas em plantas de cana-de-açúcar cultivada em casa-de-vegetação e nas regiões produtoras de São Paulo e Rio Grande do Sul. Os sítios de colonização e infecção destas bactérias diazotróficas, foram identificados através do mapeamento da parte aérea de plantas de cana de açúcar, a fim de verificar qual região da planta apresenta maior população das bactérias provenientes do inoculante. Foram detectadas bactérias diazotróficas endofíticas em todas as regiões das plantas analisadas pelo método do Número Mais Provável (NMP), inclusive nas folhas. O mapeamento da comunidade de bactérias diazotróficas endofíticas não diferiu nas regiões do nó e entrenó ao longo da planta. O estabelecimento das bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em plantas de cana-de-açúcar, cultivadas nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, foi avaliado pelas técnicas do NMP e PCR em tempo real (qPCR). Não foi observada diferença estatística na população de bactérias diazotróficas endofíticas entre os tratamentos controle e inoculado. A técnica de qPCR apresentou valores superiores de quantificação de bactérias diazotróficas endofíticas, quando comparada com a técnica de contagem dependente de cultivo NMP. O PCR em tempo real mostrou-se bastante preciso e sensível na detecção e quantificação de bactérias diazotróficas endofíticas, podendo ser utilizado em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em condições de campo. A população de bactérias diazotróficas endofíticas variou durante o ciclo da cultura. A diversidade das bactérias diazotróficas presentes em variedades de cana-de-açúcar foi estudada utilizando a técnica de “nested-PCR” com iniciadores para o gene *nifH*. Foi realizada a confirmação do estabelecimento das bactérias do inoculante nos tecidos das plantas de cana-de-açúcar, através do uso de estirpes marcadas para resistência a antibióticos em variedades de cana crescidas em condições de casa de vegetação.

Palavras chaves: PCR em tempo real. NMP. Resistência a antibióticos.

ABSTRACT

BOA SORTE, Paulo Marcos Fernandes. **Utilization of different techniques to monitor the colonization and establishment of endophytic diazotrophic bacteria in sugarcane plants.** 85p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013

The objective of this study was to evaluate the establishment of the diazotrophic bacteria BR 11504, BR 11335, BR 11115, BR 11281 and BR 11366 inoculated in sugarcane plants grown in greenhouse and in production regions of São Paulo and Rio Grande do Sul States. The sites of colonization and infection of these diazotrophs bacteria were identified by mapping shoots of sugarcane plants, in order to check which part of the plant has the largest population of bacteria from the inoculum. Diazotrophic bacteria were detected in all regions of the plants analyzed by the Most Probable Number (MPN) method, including the leaves. The mapping of diazotrophic bacteria community did not differ in the regions of the node and internode of the plant. The establishment of diazotrophic bacteria inoculated in sugarcane plants cultivated in the Brazilian states of São Paulo and Rio Grande do Sul was evaluated by MPN techniques and real-time PCR (qPCR). No statistical difference was observed in the population of endophytic diazotrophic bacteria among the control and the inoculated plants. The qPCR technique showed highest values in the quantification of diazotrophic bacteria when compared with the counting dependent of cultivation technique NMP. The real-time PCR showed to be quite accurate and sensitive in the detection and quantification of diazotrophic bacteria, and it can be used in sugarcane plants cultivated in field conditions. The population of diazotrophic bacteria varied during the crop cycle. The diversity of diazotrophic bacteria presented in the sugarcane varieties was studied using the technique of "nested PCR" with primers for the *nifH* gene. The establishment confirmation of the inoculated bacteria in the tissues of sugarcane plants was performed by using marked strains for antibiotic resistance in sugarcane varieties grown in greenhouse conditions.

Key words: Real-time PCR.MPN.Antibiotic resistance.

LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamnio
D.O.	Densidade tica
dNTP	Desoxirribonucleotdeos trifosfatados
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
TAE	Tris Acetato EDTA
16S rDNA	DNA que codifica para o gene 16S
AgNO ₃	Nitrato de Prata
TEMED	Tetramethylethylenediamine - Tetrametiletlenodiamina
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel Com Gradiente Desnaturante)
kb	Quilobase
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
N	Nitrogênio
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
DNA	“Deoxyribonucleic acid” - ácido desoxirribonucleico
ha	Hectare
kb	quilo base (1000 pb)
pb	pares de base
N	Nitrogênio
PCR	polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
qPCR	PCR em tempo real
CT	“ Cycle Threshold” - Limiar da fase exponencial
PGPR	PGPR – Plant Growth Promoting Rhizobactria (rizobactérias promotoras do crescimento de plantas)
DAE	Dias Após a Emergência

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Microplaca utilizada na diluição dos antibióticos. As diluições de antibióticos foram realizadas nas colunas 2–11, na coluna 1 foi utilizado o controle positivo para crescimento bacteriano, na ausência de antibiótico e na coluna 12 foi utilizado o controle negativo, meio estéril sem inoculação. 14
- Figura 2:** Obtenção de mutantes resistentes a antibióticos por repicagens sucessivas das bactérias em meios sólidos e semi-sólidos apresentando concentrações de antibióticos próximas a concentração mínima inibitória (CMI). Os meios utilizados foram específicos para cada estirpe bacteriana conforme tabela 1. * Processo repetido 4 vezes. 15
- Figura 3:** Experimento de inoculação com bactérias resistentes a antibióticos, implantado em casa de vegetação com o desenho experimental de parcelas subdivididas. A - Croqui do experimento, B – Foto do experimento em casa de vegetação aos 50 dias após o plantio (1ª coleta). 17
- Figura 4:** Coleta e selagem “in situ” com parafina dos toletes de cana. 18
- Figura 5:** Número de bactérias diazotróficas cultivadas nos meios de cultivo JNFb, LGI, LGI-P caldo e JMV presentes nas diferentes regiões do colmo e folha de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515, inoculada com bactérias diazotróficas endofíticas. Dados médios de 3 repetições; Os números 1, 2, 5, 9, 15 e 21 correspondem a posição ascendente do nó ou entrenó coletados dos colmos das plantas de cana-de-açúcar. 27
- Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose (1%) referente ao produto de amplificação da reação de PCR utilizando películas das bactérias presentes nos meios de cultivo semi-sólido e armazenadas em água. Meios de cultura utilizados para o NMP: JNFb, LGI, LGI-P CALDO e JMV. 28
- Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose (1%) referente ao produto de amplificação da reação de PCR utilizando a cultura em meio DYG’S das amostras da figura anterior. Meios de cultura utilizados para o NMP: JNFb, LGI, LGI-P CALDO e JMV. 28
- Figura 8:** Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE com o programa GelCompar II, seguido do Gel de poliácridamida em posição horizontal e pela matriz binária de ausência e presença de bandas. Foi analisada a similaridade pelo Coeficiente de Jaccard $\{(Tol\ 1,3\% - 1,3\%) (H > 0\%, S > 0\%) [0\% - 100\%]\}$. M – Marcadores contendo as cinco bactérias utilizadas no inoculante padrão: Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*. JNFb, LGI, LGI-P CALDO e JMV foram os meios de cultura utilizados para coletar as películas. 29
- Figura 9:** Logaritmo do número de células de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de tecido fresco da base do colmo de plantas de cana-de-açúcar. Variedades SP813250 e RB867515. C – Controle, IN – Inoculado, NIT – Nitrogenado. Dados médios de 3 repetições. Meios de cultivo utilizados JNFb, LGI, LGI-P caldo e JMV. 30
- Figura 10:** Logaritmo do número de células de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de tecido fresco da base do colmo de plantas de cana-de-açúcar. Variedade RB867515. Dados médios de 3 repetições. C – Controle, IN – Inoculado, NIT – Nitrogenado. Meios de cultivo utilizados JNFb, LGI, LGI-P caldo e JMV. As barras verticais representam o erro padrão da média. 32
- Figura 11:** Toletes de cana-de-açúcar germinados em bandejas aclimatadas em casa-de-vegetação. 33

- Figura 12:** Logaritmo do número de células de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de tecido fresco do colmo de plantas de cana-de-açúcar coletadas aos 9, 11 e 12 meses após o plantio, germinadas em casa de vegetação e mantidas por um período de 45 a 60 dias. Variedades SP813250 e RB867515. C – Controle, IN – Inoculado, NIT – Nitrogenado. Dados de amostra composta. Meios de cultivo utilizados JNFB, LGI, LGI-P caldo e JMV. A – Toletes coletados do experimento no estado de São Paulo (12 meses); B - Toletes coletados do experimento no estado do Rio Grande do Sul (9 e 11 meses). 34
- Figura 13:** Gel de acrilamina:bis-acrilamida 3% submetido a eletroforese de 75 v por por 5.5 horas em cuba vertical. M1 e M2, marcadores de massa molecular, M1 – 1Kb, M2 – 100bp. Amostras de 1 – 6, estirpes bacterianas: 1 – *H. rubrisubalbicans* (estirpe HCC103); 2 – *H. seropedicae* (HRC54); 3 – *A. amazonense* (CBamC); 4 – *G. diazotrophicus* (PAL5); 5 – *B.tropica* (Ppe8); 6 – *H. seropedicae* (ZAE94). B – branco. 35
- Figura 14:** Eletroforese em géis de agarose 2%, submetidos a 100v por 80 min. Produtos de PCR amplificados com iniciadores específicos para as espécies bacterianas: Gd – *G. diazotrophicus*, Aa – *A. amazonense*, Hs1 e Hs2 – *H. seropedicae* (Estirpe ZAE 94), Hs3 - *H. seropedicae* (Estirpe HRC54), Hr – *H. rubrisubalbicans*, Bt – *B. tropica* especificados na Tabela 5. 36
- Figura 15:** Eletroforese em géis de agarose 2%, submetidos a 100V por 80 min, evidenciando produtos de PCR amplificados com iniciadores específicos para as espécies bacterianas: Gd – *G. diazotrophicus*, Aa – *A. amazonense*, Hs4 - *H. seropedicae* (Estirpe HRC54), Hr – *H. rubrisubalbicans*, Bt – *B. tropica*. Especificados na Tabela 5. 38
- Figura 16:** Curva padrão do Log₁₀ do número de cópias. 39
- Figura 17:** Log₁₀ do número de cópias do gene rDNA 16S de bactérias diazotróficas endofíticas obtidas por grama de tecido fresco. Tratamentos: C – Controle; In – Inoculado e Nit – Nitrogenado. Variedade de cana-de-açúcar SP813250..... 40
- Figura 18:** Log₁₀ do número de cópias do gene rDNA 16S de bactérias diazotróficas endofíticas obtidas por grama de tecido fresco. Tratamentos: C – Controle; In – Inoculado e Nit – Nitrogenado. Variedade de cana-de-açúcar RB867515..... 41
- Figura 19:** Log₁₀ do número de cópias do rDNA 16S de bactérias diazotróficas endofíticas obtidas por qPCR aos 7 e 11 meses após o plantio. A – Quantificação por reação de qPCR. B – Estimativa da quantificação por grama de tecido fresco. Tratamentos: C – Controle; In – Inoculado e Nit – Nitrogenado. 42
- Figura 20:** Curva Padrão das diluições de DNA versos médias de CT. Foram utilizadas 3 repetições para todas as diluições. 43
- Figura 21:** Quantificação do número de células da bactéria *G. diazotrophicus* por qPCR em planta de cana de açúcar com diferentes idades, inoculadas e não inoculadas com uma mistura de cinco bactérias. Os valores não diferem estatisticamente pelo teste LSD a 10% de significância. 44
- Figura 22:** Quantificação do número de células da bactéria *G. diazotrophicus* por qPCR em planta de cana de açúcar com diferentes idades, inoculas e não inoculadas com uma mistura de cinco bactérias. Os valores não diferem estatisticamente pelo teste LSD a 10% de significância. 46
- Figura 23:** Gel de poliacrilamida (8%) com gradiente desnaturante (45% - 65%). Perfil de DGGE do gene *nifH*. 1Kb – Marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). M – Mistura das bactérias; 1 – *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; 2 – *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5; 3 – *Acetobacter liquefaciens*; 4 – *Azospirillum amazonense*; 5 – *G. Johanae*, CFN; 6 – *Burkholderia tropica*; 7 –

- Herbaspirillum seropedicae*; 8 – *Bradyrhizobium*, 3267. 9 – *Burkholderia vietnamiense*, Tv75; 10 – *Burkholderia kururiense*, M130..... 48
- Figura 24:** Gel de poliacrilamida (8%) com gradiente desnaturante (45% - 65%). Perfil de DGGE do gene *nifH* das amostras de campo. 1ª Coleta. 1Kb – Marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). M – Marcador, mistura bacteriana (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia tropica*, *G. Johanae* e *Acetobacter liquefaciens*). 48
- Figura 25:** Gel de poliacrilamida (8%) com gradiente desnaturante (45% - 65%). Perfil de DGGE do gene *nifH* das amostras de campo. 1ª Coleta. 1Kb – Marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). M – Marcador. N – Tratamento Nitrogenado. I – Tratamento Inoculado. C – Tratamento Controle. VA B2 SP – Variedade A, Bloco 2, Coleta do Estado de São Paulo. VB B2 SP – Variedade B, Bloco 2, Coleta do Estado de São Paulo. VA B3 SP – Variedade A, Bloco 3, Coleta do Estado de São Paulo. VB B3 SP – Variedade B, Bloco 3, Coleta do Estado de São Paulo. 49
- Figura 26:** Gel de poliacrilamida (8%) com gradiente desnaturante (45% - 65%). Perfil de DGGE do gene *nifH* das amostras de campo. 2ª Coleta. 1Kb – Marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). M – Marcador. N – Tratamento Nitrogenado. I – Tratamento Inoculado. C – Tratamento Controle. B1 RS – Bloco 1, Coleta do Estado do Rio Grande do Sul. B2 RS – Bloco 2, Coleta do Estado do Rio Grande do Sul. B3 RS – Bloco 3, Coleta do Estado do Rio Grande do Sul. VA B1 SP – Variedade A, Bloco 1, Coleta do Estado de São Paulo. VB B1 SP – Variedade B, Bloco 1, Coleta do Estado de São Paulo..... 49
- Figura 27:** Gel de poliacrilamida (8%) com gradiente desnaturante (45% - 65%). Perfil de DGGE do gene *nifH* das amostras de campo. 2ª Coleta. 1Kb – Marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). M – Marcador. N – Tratamento Nitrogenado. I – Tratamento Inoculado. C – Tratamento Controle. VA B2 SP – Variedade A, Bloco 2, Coleta do Estado de São Paulo. VB B2 SP – Variedade B, Bloco 2, Coleta do Estado de São Paulo. VA B3 SP – Variedade A, Bloco 3, Coleta do Estado de São Paulo. VB B3 SP – Variedade B, Bloco 3, Coleta do Estado de São Paulo. 50
- Figura 28:** Crescimento bacteriano das estirpes HCC 103 de *H. rubrisubalbicans*, HRC54 de *H. seropedicae* na presença de sete antibióticos..... 51
- Figura 29:** Crescimento de uma estirpe (*G. diazotrophicus* PAL5) frente a cinco antibióticos (Oliveira et al., 2009b)..... 52
- Figura 30:** Logaritmo do número de células de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de tecido fresco de plantas de cana-de-açúcar. Variedades RB867515. A – Meios de cultura com antibióticos; B – Meios de cultura sem antibiótico. 53
- Figura 31:** Logaritmo do número de células de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de tecido fresco de plantas de cana-de-açúcar. Variedades RB867515. A – Meios de cultura com antibióticos; B – Meios de cultura sem antibiótico. 54
- Figura 32:** Logaritmo do número de células de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de tecido fresco de plantas de cana-de-açúcar. Variedades RB867515. A – Meios de cultura com antibióticos; B – Meios de cultura sem antibiótico. 55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Espécies bacterianas inoculadas em cana-de-açúcar e seus respectivos meios de crescimento.	12
Tabela 2: Análise da fertilidade do solo da área experimental na cidade Sales Oliveira - São Paulo.	13
Tabela 3: Análise da fertilidade do solo da área experimental na cidade Jaguarí - Rio grande do Sul.	13
Tabela 4: Iniciadores utilizados nas reações de amplificação para análise por DGGE e respectivas seqüências de nucleotídeos.	19
Tabela 5: Iniciadores para localizar e quantificar bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em cana-de-açucar. Hr – <i>H. rubrisubalbicans</i> , Hs – <i>H. seropedicae</i> , Aa – <i>A. amazonense</i> , Gd – <i>G. diazotrophicus</i> e Bt – <i>B. tropica</i>	22
Tabela 6: Iniciadores utilizados para o gene <i>nifH</i> nas reações de amplificação para análise por DGGE e respectivas sequências de nucleotídeos	25
Tabela 7: Número de bandas contabilizadas a partir da matriz binária de ausência e presença de bandas na Figura 8, indicando a porcentagem de bandas correspondentes às bactérias do inoculante e a porcentagem de amostras que apresentaram as bandas correspondentes às bactérias do inoculante.	29
Tabela 8: Estirpes e origem de isolamento das bactérias utilizadas nas reações de PCR para testar a especificidade dos iniciadores. Amplificação constatada (+), ausente (-). Hr – <i>H. rubrisubalbicans</i> , Hs – <i>H. seropedicae</i> , Aa – <i>A. amazonense</i> , Gd – <i>G. diazotrophicus</i> e Bt – <i>B. tropica</i>	37
Tabela 9: Valores da concentração de DNA utilizada nas reações de qPCR, respectivos número de cópias e CT's médios obtidos para cada espécie microbiana correspondentes a concentração de DNA utilizada nas reações de qPCR. (-) Não determinado. Hr – <i>H. rubrisubalbicans</i> , Hs – <i>H. seropedicae</i> , Aa – <i>A. amazonense</i> , Gd – <i>G. diazotrophicus</i> e Bt – <i>B. tropica</i>	39
Tabela 10: Estimativa do número de bactérias em função do CT médio obtido para cada concentração de DNA.	43
Tabela 11: Concentração Mínima Inibitória dos antibióticos selecionados paraas bactérias <i>H. rubrisubalbicans</i> , <i>H. seropedicae</i> , <i>G. diazotrophicus</i> , <i>A. amazonense</i> e <i>B. tropica</i>	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Bactérias Diazotróficas em Cana-de-Açúcar.....	3
2.2	Nichos de Colonização das Bactérias Diazotróficas Endofíticas no Interior da Planta de Cana-de-Açúcar	4
2.3	Técnicas Utilizadas para Monitorar o Estabelecimento de Bactérias em plantas	6
2.3.1	Número mais provável – NMP	6
2.3.2	“Enzyme linked immunosorbent assay” – ELISA	7
2.3.3	“Fluorescent in situ hibridization” – FISH	8
2.3.4	“Polimerase chain reaction” – PCR.....	8
2.3.5	“Denaturing gradient gel electrophoresis” – DGGE	9
2.3.6	PCR quantitativo ou PCR em tempo real	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1	Experimentos Conduzidos e Avaliados	12
3.1.1	Mapeamento da colonização endofítica das bactérias inoculadas em plantas de cana-de-açúcar.....	12
3.1.2	Monitoramento das bactérias diazotróficas endofíticas correspondentes às inoculadas em cana-de-açúcar cultivadas nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul.....	12
3.1.3	Confirmação do estabelecimento das bactérias diazotróficas componentes do inoculante nos tecidos de cana-de-açúcar através do uso de mutantes naturais resistentes a diferentes antibióticos	13
3.2	Métodos de Amostragem de Tecidos Vegetais	17
3.2.1	Mapeamento da colonização endofítica das bactérias inoculadas em plantas de cana-de-açúcar.....	17
3.2.2	Monitoramento das bactérias diazotróficas endofíticas correspondentes às inoculadas em cana-de-açúcar cultivadas nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul.....	17
3.2.3	Confirmação do estabelecimento das bactérias diazotróficas componentes do inoculante nos tecidos de cana-de-açúcar através do uso de mutantes naturais resistentes a diferentes antibióticos	18
3.3	Técnicas Utilizadas para o Monitoramento das Bactérias Diazotróficas Inoculadas em Plantas de Cana-de-Açúcar.....	18
3.3.1	Mapeamento da colonização endofítica das bactérias inoculadas em plantas de cana-de-açúcar.....	18
3.3.2	Monitoramento das bactérias diazotróficas endofíticas correspondentes às inoculadas em cana-de-açúcar cultivadas nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul.....	20
3.3.3	Confirmação do estabelecimento das bactérias diazotróficas componentes do inoculante nos tecidos de cana-de-açúcar através do uso de mutantes naturais resistentes a diferentes antibióticos	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	Mapeamento da Colonização Endofítica por Bactérias Inoculadas em Plantas de Cana-de-Açúcar.....	26
4.1.1	Contagem do número de bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar pela técnica do número mais provável (NMP).....	26

4.1.2	Localização das bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar pela técnica de DGGE.....	27
4.2	Monitoramento das Bactérias Diazotróficas Endofíticas Correspondentes às Inoculadas em Cana-de-açúcar Cultivada nos Estado de São Paulo e Rio Grande do Sul 30	
4.2.1	Quantificação da população de bactérias diazotróficas pelo método do número mais provável (NMP).....	30
4.2.1.1	Material vegetal direto do campo	30
4.2.1.2	População de bactérias diazotróficas endofíticas do material vegetal germinado em casa de vegetação.....	32
4.2.2	Amplificação da sequência repetitiva BOX-PCR das bactérias inoculadas e <i>H. seropedicae</i> , estirpe ZAE94 (BR 11417)	35
4.2.3	Ajuste da técnica de PCR para detectar e quantificar por qPCR as bactérias inoculadas em cana-de-açúcar	36
4.2.4	Diversidade do gene <i>nifH</i> em variedades de cana-de-açúcar utilizando a técnica de “nested-pcr” e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE	47
4.3	Confirmação do Estabelecimento das Bactérias Diazotróficas Componentes do Inoculante nos Tecidos de Cana-de-Açúcar através do Uso de Mutantes Naturais Resistentes a Diferentes Antibióticos	50
5	CONCLUSÕES.....	56
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar no Brasil foi melhorada geneticamente para produzir altos rendimentos de colmos com baixas doses de adubos nitrogenados. Acredita-se que isto tenha favorecido a associação desta cultura com bactérias diazotróficas endofíticas. Estudos são realizados desde a década de 50 buscando entender melhor esta associação planta bactéria, e os benefícios proporcionados à cultura, principalmente quanto a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).

Uma mistura de cinco bactérias diazotróficas endofíticas: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 113435), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366) foram recomendadas para inoculação em cana-de-açúcar (REIS et al., 2009). Estas bactérias podem desempenhar um papel importante na agricultura conferindo vantagens para a planta, como capacidade de transformar o N₂ em amônia através da FBN. Além disso, bactérias diazotróficas endofíticas podem promover outros efeitos benéficos à planta hospedeira, incluindo a produção de hormônios vegetais, atividades anti-patógeno e solubilização de fosfato (JAMES et al., 1994; FUENTES-RAMIREZ et al., 1997; DOBELLAERE et al., 2003). Recentemente a solubilização do zinco tem sido reportada como melhoria de crescimento da cultura de cana-de-açúcar após a inoculação com *G. diazotrophicus* (NATHEER & MUTHUKKARUPPAN, 2012).

A inoculação de *G. diazotrophicus* interagindo com outras bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azospirillum* em plantas de cana-de-açúcar causa efeito positivo nesta cultura levando ao aumento da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), promoção do desenvolvimento radicular, aumento da biomassa e produtividade (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2002; PEREIRA et al., 2013).

Localizar e quantificar essas bactérias nos tecidos vegetais é importante, pois possibilita a avaliação do estabelecimento bacteriano em experimentos de inoculação. A utilização de ferramentas como Número Mais Provável (NMP) (FUENTES-RAMIREZ et al., 1999), microscopia (JAMES et al., 1994, 2001); Hibridização Fluorescente “in situ” – (FISH) do inglês “*Fluorescent In Situ Hybridization*” (OLIVEIRA et al., 2009a); Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – (DGGE), “*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*” (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2005); genes repórter (MENESES et al., 2011); Ensaio Imunoenzimático – (ELISA) “*Enzyme Linked Immunosorbent assay*” (SILVA-FROUFE et al., 2009), e Reação em Cadeia da Polimerase - (PCR), “*Polymerase Chain Reaction*” (SHIME-HATORRI et al., 2011), podem ser utilizadas para avaliar o estabelecimento de bactérias em plantas. Dentre essas, o PCR quantitativo (qPCR) é a ferramenta mais precisa devido a alta sensibilidade na detecção de até 1 cópia do DNA µl⁻¹ (BOECKMAN et al., 2000).

Apesar dos resultados promissores da inoculação para a cultura da cana-de-açúcar, ainda não é sabido se essas bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas são mais eficientes do que as bactérias nativas quanto à colonização, competição e estabelecimento em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em condições de campo, independentemente das condições de cultivo.

Para testar a hipótese de que as bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas, capazes de colonizar plantas de cana de açúcar, podem ser monitoradas por diferentes técnicas, foram propostos os seguintes objetivos:

- a) Mapear a planta de cana-de-açúcar utilizando a técnica do Número Mais Provável (NMP) e DGGE para localizar as bactérias diazotróficas inoculadas

- b) Monitorar a colonização e o estabelecimento das bactérias diazotróficas inoculadas em plantas de cana-de-açúcar cultivadas no estado de São Paulo e Rio Grande do Sul pela técnica de NMP e PCR em tempo real (qPCR);
- c) Utilizar a técnica de PCR – DGGE para estudar a diversidade das bactérias diazotróficas presentes em variedades de cana-de-açúcar
- d) Confirmar o estabelecimento das bactérias do inoculante existente para a cana-de-açúcar, nos tecidos das plantas através do uso de estirpes marcadas para resistência natural a antibiótico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bactérias Diazotróficas em Cana-de-Açúcar

As bactérias diazotróficas endofíticas vem sendo estudadas desde a década de 50 com os primeiros trabalhos realizados no Brasil por Döbereiner e seus colaboradores. Com o avanço dos estudos foram realizados vários experimentos em outros países além do Brasil, como México e Índia, reportando aumentos na nutrição nitrogenada, incrementos na produtividade de colmos e na sobrevivência de plantas de cana-de-açúcar inoculadas, além de acréscimos no comprimento das raízes e do volume radicular (MUTHUKUMARASAMY et al., 1999; SUMAN et al., 2005; MUÑOZ-ROJAS & CABALLERO-MELLADO, 2003).

No Brasil foi observado, através da técnica de diluição isotópica, que 60% do nitrogênio acumulado nas variedades de cana-de-açúcar NA56-79 e SP70-1143 foram provenientes da FBN, sugerindo que as bactérias diazotróficas eram as principais responsáveis por estes benefícios (URQUIAGA et al., 1992).

O desenvolvimento do meio semi-sólido NFb na década de 70, permitiu, através da modificação da fonte de carbono e do pH do meio (DÖBEREINER & DAY, 1976) o isolamento e a descrição de várias espécies de bactérias endofíticas colonizando diferentes culturas da família *Poaceae* (DÖBEREINER et al., 1995). Dentre elas, destacam-se as espécies como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, algumas espécies de *Azospirillum* e *Burkholderia* que infectam e colonizam tecidos internos de plantas de cana-de-açúcar (BALDANI & BALDANI, 2005) sem causar prejuízo aparente a planta.

Sob condições experimentais controladas, utilizando vasos com terra, Oliveira et al. (2002) inocularam as estirpes BR 11335 – *Herbaspirillum seropedicae*, BR 11504-*Herbaspirillum rubrisubalbicans*, BR 11115 - *Azospirillum amazonense*, BR11281 – *Gluconacetobacter diazotrophicus* e BR 11366 – *Burkholderia tropica*, individualizadas e em diferentes combinações na variedade de cana-de-açúcar SP701143 em mudas micropropagadas. Estes autores observaram, aos 400 dias após o plantio, um maior desenvolvimento das plantas com a inoculação conjunta de todas as espécies. A avaliação da FBN através do método de diluição isotópica de ¹⁵N mostrou que as bactérias contribuíram com 30% do nitrogênio acumulado nos tecidos da planta (OLIVEIRA et al., 2002).

Esta mesma mistura de bactérias foi inoculada nas variedades SP70-1143 e SP81-3250 cultivadas em condições de campo e em diferentes tipos de solos e avaliadas aos 16 meses após a inoculação. Neste estudo foi observado que a FBN medida pela técnica de abundância natural de ¹⁵N variou de -4,5 a 31,4%, sendo que os valores foram maiores em solo de baixa fertilidade (OLIVEIRA et al., 2006). Além disso, foram observados pequenos aumentos no peso dos colmos na variedade SP70-1143 nos solos com baixa e média fertilidade, enquanto que na variedade SP81-3250 houve um decréscimo de produtividade nos 3 tipos de solos testados. Os autores concluíram que a contribuição da FBN em cana-de-açúcar variou com o tipo de solo, mistura de bactérias aplicadas e variedade da cana-de-açúcar utilizada.

Baseando-se nesse e em outros estudos, Reis e colaboradores (2009) recomendaram o inoculante de cinco estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas para cana-de-açúcar, após realizar vários experimentos em diferentes variedades cultivadas em diversas regiões brasileiras utilizando a mesma mistura de bactérias testada por Oliveira et al. (2002, 2006). Além da análise dos parâmetros agrônômicos é necessário saber como ocorre o estabelecimento dessas bactérias inoculadas e se existe diferença na colonização entre as variedades comerciais testadas em condições de campo.

2.2 Nichos de Colonização das Bactérias Diazotróficas Endofíticas no Interior da Planta de Cana-de-Açúcar

Os estudos iniciais relacionados à localização das bactérias endofíticas no interior da planta foram realizados por microscopia eletrônica, para identificar bactérias do gênero *Gluconacetobacter* nos espaços intercelulares de cana-de-açúcar (JAMES et al., 1994).

Para visualização de bactérias no apoplasto de plantas de cana-de-açúcar foi sugerido a centrifugação para a retirada de todo o líquido do apoplasto, sem danificar as células a fim de quantificar as bactérias ali presentes (DONG et al., 1994). Estes autores observaram até 10^4 bactérias por mL de líquido apoplástico, enquanto que por maceração homogênea do tecido vegetal esses valores subiram para 10^6 - 10^8 , facilitando assim a obtenção de 100 a 10000 vezes mais bactérias. Isso porque os espaços intercelulares apresentam uma mucilagem e as bactérias podem ficar aderidas a ela, mesmo retirando-se todo o líquido por centrifugação.

Oito isolados de bactérias diazotróficas semelhantes à estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* foram encontrados no espaço intercelular dos tecidos de cana-de-açúcar, e confirmados por mais de 30 testes bioquímicos como pertencentes à *G. diazotrophicus* (DONG et al., 1995). *G. diazotrophicus* foi isolada principalmente de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar por Cavalcante & Döbereiner (1988) e considerada endofítica obrigatória segundo Baldani et al. (1997). Esta bactéria pode colonizar tanto o apoplasto quanto os vasos do xilema de raízes e da base do colmo de plantas de cana-de-açúcar micropropagadas (JAMES et al., 1994; FUENTES-RAMIREZ et al., 1997).

Com o avanço da biologia molecular, mais estudos foram realizados mostrando a localização dos endofíticos fixadores de N no interior dos tecidos da planta (ROUWS et al., 2010). Uma das ferramentas mais utilizadas atualmente para se fazer um mapeamento da bactéria desde o momento da inoculação até a fase de colheita da planta é a utilização de marcadores genéticos como os genes repórter (ROUWS et al., 2010).

O monitoramento da colonização de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 foi realizado em plantas inoculadas de cana-de-açúcar e arroz através do uso da expressão dos genes *gfp* e *gus* para localizá-la no interior dos tecidos vegetais. A expressão da proteína GUS foi visualizada principalmente nos tecidos das raízes das plantas utilizadas (ROUWS et al., 2010). Já nas plântulas de arroz, os autores visualizaram a bactéria expressando o gene *gfp*, colonizando principalmente, os espaços intercelulares, o parênquima cortical e especialmente o aerênquima (ROUWS et al., 2010).

G. diazotrophicus é capaz de colonizar a superfície de raízes de cana-de-açúcar, penetrar através dos sítios de emergência das raízes laterais, assim como, através da região meristemática das raízes (JAMES et al., 1994; REIS, 2004). Os sítios de colonização de *G. diazotrophicus* e sua distribuição no interior da planta de cana-de-açúcar tem sido motivo de controvérsia entre os diferentes grupos de estudo que têm investigado esta associação com o uso de diferentes estratégias: imunológicas, moleculares ou com o auxílio de microscopia eletrônica.

Foi demonstrado que *G. diazotrophicus* coloniza os espaços intercelulares de raízes e vasos do xilema de plantas de cana com até 30 dias de idade e em plantas adultas, quando obtidas por micropropagação e por propagação vegetativa do colmo como mostrado por James et al. (1994), Dong et al. (1994) e Fuentes-Ramírez et al. (1999). Dong e colaboradores (1994) argumentaram que a presença de *G. diazotrophicus* nos vasos do xilema, pode produzir uma goma que provoca o entupimento dos vasos. Porém, em outros trabalhos não se tem observado a ocorrência de nenhuma reação patogênica quando realizada a inoculação com tal bactéria (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1999; JAMES et al., 1994 e REIS et al., 1999).

A discrepância entre os dados pode ser explicada pelas diferentes formas e quantidade de células na inoculação. Dependendo da forma de inoculação a planta pode identificar a

bactéria como algo maléfico (patogênico) e assim desenvolver um efeito de patogenicidade. A quantidade de células também pode desencadear esta reação. Então, a presença das bactérias no interior dos tecidos vegetais tem sido em maior frequência no apoplasto em virtude das condições favoráveis. Porém, a localização destas bactérias é bastante variável, pois depende da cultura, da estirpe, da cultivar e da idade da planta. E o transporte das mesmas no interior da planta pode ocorrer pelos vasos do xilema, sem apresentar sintomas de patogenicidade, como mostrado por alguns autores utilizando técnicas de microscopia auxiliadas pela biologia molecular (JAMES et al., 2001; DÖBEREINER et al., 1995; JAMES & OLIVARES, 1998; REIS et al., 1999; FUENTES-RAMIREZ et al., 1999).

Segundo James e Olivares (1997) *Azospirillum* spp são bactérias de rizosfera que colonizam principalmente a zona de alongamento e de pelos radiculares (OKON & KAPULNIK, 1986; DÖBEREINER et al., 1995, VANDE BROEK & VANDERLEYDEN, 1995; BASHAN & HOLGUIN, 1995). Algumas espécies podem ser consideradas endofíticas (BALDANI & BALDANI, 2005) principalmente em associação com raízes de plantas da família *Poaceae* incluindo cana-de-açúcar (DÖBEREINER et al., 1995). A estirpe Sp245 de *A. brasilense* foi isolada apenas de raízes esterilizadas de trigo e sorgo, sugerindo que são endofíticos obrigatórios (BALDANI et al., 1986a).

Ramos e colaboradores (2002) construíram um plasmídeo contendo o gene *GFP* e inseriram o mesmo em *A. brasilense* podendo acompanhar a colonização desta bactéria no apoplasto dos tecidos de plantas de trigo. Neste trabalho os autores inocularam as sementes e a bactéria foi detectada nas raízes pelas análises de microscopia.

O Gênero *Burkholderia* apresenta algumas espécies que são fixadoras de nitrogênio. Boddey e colaboradores (1999) inocularam a estirpe Ppe8 de *B. tropica* em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar (variedade SP70-1143) e observaram por microscopia ótica aos cinco, sete e dez dias após a inoculação que esta bactéria colonizava a rizosfera e os locais de emergência das raízes secundárias, indicando segundo os autores ser este o nicho ideal para a colonização destas bactérias.

A espécie *B. tropica* foi caracterizada por Reis e colaboradores (2004), como uma bactéria diazotrófica endofítica. Os isolados foram obtidos da rizosfera, rizoplano e do interior de plantas de milho cultivados no México; colmo e raízes de cana-de-açúcar no Brasil, e raízes de cana cultivada na África do Sul. A estirpe Ppe8 também foi isolada de colmos de cana cultivada no Brasil (REIS et al., 2004).

Olivares et al. (1996) isolou *H. seropedicae* de colmos de cana-de-açúcar confirmando a natureza endofítica sugerida por Baldani et al. (1992). Porém, esta bactéria também foi isolada da rizosfera de diversas gramíneas (BALDANI et al., 1986b). *H. rubrisubalbicans* tem sido isolada de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar tendo preferência pelas folhas (OLIVARES et al., 1996). Segundo estes autores *Herbaspirillum* spp pode infectar a planta através da rizosfera e foram encontradas no xilema do colmo de plantas de cana-de-açúcar (JAMES & OLIVARES, 1997).

Um experimento para avaliar a colonização em cana-de-açúcar também foi realizado por Njoloma et al. (2006) utilizando *Herbaspirillum* spp. marcado com *gfp* (B501gfp1). Os autores testaram duas doses de inoculação em duas variedades de cana-de-açúcar micropropagadas, e observaram aos 28 dias após a inoculação a bactéria ocupando os espaços intercelulares (apoplasto) de raízes e colmos da planta, em todos os tratamentos. Os autores mostraram também a colonização da espécie transgênica de *Herbaspirillum* nos vasos do xilema. Foi observada a colonização intercelular da variedade de cana cv Nil5 quando as plantas foram inoculadas com 10^2 ou 10^8 bactérias por mL.

Oliveira et al. (2009a) realizaram um experimento de inoculação com diferentes misturas das estirpes bacterianas BR 11335 – *Herbaspirillum seropedicae*, BR 11504- *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, BR 11115 - *Azospirillum amazonense*, BR11281 –

Gluconacetobacter diazotrophicus e BR 11366 – *Burkholderia tropica*, em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, com o propósito de estudar a colonização nas plantas. Os autores utilizaram sondas para hibridização *in situ* (FISH) específicas para cada bactéria com o objetivo de acompanhar a colonização endofítica. Estes autores observaram que as estirpes bacterianas encontravam-se na superfície das raízes, coifa, rizoderme e zona de emissão de raízes secundárias. Os autores observaram que a inoculação bacteriana mista confirma que todas as espécies inoculadas atingiram o habitat endofítico com a infecção ativa da coifa e a zona de emergência de raízes secundárias, embora com eficiências diferentes devido a possível competitividade entre as espécies.

As bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar apresentam um comportamento dinâmico. Embora estas bactérias sejam consideradas endofíticas, em algum momento as mesmas habitam a rizosfera ou os vasos do xilema.

2.3 Técnicas Utilizadas para Monitorar o Estabelecimento de Bactérias em plantas

2.3.1 Número mais provável – NMP

Existem várias técnicas para avaliar o estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas, e uma das mais antigas é a contagem do número de bactérias (técnica do NMP – Número Mais Provável) em meios de cultura semi-específicos. Esta técnica foi idealizada por McCrady (1915) para estimar a densidade da população microbiana em tubos de fermentação e desde então vem sendo utilizada para estimar a densidade de vários microrganismos provenientes de diversas origens e em diferentes sistemas.

A técnica do NMP, ou método da diluição em série, permite estimar a densidade de um microrganismo, sem necessidade de contagem direta (ALEXANDER, 1982) e consiste das seguintes etapas: diluições sucessivas, amostragens de cada diluição, inoculação em meios apropriados e avaliação quanto ao crescimento do organismo desejado. A estimativa da densidade é baseada na aplicação da teoria da probabilidade (COCHRAN, 1950).

A técnica do NMP é laboriosa, porém, é de fácil execução quando os microrganismos avaliados são passíveis de diluição em meio líquido e crescimento e identificação em meio de cultura definido.

Nos laboratórios de microbiologia do solo, a técnica do NMP é de uso comum, sendo utilizada para estimar as densidades das populações de bactérias em tecidos de plantas, como as da família *Poaceae* onde bactérias diazotróficas têm sido quantificadas (DÖBEREINER et al., 1995; REIS JÚNIOR et al., 2000; GOMES et al., 2005; PERIN et al., 2004).

Para bactérias diazotróficas endofíticas a metodologia mais utilizada é a do crescimento em meios de cultura semi-sólido, semi-seletivos, com diferentes fontes de carbono e diferentes condições de crescimento (DOBEREINER et al., 1995). Vários autores utilizaram esta técnica em diversas plantas da família *Poaceae*, principalmente em cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002; 2006; 2009a; REIS, 1991; REIS JÚNIOR., et al., 2000; PEDRAZA et al., 2009; GARCIA DE SALAMONE et al., 2010). Essa técnica apresenta como principal vantagem a simplicidade de utilização e o baixo custo, porém os meios de cultura utilizados não são totalmente específicos, apresentando assim uma semi-especificidade. Desta forma, torna-se necessário estar associado ao isolamento e identificação da bactéria ou através da marcação das bactérias alvos por resistência natural a antibióticos (ASSIS, 1995; BALDANI et al., 1983, 1986a, 1987; BODDEY et al., 1986; LÓPEZ et al., 1999; MARIANO & McCARTER, 1991 a, b, 1993; PEREIRA et al., 1988; SALA, 2006).

A sobrevivência de bactérias na planta e no solo pode ser monitorada pelo uso de mutantes resistentes a antibióticos, tais como rifampicina e/ou ácido nalidíxico uma vez que

essas mutações se comportam como marcadores para o acompanhamento dessas bactérias (ASSIS, 1995). Mutantes com resistência a antibióticos têm sido empregados em estudos ecológicos de bactérias fitopatogênicas, incluindo sobrevivência no solo e em plantas. A sobrevivência de *Xanthomonas campestris* em solo foi estudada pelo uso de mutantes resistentes a rifampicina (LÓPEZ et al., 1999), e mutantes de *Pseudomonas syringae* com resistência a rifampicina e ácido nalidíxico foram empregados para avaliar a sobrevivência epifítica em folhas e raízes de tomateiro e ervas daninhas (MARIANO & MCCARTER, 1991a, b; 1993).

Para monitorar o estabelecimento de *Azospirillum* spp inoculadas nas culturas de trigo e sorgo em condições de campo, Baldani et al. (1986a) utilizaram NMP em conjunto com uma marcação natural de resistência a antibióticos. Estes autores observaram que as estirpes de *Azospirillum brasiliense* Sp 107 e Sp 245 estabeleceram-se e predominaram sobre a população de *Azospirillum* spp em raízes de trigo lavadas ou esterilizadas, analisados em três experimentos independentes. Por outro lado, as estirpes Sp 7 e Cd não se estabeleceram bem nas raízes de trigo. Na cultura do sorgo, os autores verificaram o estabelecimento da estirpe S82 de *Azospirillum lipoferum* representando 72% dos isolados de raízes inoculadas com esta estirpe. Os autores confirmaram o estabelecimento de *Azospirillum* spp e observaram um maior número de bactéria na parte superior das raízes (mais próximas do caule) em comparação com as extremidades.

Pereira et al. (1988) avaliaram o estabelecimento e efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp e *Azospirillum* spp em duas variedades de sorgo e uma de arroz. Os autores usaram estirpes bacterianas apresentando marca de seleção para resistência a antibióticos que permitiu fazer o monitoramento das bactérias inoculadas. *A. lipoferum* estirpe S82 estabeleceu-se em ambas as cultivares de sorgo e compreendeu de 40 a 80% das espécies de *Azospirillum* nas raízes e colmos aos 60 dias após a emergência - DAE. *Azospirillum amazonense* estirpe AreS91 apresentou um estabelecimento abaixo de 30% e praticamente desapareceu, enquanto AmS91 permaneceu constante em raízes e colmos. *H. seropedicae* estirpe H25 e *A. lipoferum* estirpe S65 não foram observadas em raízes inoculadas, o que indica uma ausência ou não detecção do estabelecimento. Em arroz, *A. lipoferum* A1 121 e *A. brasiliense* Sp 245 estabeleceram-se nas raízes, mas não houve aumento no número de *Azospirillum* spp devido a inoculação. Nenhuma estirpe afetou o crescimento das plantas de arroz ou a produção de grãos. *Azospirillum amazonense* A82 e *H. seropedicae* Z95, não se estabeleceram nas raízes das plantas.

2.3.2 “Enzyme linked immunosorbent assay”–ELISA

Métodos enzimáticos também têm sido utilizados, e o mais comum é o de ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent assay*. Este consiste em um método imunológico que permite a detecção de antígeno em meio líquido, como é o caso dos extratos vegetais através da produção de anticorpos policlonais. Sendo assim, é possível detectar e até mesmo quantificar bactérias diazotróficas endofíticas. Foi utilizado por Silva (1999), Perin et al. (2004) e Silva-Froufe et al. (2009) em cana-de-açúcar e por Silva e Reis (2005) em isolados de várias culturas da família *Poaceae*. Silva-Froufe et al. (2009) obtiveram melhor desempenho deste método em comparação ao método tradicional NMP. Os autores produziram anti-corpos e anti-soros policlonais contra as bactérias diazotróficas *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpes PR2 e PAL3) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67 e HRC54) e os caracterizou juntamente com dois outros soros para *H. rubrisubalbicans* (HCC103 e M4). Estes autores utilizaram este método enzimático para quantificar a população destas bactérias diazotróficas endofíticas e concluíram que este método apresentou-se eficiente, no qual os ensaios apresentaram as bactérias dentro de um nível mínimo de detecção e por fim concluíram que

este método poderia inclusive substituir o método tradicional de contagem NMP. Silva-Froufe e colaboradores (2009) detectaram um limite mínimo de 10^5 células mL^{-1} de *G. diazotrophicus*, semelhante a Li & Macrae (1992). Limites ainda menores (10^3 células mL^{-1}) foram detectados para a estirpe Sp 245 de *Azospirillum brasilense* (SCHLOTTER & HARTMANN, 1996).

Uma alternativa aos métodos tradicionais de isolamento e cultivo de bactérias, seguidos de bioensaios visando a sua identificação e detecção, são as técnicas moleculares. Essas técnicas têm oferecido uma abordagem inovadora, sensível e específica com potencial de aplicação em ambientes naturais. Podem inclusive propiciar o acesso a um maior número de microrganismos presentes em amostras ambientais (ROSADO et al., 1997), principalmente àqueles não cultiváveis que correspondem a mais de 90% dos microrganismos existentes (MACNAUGHTON et al., 1999). Cerca de apenas 1% da diversidade microbiana existente é possível de ser cultivada utilizando metodologias padrão (TORSVIK et al., 2002).

2.3.3 “Fluorescent in situ hybridization” –FISH

Técnicas de hibridização fluorescente “*in situ*”–(FISH) tem sido bastante utilizadas para monitorar bactérias em diferentes ambientes. Nesta técnica faz-se uso de sondas de nucleotídeos espécie específica e observa-se a hibridização em microscópio de epifluorescência. Esta técnica é baseada no princípio da complementariedade de sequências de DNA de fita simples por sondas previamente desenhadas, tendenciando a formação de uma fita dupla. Estas sondas apresentam um fluoróforo que emitem sinal de fluorescência quando ocorre a hibridização e o DNA é submetido à excitação. Esta técnica tem sido utilizada para estudar desde populações de bactérias oxidantes de amônia na superfície de raiz de cultivares de arroz, até para avaliar a colonização em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas endofíticas (BRIONES Jr et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009a).

Com o objetivo de estudar a colonização por bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, Oliveira et al. (2009a) inocularam as estirpes bacterianas *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 113435), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366) individualizadas e em diferentes níveis de mistura. Através do uso de sondas para FISH, estes autores confirmaram uma maior agressividade de colonização das espécies de *Herbaspirillum* apresentando uma maior intensidade de sinal, além disso, estas bactérias ocupavam sítios diferentes indicando haver um efeito antagônico entre estas espécies. Sendo assim, *H. seropedicae* mostrou-se mais agressiva que *H. rubrisubalbicans*, indicando que pode ocorrer uma competição na colonização. Este fato também pode estar ocorrendo em relação a comunidade nativa das plantas de cana-de-açúcar em experimentos de inoculação em campo.

2.3.4 “Polimerase chain reaction”–PCR

A reação em cadeia da polimerase - PCR (“Polimerase Chain Reaction”), assim como a técnica de FISH baseia se no reconhecimento de uma determinada sequência de DNA, porém esta tem o propósito de aumentar exponencialmente o número de cópias de um determinado fragmento gênico. O produto desta reação é checado em géis de agarose ou poliacrilamida.

Um importante avanço na área de ecologia microbiana foi o uso da sequência do gene *rrs* que codifica para o rRNA 16S, e que pode ser utilizada para identificar microrganismos, inclusive em ambientes naturais, permitindo o desenvolvimento de técnicas independentes do cultivo para a análise da diversidade da comunidade (AMANN et al., 1995). O uso de iniciadores específicos para a região conservada do rDNA 16S permite, através da PCR, gerar

produtos com tamanho de fragmentos semelhantes, mas com sequências diferentes que podem variar em quantidade de GC.

2.3.5 “Denaturing gradient gel electrophoresis” –DGGE

A variabilidade da sequência pode ser analisada através de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) (MUYZER et al., 1993; TESKE et al., 1996). A DGGE utiliza géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear de agentes desnaturantes (uréia e formamida). Moléculas de DNA do mesmo tamanho, mas com sequências de nucleotídeos diferentes, apresentam comportamento eletroforético diferente quando expostas ao gradiente de agentes desnaturantes. O conteúdo de GC de um fragmento de DNA definirá a posição no gradiente em que o DNA de fita dupla irá se desnaturar. Essa técnica é uma ferramenta bastante útil para a realização de estudos ecológicos com microrganismos (ROSEMBAUM & RIESNER, 1987), desde que moléculas de DNA com sequências diferentes apresentem taxas de migração diferentes em géis desnaturantes. Esta técnica permite o agrupamento de indivíduos semelhantes presentes na comunidade microbiana.

Como qualquer outra técnica utilizada para estudo de comunidades microbianas no ambiente, há limitações para a análise de DGGE e que precisam ser levadas em consideração (CALLAGHAN et al., 2003). Algumas destas limitações não são específicas da técnica apesar de afetarem indiretamente as análises. O método de extração de DNA é uma delas, isso porque a análise de comunidades microbianas é baseada na extração de DNA de comunidades de amostras ambientais e é importante que o DNA recuperado seja representante do habitat. Para tanto é necessário atender a vários fatores, incluindo uma estratégia de amostragem adequada, apresentando um número eficiente de células a partir de amostras ambientais que represente a comunidade bacteriana presente, além de promover a lise eficiente das células (CALLAGHAN et al., 2003).

Eficiência de extração de DNA em relação tanto à quantidade e qualidade de DNA extraído pode variar entre as técnicas e tipos de solo, como encontrado em um estudo na Nova Zelândia (LLOYDJONES & HUNTER, 2001). Limitações referentes a etapa da PCR também podem ocorrer, como a amplificação preferencial ou seletiva por causa do reconhecimento ineficiente dos iniciadores como visto por Wintzingerode et al. (1997). Outras limitações são específicas para as análises de DGGE como a ocorrência de mais de uma banda representando uma espécie, enquanto o ideal seria uma espécie apresentar uma única banda. Por exemplo, foi descoberto que *Serratia entomophila*, uma bactéria comum do solo, encontrada na Nova Zelândia tem duas cópias do gene 16S (CALLAGHAN et al., 2003). Por outro lado, tem sido observado que linhagens intimamente relacionadas ou mesmo filogeneticamente independentes têm similar mobilidade eletroforética, resultando em banda de uma espécie que se confunde com a banda de outra espécie, ocorrendo a chamada co-migração de bandas. Isso pode levar a uma subestimação da real diversidade na comunidade.

A amplificação de regiões hipervariadas do rDNA 16S por PCR, e posterior análise por meio de DGGE, tem permitido a determinação da estrutura das comunidades microbianas em diferentes condições ambientais (HEUER & SMALLA, 1997; MACGREGOR, 1999). Essa metodologia permitiu detectar cianobactérias presentes em diferentes ecossistemas, inclusive ambientes extremos, tais como hipersalinos, desérticos, águas termais e polares (GARCIA-PICHEL et al., 2001; LÓPEZ-CORTÉS et al., 2001; NÜBEL et al., 1999; CHONG et al., 2009).

A técnica de DGGE também foi utilizada por Ferreira (2008) para avaliar a comunidade bacteriana endofítica em duas variedades de Arroz. O autor observou uma ampla ocorrência de bandas correspondentes a *Herbaspirillum seropedicae*, mesmo nos tratamentos que não foram inoculados com esta bactéria, sugerindo que esta bactéria tem grande

capacidade de colonizar a planta hospedeira. Este estudo também mostrou uma grande ocorrência de bandas diferentes dos padrões utilizados, o que sugere a colonização das plantas de arroz por diferentes espécies de bactérias.

A variação na diversidade de bactérias endofíticas em plantas de soja com e sem a aplicação de glifosato foi estudada por Kuklinsky-Sobral et al. (2005). Estes autores utilizaram a técnica de DGGE como uma ferramenta independente de cultivo e isolamento em meio de cultura. Foi observado por estes autores diferenças nos gêneros isolados ao comparar as duas técnicas. Os autores sugerem que isto pode ter ocorrido em função das fontes de nutrientes utilizados no meio de cultura, que podem ter favorecido grupos específicos, enquanto que na técnica de DGGE utilizou-se o DNA bacteriano total extraído diretamente do tecido das plantas, de forma a não beneficiar grupos de microrganismos.

A técnica de DGGE também permite analisar a diversidade de organismos que estão envolvidos em determinados processos, como a fixação biológica de nitrogênio. São os chamados grupos funcionais. Para realizar estas análises é necessário o uso de iniciadores baseados em genes envolvidos no processo da FBN. Como exemplo, Coelho et al. (2009) utilizaram esta técnica para estudar a diversidade do gene *nifH* na rizosfera das cultivares de sorgo BRS 308 e BRS 310 cultivadas sob diferentes doses de adubação nitrogenada (12 e 120 Kg N ha⁻¹) em solo de cerrado. Os autores observaram nos resultados de agrupamento que o nível de adubação nitrogenada influenciou a comunidade de diazotróficos apenas da cultivar BRS 308. Estes autores concluíram que existe uma influência da cultivar de sorgo e dos níveis de adubação nitrogenada sobre a comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio na rizosfera desta cultura.

2.3.6 PCR quantitativo ou PCR em tempo real

O PCR quantitativo (qPCR) ou PCR em tempo real é uma inovação resultante da PCR convencional e vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos. Essa técnica é baseada na emissão de compostos fluorescentes que geram um sinal que aumenta diretamente proporcional à quantidade do produto da PCR e permite o acompanhamento da reação e a obtenção dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação à PCR convencional, que apresenta somente resultados qualitativos (PIRES-ALVES & NOVAIS, 2004). Esta técnica é uma variação da PCR convencional que visa quantificar uma amostra de DNA ou RNA usando um iniciador (não necessariamente específico), determinando assim o número de cópias de uma determinada sequência de DNA ou RNA. Quando determinada sequência (DNA ou RNA) é abundante na amostra a amplificação é observada nos ciclos iniciais, se a sequência é rara, a amplificação é observada nos ciclos mais tardios (HEID et al., 1996).

O monitoramento da reação de PCR em tempo real aperfeiçoou o processo de quantificação de fragmentos de ácidos nucleicos (DNA e RNA). A qPCR realiza a quantificação destes ácidos nucleicos com precisão e maior reprodutibilidade, pois determina valores durante a fase exponencial da reação. O CT (*Cycle Threshold*) é a intersecção entre a curva de amplificação e uma linha limite. Ela é uma medida relativa da concentração de alvo na reação de PCR (Applied Biosystems). Este ponto possibilita a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta proporcionalmente a quantidade do produto da PCR. Sendo assim, os valores de fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado (LACAVA & AZEVEDO, 2008). Os compostos fluorescentes mais utilizados são o corante SYBR[®] Green e sondas TaqMan[®]. Esta técnica é muito sensível, possibilitando quantificar até 1 cópia μl^{-1} DNA extraído (BOECKMAN et al., 2000).

A técnica de qPCR foi desenvolvida buscando estimar o número de cópias de um gene de interesse (DOLKEN et al., 1998; HIGUCHI et al., 1993). Contudo, com o passar dos anos este método tem sido utilizado para identificar e quantificar bactérias de importância clínica como *Listeria monocytogenes* (BASSLER et al., 1995), *Yersinia pestis* (HIGGINS et al., 1998), *Mycobacterium tuberculosis* (DESJARDIN et al., 1998) e *Borrelia burgdoferi* (PAHL et al., 1999). Aplicando a técnica de qPCR, espécies de bactérias foram quantificados também em associação com plantas. A bactéria patogênica *Xylella fastidiosa* foi quantificada em amostras de citros (OLIVEIRA et al., 2002). Outras bactérias fitopatogênicas como, *Ralstonia solanacearum* (WELLER et al., 2000) e *Xanthomonas campestris* (CUBERO & GRAHAM, 2002) também tem sido quantificadas. A bactéria endofítica *Methylobacterium mesophilicum* foi monitorada e quantificada durante a sua colonização na planta *Catharanthus roseus* (LACAVA et al., 2006).

Lacava et al. (2006) desenharam sondas e iniciadores específicos para qPCR visando detectar e quantificar a bactéria endofítica *M. mesophilicum* em citros. Os iniciadores foram desenhados para a região intergênica do 16S rDNA. Os autores testaram os iniciadores em condições *in vitro* e com extrato de *C. roseus* cultivadas em casa-de-vegetação e inoculadas com 10^8 UFC de *X. fastidiosa* e *M. mesophilicum*. Segundo os autores, estes iniciadores não amplificaram outras espécies de *Methylobacterium* nem outras bactérias presentes endofiticamente nos citros, e detectaram *M. mesophilicum* no extrato de *C. roseus* aos 20 dias após a inoculação. Estes autores foram os pioneiros na detecção de bactérias endofíticas de laranja utilizando PCR quantitativo. Eles usaram iniciadores para quantificar *X. fastidiosa*, uma bactéria fitopatogênica, e observaram que quando co-inoculadas, a população das bactérias diminuía, evidenciando a importância das bactérias endofíticas na redução da população de patógenos.

Ruppel et al. (2006) desenharam iniciadores e sondas espécie - específicas para *Enterobacter radicincitans*, rizobactéria promotora do crescimento vegetal, e iniciadores gerais para células bacterianas totais. Os autores monitoraram e quantificaram, com emissão de “fingerprinting *on-line*” e qPCR a população desta bactéria associada a cultura da “couve” *Brassica oleracea*. Os autores inocularam *E. radicincitans* na couve nas concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 células por planta e observaram que a maior concentração proporcionou incremento significativo no crescimento das raízes, folhas e tubérculos. Os autores utilizaram PCR em tempo real para estimar a população bacteriana total e a população de *E. radicincitans*. Os mesmos observaram populações bacterianas totais entre 10^7 - 10^9 células por grama de tecido foliar fresco e próximo de 10^8 células por grama de raiz fresca. Para *E. radicincitans* os autores observaram uma colonização significativa das folhas e raízes das plantas de couve, prevalecendo as raízes com 10^7 células por grama de raiz fresca 14 dias após a inoculação. Os autores observaram ainda que o número de cópias do 16S rDNA de *E. radicincitans* corresponde próximo de 10-16% da comunidade bacteriana total. Os autores concluíram que a bactéria inoculada competiu com sucesso com a população bacteriana nativa.

Além de quantificar populações microbianas, a qPCR pode quantificar a expressão de genes microbianos, como por exemplo, ao comparar a atividade de oxidação de amônio presente em bactérias e em domínios *Archaea* em solos (LEININGER et al., 2006).

Em estudos de comunidades diazotróficas, a técnica de PCR em tempo real foi aplicada para determinar a abundância de sequências do gene *nifH* em ambientes marinhos e aquáticos e identificar padrões na distribuição vertical, temporal e sazonal dos filotipos deste gene (SHORT et al., 2005; CHURCH et al., 2005a; CHURCH et al., 2005b). Recentemente a técnica foi usada para quantificar sequências do gene *nifH* na rizosfera de sorgo (*Sorghum bicolor*) cultivada com dois níveis de adubação nitrogenada (COELHO et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimentos Conduzidos e Avaliados

3.1.1 Mapeamento da colonização endofítica das bactérias inoculadas em plantas de cana-de-açúcar

O experimento de inoculação com a variedade de cana-de-açúcar RB867515 foi instalado no campo experimental da Embrapa Agrobiologia - Seropédica – RJ em 2008. O desenho experimental utilizado foi de blocos ao acaso com 3 repetições. O experimento foi inoculado com uma mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas (Tabela 1), doravante denominado padrão. Essas estirpes foram crescidas separadamente e misturadas por ocasião do plantio. A inoculação foi realizada em toletes contendo três gemas imediatamente antes do plantio, através da imersão dos mesmos em um reservatório contendo o inoculante diluído (01 envelope contendo 250 g a uma concentração de 10^8 células por g de turfa para cada bactéria, totalizando cinco envelopes para 100 L de água) pelo período de 30 min.

Tabela 1: Espécies bacterianas inoculadas em cana-de-açúcar e seus respectivos meios de crescimento.

Espécies bacterianas	Estirpe	Meios de cultura	Referências
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	BR 11504	JNFB	DÖBEREINER et al. (1995)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BR 11335		
<i>Azospirillum amazonense</i>	BR 11115	LGI	MAGALHÃES et al. (1983)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	BR11281	LGI-P CALDO	DÖBEREINER et al. (1995)
<i>Burkholderia tropica</i>	BR 11366	JMV	BALDANI (1996)

3.1.2 Monitoramento das bactérias diazotróficas endofíticas correspondentes às inoculadas em cana-de-açúcar cultivadas nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul

Dois experimentos de inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas foram avaliados nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul. Os estados foram escolhidos em virtude da importância na área plantada com a cultura. O estado de São Paulo por ser o maior produtor nacional apresentando a maior área plantada, e Rio Grande do Sul por representar uma região de expansão com o cultivo da cana-de-açúcar.

Dois estratégias foram utilizadas para avaliar a população de bactérias diazotróficas endofíticas. A primeira consistiu em analisar amostras dos colmos das plantas de cana-de-açúcar diretamente do campo. A segunda estratégia consistiu em germinar os toletes em areia com vermiculita (2:1 v/v) autoclavada 2 vezes e aclimatadas em casa de vegetação por 45 a 60 dias. A segunda estratégia foi adotada a partir da segunda coleta de plantas cultivadas em campo, devido ter sido observado um número de bactérias diazotróficas endofíticas muito baixo na primeira coleta.

a) Experimento no estado de São Paulo

Experimento foi conduzido em condições de campo na cidade Sales Oliveira - São Paulo (latitude -20° 46' 12 ", longitude 47° 50' 26"). O delineamento experimental foi em

blocos ao acaso com quatro repetições em um Latossolo Vermelho. Foram utilizadas as variedades de cana-de-açúcar SP813250 e RB867515 submetidas aos tratamentos de inoculação ou adubação com 90 Kg N ha⁻¹, além de um tratamento controle. A escolha das variedades foi em virtude de serem as mais plantadas no estado, representando 13,06% e 23,66% respectivamente da área cultivada (RIDESA, 2011). A inoculação foi realizada com o inoculante doravante denominado padrão (Tabela 1). A inoculação foi realizada no tolete de plantio (três gemas) através da imersão dos mesmos em um reservatório contendo o inoculante diluído (1 envelope contendo 250 g a uma concentração de 10⁸ células por g de turfa para cada bactéria, totalizando cinco envelopes para 100 L de água) pelo período de 30 min. No tratamento controle os toletes foram submetidos à imersão apenas com turfa diluída em água, sem a presença das bactérias do inoculante.

As adubações fosfatada, potássica e com micronutrientes foram realizadas conforme a recomendação para a cultura e baseada nos resultados da análise de solo na Tabela 2.

Tabela 2: Análise da fertilidade do solo da área experimental na cidade Sales Oliveira - São Paulo.

Prof. cm	M.O. g/dm ³	pH	P mg/dm ³	K mg/dm ³	Ca mg/dm ³	Mg mg/dm ³	Al mg/dm ³	H+Al mmol _c /dm ³	S.B. mmol _c /dm ³	C.T.C. mmol _c /dm ³	V%	B mg/dm ³	Cu mg/dm ³	Fe mg/dm ³	Mn mg/dm ³	Zn mg/dm ³
0-20	37	5,2	11	40	25	8	-	35	34	69	48	0,14	3,5	13	6,2	0,3

b) Experimento no estado do Rio Grande do Sul

O experimento de inoculação foi conduzido na cidade de Jaguarí - Rio Grande do Sul (latitude -29° 28' 1.88 ", longitude 54° 44' 13.28") com a finalidade de comparar o estabelecimento das bactérias do inoculante em diferentes regiões do Brasil. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com três repetições em um Argissolo Vermelho. Foi utilizada a variedade de cana-de-açúcar RB867515 submetida aos tratamentos de inoculação ou adubação com 120 Kg N ha⁻¹, além de um tratamento controle. A inoculação foi realizada da mesma forma que no experimento anterior. Sendo feita adubação com fósforo, potássio e micronutrientes de acordo com a análise do solo na tabela 3 e recomendação da Comissão de Química e Fertilidade do Solo – RS/SC (2004).

Tabela 3: Análise da fertilidade do solo da área experimental na cidade Jaguarí - Rio grande do Sul.

Prof. Cm	M.O. g/dm ³	pH	P mg/dm ³	K mg/dm ³	índice SMP	Al mmol _c /dm ³
0-20	13	5,3	6,8	44	6,1	2

3.1.3 Confirmação do estabelecimento das bactérias diazotróficas componentes do inoculante nos tecidos de cana-de-açúcar através do uso de mutantes naturais resistentes a diferentes antibióticos

Estudos de inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas tem sido desenvolvidos no mundo. Porém, a confirmação do estabelecimento das bactérias, ou seja, se as bactérias detectadas são as mesmas utilizadas na inoculação, ainda é um questionamento sem resposta devido às limitações metodológicas para as condições de campo. Este estudo objetivou selecionar mutantes naturais resistentes a diferentes antibióticos na tentativa de buscar esta resposta e inferir mais precisamente sobre a confirmação do estabelecimento das bactérias utilizadas no inoculante da cana-de-açúcar.

Para monitorar as bactérias que foram efetivamente inoculadas nas plantas de cana-de-açúcar, foram realizados experimentos de indução de resistência natural dessas bactérias presentes no inoculante à diferentes antibióticos, visando quantificá-las nos tecidos das plantas utilizando os meios de cultivo acrescidos da pressão de seleção dos antibióticos.

a) Escolha de antibióticos para seleção bacteriana através da metodologia de concentração mínima inibitória (CMI)

Foi determinada a CMI dos antibióticos, estreptomicina, canamicina, ácido nalidíxico, tetraciclina, gentamicina, cloranfenicol e ampicilina para *H. rubrisubalbicans* (estirpe HCC103), *H. seropedicae* (estirpe HRC54) e *B. tropica* (estirpe Ppe8). Para as bactérias *G. diazotrophicus* (estirpe PAL5) e *A. amazonense* (estirpe CBamC) foi utilizado como referência o trabalho de Oliveira e colaboradores 2009b.

As bactérias *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103, *H. seropedicae* estirpe HRC54 e *B. tropica* estirpe Ppe8, foram pré-inoculadas em 5 mL de seus respectivos meios semi-seletivos descritos na Tabela 1 e incubadas a 30°C em agitador a 150 rpm por aproximadamente 16 horas. Em seguida foi inoculado 1µl do pré inoculo em placas de 96 poços do tipo ELISA fundo chato com o mesmo meio de cultivo do pré inoculo na presença de doses decrescentes e sucessivas dos antibióticos citados acima com o objetivo de se determinar a CMI em meio líquido para cada bactéria (Figura 1).

As concentrações de antibióticos utilizadas na microplaca foram de acordo com as estabelecidas para *Escherichia coli* (ANDREWS, 2001), fixando aproximadamente estas nas colunas centrais da microplaca. Os intervalos de concentração do antibiótico na microplaca, nas colunas 2–11 (Figura 1), foram: estreptomicina 2,0 a 1000 µg/mL, canamicina 5,9 a 3000 µg/mL, ácido nalidíxico 0,4 a 200 µg/mL, tetraciclina 0,4 a 200 µg/mL, gentamicina 1 a 500 µg/mL, cloranfenicol 1,0 a 500 µg/mL e ampicilina 5,9 a 3000 µg/mL. Foram utilizados um controle positivo que consistiu na aplicação do pré-inóculo no meio sem antibiótico e um controle negativo contendo apenas meio de cultura.

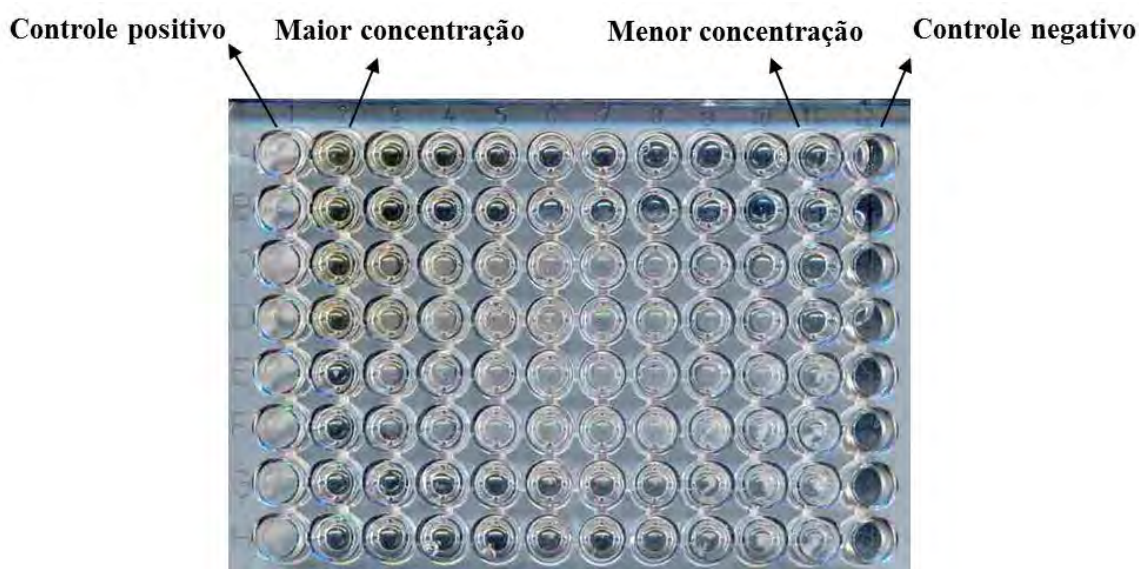


Figura 1: Microplaca utilizada na diluição dos antibióticos. As diluições de antibióticos foram realizadas nas colunas 2–11, na coluna 1 foi utilizado o controle positivo para crescimento bacteriano, na ausência de antibiótico e na coluna 12 foi utilizado o controle negativo, meio estéril sem inoculação.

As microplacas contendo os meios com e sem antibióticos foram inoculadas e mantidas sob agitação de 150 rpm a 30°C, durante uma noite. Após o crescimento bacteriano, a densidade ótica das culturas (D.O.₅₉₅) foi determinada em espectrofotômetro de microplacas iEMS (Labsystems). As médias dos valores de D.O.₅₉₅ obtidos foram plotadas em função das concentrações iniciais de antibiótico, após se descontar a média dos valores de D.O.₅₉₅ do meio estéril (coluna 12). A CMI foi considerada como sendo a menor concentração de antibiótico em que não houve crescimento da bactéria (OLIVEIRA et al., 2009b).

Baseado nos valores de CMI em meio líquido foram selecionados um antibiótico para cada estirpe bacteriana com a finalidade de aumentar a resistência bacteriana e obter mutantes naturais resistentes a antibiótico.

b) Obtenção de mutantes naturais resistentes a antibióticos por indução

A indução de mutações naturais resistentes aos antibióticos foi realizada através de repicagens sucessivas destas bactérias em meio de cultura com concentrações próximas a CMI. Os mutantes selecionados foram confirmados por repicagens sucessivas em meios semi-sólidos e sólidos específicos na presença do respectivo antibiótico (Figura 2). O crescimento bacteriano foi confirmado pela identificação de colônia e formação de película aerotática características em meio sólido e semi-sólido, respectivamente.

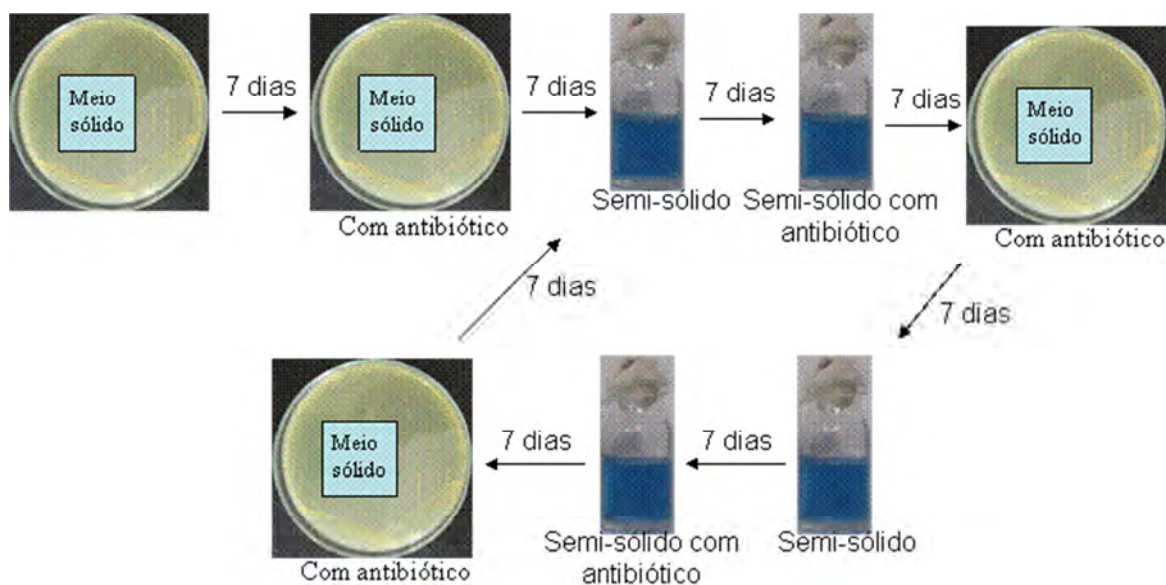


Figura 2: Obtenção de mutantes resistentes a antibióticos por repicagens sucessivas das bactérias em meios sólidos e semi-sólidos apresentando concentrações de antibióticos próximas a concentração mínima inibitória (CMI). Os meios utilizados foram específicos para cada estirpe bacteriana conforme tabela 1. * Processo repetido 4 vezes.

Os mutantes resistentes por indução foram estocados em glicerol 50%, glicerol 100% e em água para posterior experimento de inoculação.

c) Experimento de inoculação em casa de vegetação com mutantes espontâneos resistentes a diferentes antibióticos

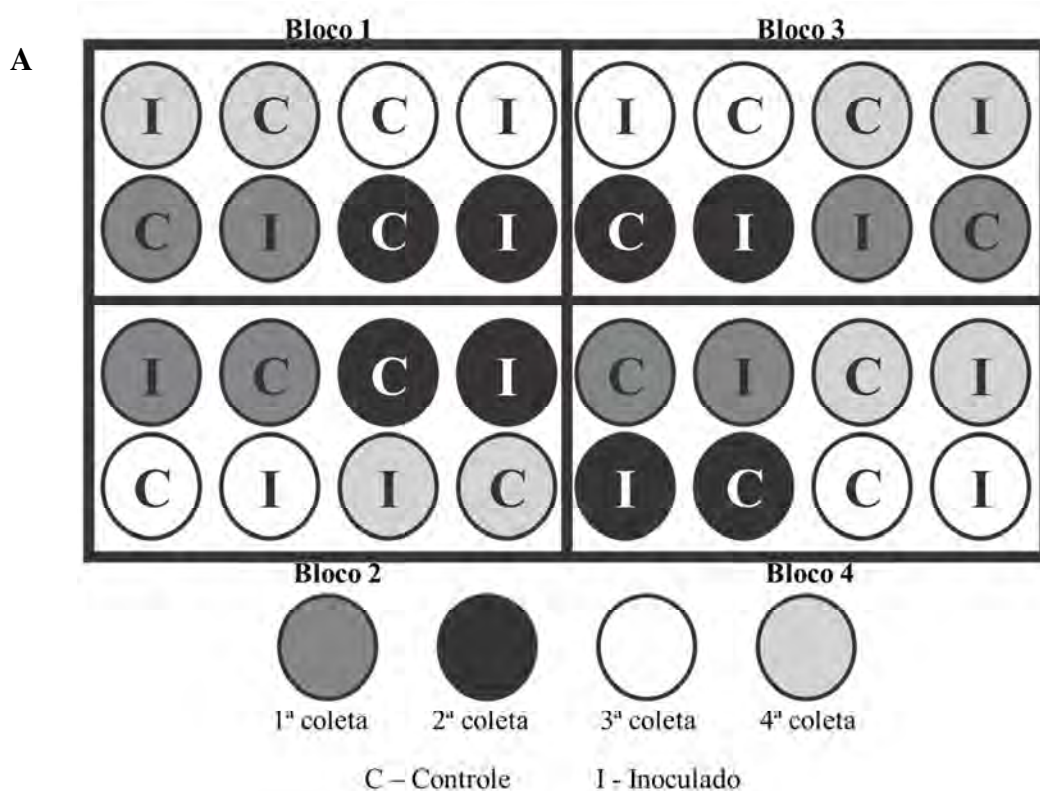
c.1) Preparo do inoculante

As 5 estirpes bacterianas selecionadas para crescimento em doses de antibióticos foram crescidas em seus respectivos meios de cultura na forma líquida a 30°C e 150 rpm até DO 1,2 a 600 nm conforme a metodologia padrão para o preparo do inoculante da Embrapa Agrobiologia para cana-de-açúcar. A população de bactérias foi de 10⁹ células por mL de cultura.

c.2) Inoculação, montagem do experimento, desenho experimental e manejo

A inoculação foi realizada com a mistura das cinco estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas resistentes a antibiótico diluídas para 10⁷ células bacterianas por mL de solução para cada estirpe em recipiente contendo água filtrada. Toletes de cana-de-açúcar (uma gema) da variedade RB867515 foram imersos por 1 hora no reservatório contendo o inoculante diluído. O tratamento controle consistiu da imersão de toletes em recipiente contendo apenas os meios de cultura diluídos em água. Os toletes foram plantados em vasos contendo 9 kg areia e vermiculita na proporção 2:1 v/v. O substrato foi autoclavado 2x antes da implantação do experimento.

O experimento foi montado em parcelas subdivididas contendo 4 blocos distribuídos ao acaso. As parcelas foram a variedade de cana-de-açúcar, as sub-parcelas as coletas e os tratamentos foram, controle (contendo apenas meio de cultura) e Inoculado (contendo a mistura do inoculante). Foi realizado um total de quatro coletas (Figura 3).



B

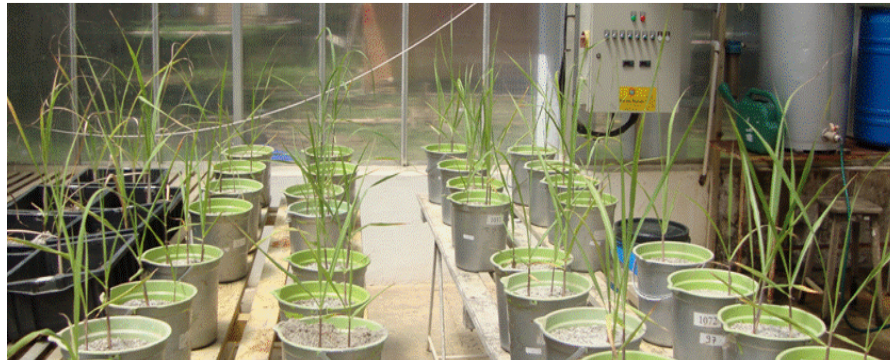


Figura 3: Experimento de inoculação com bactérias resistentes a antibióticos, implantado em casa de vegetação com o desenho experimental de parcelas subdivididas. A - Croqui do experimento, B – Foto do experimento em casa de vegetação aos 50 dias após o plantio (1ª coleta).

As plantas foram irrigadas com água autoclavada seguindo um intervalo de rega de dois dias com a finalidade de não submeter às plantas a stress hídrico. Após 30 dias, foi aplicada solução de Hoagland's (HOAGLAND e ARNON, 1950), duas vezes por semana com concentração de nutrientes reduzida dez vezes para suprir as necessidades nutricionais das plantas.

3.2 Métodos de Amostragem de Tecidos Vegetais

3.2.1 Mapeamento da colonização endofítica das bactérias inoculadas em plantas de cana-de-açúcar

Aos 11 meses após o plantio foram realizadas coletas de 5 gramas de tecido vegetal dos nós e entrenós 1, 2, 5, 9, 15, 21 e das folhas para estimar a população de bactérias diazotróficas endofíticas nos tecidos vegetais através da técnica de NMP e assim verificar qual região da planta que melhor represente a colonização pelas bactérias diazotróficas endofíticas.

3.2.2 Monitoramento das bactérias diazotróficas endofíticas correspondentes às inoculadas em cana-de-açúcar cultivadas nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul

As análises foram realizadas aos oito, doze e dezesseis meses após a implantação do canal para o experimento conduzido no estado de São Paulo e aos sete, nove e onze meses para o experimento conduzido no estado do Rio Grande do Sul. Foram coletados os entrenós da base, ápice e intermediários do colmo das plantas de cana-de-açúcar como definido no experimento de mapeamento. Foi realizada uma desinfestação superficial dos tecidos coletados com álcool 70% para eliminação da comunidade epífita possivelmente presente. Os toletes de cana foram então selados com parafina em suas extremidades para evitar a perda de seiva dos vasos condutores durante o transporte. Os mesmos foram transportados em isopor com gelo químico para manutenção de uma temperatura amena e conseqüentemente a viabilidade da comunidade endofítica até a realização da contagem pelo método do NMP (Figura 4).



Figura 4: Coleta e selagem “in situ” com parafina dos toletes de cana.

3.2.3 Confirmação do estabelecimento das bactérias diazotróficas componentes do inoculante nos tecidos de cana-de-açúcar através do uso de mutantes naturais resistentes a diferentes antibióticos

As coletas foram realizadas aos 50, 90, 120 e 150 dias após o plantio. Sendo processadas logo em seguida, não necessitando armazenamento em isopor com gelo químico.

3.3 Técnicas Utilizadas para o Monitoramento das Bactérias Diazotróficas Inoculadas em Plantas de Cana-de-Açúcar

3.3.1 Mapeamento da colonização endofítica das bactérias inoculadas em plantas de cana-de-açúcar

a) Contagem do número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar

A técnica do NMP foi usada segundo método descrito por Döbereiner et al. (1995) para estimativa do número de bactérias no material vegetal. O material vegetal coletado (nó, entre-nó e folha) foi lavado com água destilada e desinfestado com álcool 70%. Em seguida, a casca do colmo foi retirada e realizada nova desinfestação com álcool 70%. Foram triturados 5 g de tecido vegetal em 45 mL de solução salina, e 1 mL desta solução foi retirada, para a realização das diluições seriadas até 10^{-4} . Em seguida, 0,1 mL de cada diluição foi inoculada em frascos contendo 5 mL de meio semi-sólido (LGI, LGI-P caldo, JNFB e JMV) com 3 repetições (Tabela 1). A contagem das bactérias foi realizada após 7 dias de incubação a 30°C. Foram considerados positivos somente os frascos onde foi observada a película aerotática característica de crescimento de bactérias diazotróficas. A contagem da população de bactérias diazotróficas foi realizada utilizando a tabela de McCrady para três repetições por diluição (DÖBEREINER et al., 1995). As médias foram comparadas pelo teste Scott Knott em nível de 10% de significância utilizando o programa Sisvar versão 4.6.

As películas obtidas nos meios semi-sólidos foram coletadas com alça de platina e armazenadas em microtubos de 500 µl contendo 200 µl de água destilada estéril, mantidas a temperatura ambiente para análise posterior pela técnica de DGGE em géis de poli(acrilamida).

b) Localização em tecidos de cana-de-açúcar das bactérias diazotróficas endofíticas do inoculante pela técnica de DGGE

A técnica de DGGE foi utilizada buscando complementar os dados da localização das bactérias diazotróficas endofíticas pela técnica de NMP uma vez que os meios semi-sólidos são semi-específicos, e semi seletivos (como especificado no item 2.3.1).

b.1) Reação de amplificação (PCR-DGGE) usando os iniciadores 968FGC e 1401R para o gene 16S rDNA

As películas coletadas e armazenadas em água anteriormente foram submetidas à amplificação pela técnica de PCR utilizando os iniciadores para PCR-DGGE normalmente aplicados para análise da comunidade microbiana segundo Gelsomino et al. (1999). A reação de PCR foi constituída dos iniciadores 968F-GC e 1401R na concentração de 0,17 µM cada, tampão de reação (1X), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM cada), Taq DNA polimerase (2 U) e 1µL da solução de película em água para um volume final de 50 µL por reação. As sequências dos iniciadores estão listadas na Tabela 4. As condições da reação foram ajustadas a partir das descritas pelos autores acima citados: desnaturação inicial de 93°C por 5 min; seguida de 35 ciclos com 1 min a 94°C, 1 min a 61°C e 2 min a 72°C; seguidos de uma extensão final de 72°C por 5 min.

Tabela 4: Iniciadores utilizados nas reações de amplificação para análise por DGGE e respectivas sequências de nucleotídeos.

Iniciador	Sequência (5' – 3')
1401R	CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG
968FGC*	GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC

* Grampo de GC = CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG

b.2) Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação – DGGE

O produto de amplificação da reação de PCR foi aplicado em Gel de poliacrilamida (6%) com Gradiente de Desnaturação (DGGE) e submetido a corrente de 100 volts por 16 horas em uma cuba vertical contendo tampão TAE 0,5X conforme a metodologia descrita por Muyzer et al. (1996).

Para montagem do gel foi utilizado o sistema de eletroforese vertical (INGENYphorU – 2) com espaçador de 1,0 mm para 32 amostras. Os espaçadores e o pente foram limpos com álcool 92,8%. As placas de vidro foram lavadas (detergente e esponja macia) e passadas em água deionizada, seguidas de limpeza com etanol em abundância, secas com papel absorvente e montadas no sistema.

O gradiente químico de desnaturação utilizado para as análises em DGGE foi de 55% a 65% de uréia-formamida e com 6% de poliacrilamida. Foram preparadas duas soluções com menor e maior concentração de uréia-formamida com 6% de poliacrilamida para volume final de 48 mL para o gel de corrida. O gel concentrador com 8% de poliacrilamida ficou localizado na parte superior do gel, acima do gradiente para receber as amostras. Para formar o gradiente do gel desnaturante foi utilizado uma bomba peristáltica com fluxo aproximado de 2,2 mL/min.

Este sistema utiliza uma coluna de acrílico para misturar as soluções de uréia-formamida em gradiente da maior (65%) para a menor concentração (55%). Depois da polimerização do gel de corrida (aproximadamente 30 min) foi retirada toda a água depositada sobre o gel (com papel absorvente), e foi adicionado a solução de poliacrilamida sem agente desnaturante para a formação do gel concentrador com o auxílio de uma pipeta automática de

1 mL. O pente para 32 amostras foi colocado sobre esse gel concentrador. Após a polimerização do gel, o cassete (aparato contendo o gel) foi colocado na cuba de corrida contendo 17 litros de tampão TAE 0,5X pré-aquecido a 60°C.

Para aplicação das amostras foram utilizados os produtos de amplificação da reação de PCR das estirpes componentes do inoculante (BR 11335, BR 11504, BR 11115, BR11281, e BR 11366) e o produto de PCR obtido das películas armazenadas. Uma alíquota de 10 µl do produto amplificado de cada estirpe foi misturada a 2 µL da solução de corante (constituído por: 0,5% azul de bromofenol; 40% sacarose; 0,1 mol/L de EDTA; 5% de SDS) e aplicados nos poços do gel. O gel foi submetido a uma eletroforese vertical com voltagem de 100 V por 16 horas.

Após a eletroforese vertical o gel de DGGE foi submetido ao processo de coloração com nitrato de prata (AgNO₃) segundo a metodologia descrita por Creste e colaboradores (2001). O gel foi imerso em uma solução de fixação (Álcool etílico 10% + Ácido acético 1%) por 10 minutos, em seguida passou por uma lavagem com água destilada gelada durante 1 minuto. Em seguida, foi submetido a uma solução de pré-tratamento (1,5% Ácido nítrico), lavado novamente e submetido a solução de impregnação (2% AgNO₃) por 20 minutos, mantido no escuro. Foram então feitas duas lavagens de 30 segundos cada. A solução de revelação foi adicionada (Carbonato de sódio 3% + formaldeído 0,162%) e utilizada durante o tempo necessário para total visualização das bandas. A solução de bloqueio (5% Ácido acético) foi imediatamente aplicada após a revelação para evitar o escurecimento excessivo do gel. Foi realizada então a lavagem final com água gelada e o gel foi envolvido em papel celofane usando uma placa de vidro como suporte e mantido por aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente até a desidratação completa.

Uma vez desidratado, o gel foi escaneado a 200 dpi e analisado utilizando o software Gelcompar II, versão 3.1. Foi então gerado um Dendrograma de similaridade seguido pela matriz de presença e ausência de bandas conforme estabelecido pela plataforma do programa. Foi utilizado o coeficiente de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento foi o UPGMA (MUELLER-DOMBOIS & ELLEMBERG, 1974).

Os dados gerados pela matriz de ausência e presença de bandas foram contabilizados e tabulados para representar a ocorrência de bandas correspondentes às bactérias contidas no inoculante.

3.3.2 Monitoramento das bactérias diazotróficas endofíticas correspondentes às inoculadas em cana-de-açúcar cultivadas nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul

a) Contagem do Número mais provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas

Esta análise foi realizada conforme descrito no item 3.3.1.a.

b) Amplificação da sequência repetitiva BOX-PCR das bactérias inoculadas e *H. seropedicae*, estirpe ZAE94 (BR 11417)

Foi utilizado como molde o DNA extraído das bactérias *Gluconacetobacter diazotrophicus*, estirpe PAL5 (BR 11281); *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe HRC54 (BR 113435); *H. rubrisubalbicans*, estirpe HCC103 (BR 11504); *Azospirillum amazonense*, estirpe CBAmC (BR 11145); *Burkholderia tropica*, estirpe Ppe8 (BR 11366) e *H. seropedicae*, estirpe ZAE94 (BR 11417)

A análise genômica foi realizada usando-se o iniciador BOX A1R (5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (VERSALOVIC et al., 1994), conforme descrito por Kaschuk et al. (2006). Cada reação de amplificação com volume final de 25 µl foi

composta de 25 ng de DNA genômico; tampão 1X; Tween 20 0,05%; 3 mM de MgCl₂; 0,3 mM de cada dNTP; 1 U de *Taq* DNA polimerase e 2 μM do iniciador BOX A1R.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) com uma desnaturação inicial de 94°C por 7 min.; seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min; anelamento a 53°C por 1 min.; extensão a 65°C por 8 min.; e uma extensão final a 65 °C por 16 min. O produto amplificado foi verificado em gel de agarose 1% a 100 volts por 1 hora. Em seguida 12 μl do produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de acrilamida:bis-acrilamida 3% a 75 volts por 5,5 horas.

Após a eletroforese vertical, o gel foi submetido ao processo de coloração com nitrato de prata (AgNO₃) segundo a metodologia descrita por Creste et al. (2001). Foi realizada então a lavagem final com água destilada gelada, em seguida o gel foi envolvido em papel celofane usando uma placa de vidro como suporte e mantido por aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente até a completa desidratação.

c) Ajuste da técnica de PCR para detectar e quantificar por qPCR as bactérias inoculadas em cana-de-açúcar

Foram desenhados iniciadores espécie-específicos para as bactérias contidas no inoculante utilizado em cana-de-açúcar. Os iniciadores foram desenhados para regiões variáveis do 16S rDNA visando propiciar a diferenciação entre as bactérias inoculadas. As sequências do gene 16S rDNA dos membros da espécie *G. diazotrophicus*, *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *A. amazonense* e *B. tropica* obtidas a partir da base de dados GenBank foram alinhadas utilizando o programa ClustalX (THOMPSON et al., 1997), as regiões variáveis entre as espécies foram identificadas, em seguida, iniciadores espécie-específicos de oligonucleotídeos foram desenhados. Os iniciadores foram verificados por PCR virtual utilizando o programa “Vector Nti” com configurações padrão. A especificidade e otimização dos conjuntos de iniciadores foram avaliados utilizando Blast ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov / Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) e o banco de dados para sondas 16S probe check (<http://131.130.66.200/cgi-bin/probecheck/probecheck.pl>).

A reação de PCR foi constituída dos iniciadores indicados na Tabela 5, na concentração de 0,2 μM cada, tampão de reação (1X), MgCl₂ (3,0 mM), dNTPs (0,2 mM cada), *Taq* DNA polimerase (1 U) e 50 ng de DNA para um volume final de 25 μL por reação. As condições da reação foram: desnaturação inicial de 96°C por 5 min; seguida de 39 ciclos com 1 min a 95°C, 45 segundos a 58°C e 45 segundos a 72°C; seguidos de uma extensão final de 72°C por 5 min.

Foram realizados ajustes nas concentrações de MgCl₂, dos iniciadores e na temperatura de anelamento, assim como no tempo de anelamento. As concentrações de MgCl₂ foram reduzidas para 2,5; 2,0 e 1,5 mM. As concentrações dos iniciadores foram ajustadas para 0,12 μM e a temperatura de anelamento foi testada até a 65°C, enquanto o tempo chegou a ser reduzido para 10 segundos. Foram definidas as melhores condições individualmente para cada par de iniciadores verificando a amplificação sem formação de produto inespecífico na reação. Todos os ajustes de reação foram realizados nas reações de PCR convencional. Posteriormente foi realizado a quantificação por qPCR do DNA extraído das plantas de cana-de-açúcar dos experimentos conduzidos nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul.

Tabela 5: Iniciadores para localizar e quantificar bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar. Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*.

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Fragmento amplificado(pb)
<i>GdPAL5f</i>	GGCTTAGCCCCTCAGTGTCG	189
<i>GdPAL5r</i>	GAAACAGCCATCTCTGACTGC	
<i>GdPAL5f1</i>	GATGTTGGGTGGCTTAGCCCC	
<i>GdPAL5r1</i>	ACAGCCATCTCTGACTGCAGC	
<i>GdPAL5f2</i>	GGCTGCAGTCAGAGATGGCTG	300
<i>GdPAL5r2</i>	CGATTCCACCTTCATGCACTC	
<i>AaCBAmCF</i>	CCGGATGGCCGTGGAGACTGACCG	219
<i>AaCBAmCR</i>	GGCATTGCTGGATCAGGGTTGCC	
<i>Hs1Zae94f</i>	AGGGAAGAAGTTTGGCTAAT	171
<i>Hs1Zae94r</i>	GTAATTCCGATTAACGCTTG	
<i>Hs2Zae94f1</i>	TTTGTCAGGGAAGAAGTTTG	107
<i>Hs2Zae94r1</i>	CTTGCACCCTACGTATTACC	
<i>Hs3HRC54 f</i>	CGGTTTTGGCTAATATCCAG	296
<i>Hs3HRC54 r</i>	AGTGTTATCCCAGGGGCTGC	
<i>Hs4HRC54f2</i>	CTAATACCGCATACGATCTAC	307
<i>Hs4HRC54r2</i>	TTCTGGATATTAGCCAAAACC	
<i>Hr1HCC103f1</i>	CGGTGGTAGCTAATATCTACT	300
<i>Hr1HCC103r1</i>	CAGTGTTATCCCAGGGGGCTG	
<i>Hr2HCC103f2</i>	GGTCGGAATCCTGAAGAG	327
<i>Hr2HCC103r2</i>	GTAGTCGAGTTGCAGACTAC	
<i>Bt1Ppe8f</i>	GAATTCGCTGAGAGGTGGAAG	249
<i>Bt1Ppe8r</i>	CTCTGTTCCGACCATTGTATG	
<i>Bt2Ppe8f1</i>	GGAATTCGCTGAGAGGTGGA	260
<i>Bt2Ppe8r1</i>	GGCTTGGCAACCCTCTGTTCC	

c.1) Especificidade e limite de detecção dos iniciadores selecionados

Um par de iniciadores para cada espécie microbiana foi selecionado. Os iniciadores selecionados para cada espécie bacteriana inoculada em cana-de-açúcar foram testados com o DNA de outras espécies bacterianas: estirpe TVV75 de *B. vietnamiensi*, M130 de *B. kururiensi*, KP23 de *B. kururiensi*, SRMrh-20 de *B. silvatlântica*, GSF30 de *H. frisingense*, Sp59 de *A. lipoferum*, Sp245 *A. brasiliensi*, Sp7 de *A. brasiliensi*, Y2 de *A. amazonense* e PAL3 de *G. diazotrophicus*. As respectivas origens de isolamento destas bactérias e das bactérias do inoculante encontram-se listadas na Tabela 8.

Os limites de detecção foram determinados com o produto de PCR amplificado com os iniciadores 27F e AMP2 utilizando como molde o DNA da estirpe PAL 5 de *G. diazotrophicus*, HCC 103 de *H. rubrisubalbicans*, HRC54 de *H. seropedicae*, CBamC de *A. amazonense* e Ppe8 de *B. tropica*. Os produtos amplificados foram purificados com kit Wizard SV Gel and PCR cloning kit (Promega®) e ajustados para as concentrações de $10^2 - 10^{-10}$ ng μl^{-1} para a realização de “nested-PCR” utilizando os iniciadores específicos.

c.2) Curva padrão para qPCR

A curva padrão foi gerada através da representação gráfica das diluições seriadas do produto de PCR convencional purificado, utilizando os iniciadores 27F e AMP2 do DNA extraído de *G. diazotrophicus* (estirpe PAL 5), *H. rubrisubalbicans* (estirpe HCC103), *H.*

seropedicae (estirpe HRC54), *A. amazonense* (estirpe CBamC), *B. tropica* (estirpe Ppe8) contra os valores de CT obtidos no qPCR. O produto obtido na primeira PCR (convencional) foi purificado com kit wizard e diluído seriadamente de $10^2 - 10^{10}$ correspondendo de $100 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ a $0,0000000001 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$.

Análises por PCR em tempo real foram realizadas em “7500 fast real timer PCR system” utilizando o “SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems). Foi utilizada uma placa de microtitulação de 96 poços contendo por poço: $7,5 \mu\text{l}$ de SYBR Green PCR Mix Master, 200 nmoles de cada iniciador, $5,0 \mu\text{l}$ de DNA diluído 1:10 e volume final de $15 \mu\text{l}$. A reação foi realizada utilizando o programa 7500 v 2.0.5 nas condições seguintes: 2 min a 95°C , seguido por 40 ciclos de 20 s, a 95°C e 30 s, a 63°C . Gerando a curva da concentração de DNA conhecida versus os valores de CT obtidos no qPCR.

A eficiência de amplificação foi calculada utilizando a fórmula: $E = 10^{(-1/\text{slope}) - 1}$.

A reação foi realizada com as amostras em triplicatas, e os produtos amplificados por qPCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% submetidos a 100 volts por 80 minutos e visualizado em transiluminador após coloração com brometo de etídio.

c.3) Determinação da curva padrão para quantificação do número de cópias do gene 16S das bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em plantas de cana-de-açúcar por qPCR

A massa molecular do fragmento de DNA de 1512 pb do 16S rDNA das bactérias do inoculante foi utilizada para converter a sua concentração em número de cópias de genes. A massa molecular foi calculada usando o número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ cópia DNA mol^{-1}), utilizando a equação a seguir, tal como recomendado pela Applied Biosystems®, e em seguida convertido para o número de cópias do gene. Estes valores foram utilizados para calcular o número de bactérias de *G. diazotrophicus* presente nos tecidos da planta e também utilizados para determinar o limite de detecção do qPCR. Para as demais bactérias foram calculados o número de cópias uma vez que os seus genomas ainda não foram sequenciados.

Equação 1:

$$m = \left[n \right] \left[\frac{1 \text{ mole}}{6.023e23 \text{ molecules (bp)}} \right] \left[\frac{660 \text{ g}}{\text{mole}} \right] = \left[n \right] \left[\frac{1.096e-21 \text{ g}}{\text{bp}} \right]$$

$$m = \left[\frac{1512 \text{ bp}}{1} \right] \left[\frac{1.096e-21 \text{ g}}{\text{bp}} \right]$$

$$m = 1,66e^{-18} \text{ g} = 1,66e^{-9} \text{ ng}$$

$$\frac{1,66e^{-9} \text{ ng}}{0,5 \text{ ng}} = \frac{1 \text{ fragmento 16S}}{x}$$

$$X = 3,02 \times 10^8 \text{ cópias}$$

Onde:

n = 16S DNA tamanho (pb)

m = massa

Número de Avogadro = $6.023e^{23}$ moléculas 1 mole^{-1}

Média MW de uma dupla fita de uma molécula de DNA = 660 gmole^{-1}

Reações de qPCR foram realizadas com o DNA extraído de plantas de cana-de-açúcar coletadas nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, e os valores de CT obtidos foram substituídos nas curvas para inferência do número de cópias. Para estimar o número de cópias por grama de planta os respectivos números de cópias foram multiplicados por 5 pois o DNA

foi extraído de 200 mg de material vegetal, em seguida os valores foram multiplicados por 50 porque o DNA extraído dos tecidos vegetais foram diluídos em 50 µl de água ultra Pura.

Assim, foi possível estimar o número de cópias para cada uma das bactérias diazotróficas inoculadas nas plantas de cana.

c.4) Determinação da curva padrão para a quantificação do número de células da bactéria *G. diazotrophicus* por qPCR

A bactéria *G. diazotrophicus* tem o seu genoma sequenciado e devidamente anotado (BERTALAN et al., 2010). Logo, sabe-se o número de cópias do gene 16S presente no genoma desta bactéria, que permitiu gerar a curva para estimar o número de células.

O número de cópias do gene 16S rDNA no genoma de *G. diazotrophicus* e a sua massa molecular foi utilizado para converter a concentração de 1512 pb do 16S rDNA em número de células bacterianas. A massa molecular foi calculada usando o número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ cópia DNA mol⁻¹), utilizando a equação 1, tal como recomendado pela Applied Biosystems®, e em seguida convertido para o número de cópias do gene. Estes valores foram utilizados para calcular o número de bactérias presentes nos tecidos da planta e também utilizados para determinar o limite de detecção do qPCR.

$$X = 3,02e^8 \text{ copies}$$

$$X = 3,02e^8 \text{ copy} \times 4 = 1,21e^9 \text{ bactérias}$$

Obs: Cada genoma bacteriano de *G. diazotrophicus* tem quatro cópias do gene 16S rDNA

A curva padrão (Número de bactérias vs CT) foi construída através da representação gráfica do número de bactérias (calculado como descrito anteriormente), contida em concentrações conhecidas do rDNA 16S de *G. diazotrophicus* (estirpe PAL5), previamente amplificado a partir do DNA total desta, com os iniciadores 27F e AMP2 e diluídas em série a partir de 10^0 até 10^{-6} , o que corresponde de 0,5 ng a 5×10^{-7} ng de DNA 16S, contra o CT (Cycle Threshold) obtidos pelo método de qPCR.

c.5) Detecção e quantificação de *G. diazotrophicus* em cana-de-açúcar inoculada com o inoculante de bactérias diazotróficas endofíticas e cultivadas nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul

As análises foram realizadas aos sete e onze meses após o plantio para as amostras provenientes do Rio Grande do Sul e aos oito e doze meses para as amostras de São Paulo. Foram coletados 4 entrenós da base até o ápice do colmo das plantas de cana-de-açúcar como definido em experimento prévio. Um experimento piloto evidenciou que a população de bactérias diazotróficas endofíticas presentes no nó e entrenó não diferem estatisticamente. Foi realizada uma desinfestação superficial dos tecidos coletados com álcool 70% para eliminação da comunidade epífita possivelmente presente.

Os entrenós coletados foram macerados em N líquido e 200 mg do pó fino obtido foi utilizado para extração de DNA total pelo protocolo que utiliza CTAB segundo Doyle & Doyle, 1987). O DNA extraído foi quantificado a 260 nm em Nanodrop® Spectrophotometer ND 1000c, ajustando a concentração para 40 ng µL⁻¹. A pureza foi verificada pela razão dos comprimentos de onda 260/280 nm utilizando o mesmo equipamento.

Estes DNAs foram usados para as reações de qPCR. Os valores de CTs obtidos a partir das amostras de plantas amplificados por qPCR foi usado para determinar a quantidade de células bacterianas de *G. diazotrophicus* presentes em amostras de plantas utilizando a equação padrão 2: $y = 3,3917x + 39,935$, em que "y" corresponde ao CT da amostra e "x" é o Log₁₀ do número de bactérias. O DNA extraído dos tecidos vegetais foram utilizados nas

reações de qPCR utilizando os iniciadores espécie - específicos para as demais espécies bacterianas, porém, para estas últimas foi possível estimar apenas o número de cópias.

d) Diversidade do gene *nifH* em variedades de cana-de-açúcar utilizando a técnica de “nested-PCR” e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE

d.1) Reação de amplificação (PCR-DGGE) usando os iniciadores para *nifH*

O DNA extraído do entrenó das plantas de cana-de-açúcar para realizar o monitoramento das bactérias diazotróficas endofíticas foi utilizado para estudar a diversidade de diazotróficos utilizando-se os iniciadores específicos para o gene *nifH*. A reação de PCR foi realizada utilizando os iniciadores PolF/PolR segundo POLY et al. (2001).

A técnica de “nested-PCR” foi utilizada com os iniciadores *nifHF* e *nifHR* desenhados por SOARES et al., (2006) (Tabela 6).

Tabela 6: Iniciadores utilizados para o gene *nifH* nas reações de amplificação para análise por DGGE e respectivas sequências de nucleotídeos

Iniciadores	Reação	Sequência 5' – 3'	Referência
PolF	1 ^a	TGC GAY CCS AAR GCB GAC TC	Poly et al. (2001)
PolR		ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA	
<i>nifHF</i> *	2 ^a	ACCCGCCTGATCCTGCACGCCAAG G	SOARES et al., (2006)
<i>nifHR</i>		ACGATGTAGATTTCTGGGCCTTGT T	

R = A/G; N = A/G/C/T; H = T/C/A; Y = C/T; S = G/C.

* Grampode GC = CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCGCCCC.

A primeira reação foi realizada para um volume final de 25 µL contendo 1 µM de cada iniciador, tampão de reação (1X), MgCl₂ (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM cada), Taq DNA polimerase (2,5 U) e DNA (80-100 ng). Para a segunda reação foi utilizado 1 µL do produto da reação anterior e as mesmas concentrações dos reagentes. As condições das reações foram: desnaturação inicial de 94°C por 5 min; seguida de 30 ciclos com 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 55°C e 45 segundos a 72°C; seguidos de uma extensão final de 72°C por 5 min (SOARES et al., 2006).

d.2) Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturação - DGGE

A diversidade das bactérias diazotróficas foi estudada utilizando o produto de amplificação da segunda reação em gel de DGGE como descrito no item 3.3.1.b, alterando a porcentagem de poli-acrilamida para 8% e a eletroforese para 75V por 15 horas.

3.3.3 Confirmação do estabelecimento das bactérias diazotróficas componentes do inoculante nos tecidos de cana-de-açúcar através do uso de mutantes naturais resistentes a diferentes antibióticos

A análise do NMP foi realizada conforme descrito no item 3.3.1.a com e sem adição de antibiótico nos meios de cultura.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Mapeamento da Colonização Endofítica por Bactérias Inoculadas em Plantas de Cana-de-Açúcar

4.1.1 Contagem do número de bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar pela técnica do número mais provável (NMP)

Para quantificar as bactérias diazotróficas endofíticas foi utilizada a técnica do NMP com meios semi-seletivos.

A contagem da população de bactérias diazotróficas endofíticas em meios semi-sólidos semi-específicos JNFB, LGI, LGI-P caldo e JMV evidenciaram população bacteriana presente nos tecidos amostrados, variando de 10^1 a 10^4 células por grama de tecido fresco conforme mostrado na Figura 5. O reduzido número de bactérias encontrado pode ser devido à idade das plantas (11 meses), já que outros autores utilizando a mesma técnica observaram uma diminuição da população de bactérias diazotróficas endofíticas no final do ciclo da cana-de-açúcar (REIS JÚNIOR et al., 2000; GOMES et al., 2005).

Gomes (2002) observou maiores populações de *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* até os 180 dias após o plantio em diferentes genótipos de cana-de-açúcar em várias partes da planta. A população de *G. diazotrophicus* na parte aérea variou de 10^2 a 10^4 células por grama de tecido fresco e não acompanhou o crescimento da planta, decaindo com a proximidade do final do ciclo. Por outro lado, a população de *Herbaspirillum* spp. apresentou-se mais estável no decorrer do ciclo da cultura.

Reis Júnior et al. (2000) também observaram uma redução na população de *G. diazotrophicus* na base do colmo de plantas de cana-de-açúcar maior que 10 vezes entre o sétimo e o décimo quinto mês após o plantio, contudo as populações de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* permaneceram estáveis ou aumentaram com o fim do ciclo.

Trabalho desenvolvido por Munoz-Rojas e Caballero-Mellado (2003) obtiveram resultados similares onde observaram um declínio populacional da estirpe de *G. diazotrophicus* inoculada em diferentes variedades de cana-de-açúcar com a idade da planta, independente da variedade, genótipo ou da estirpe bacteriana.

Esses resultados sugerem que não se deve descartar a existência de competição entre as espécies inoculadas como observado por Oliveira et al. (2009b) além da competição existente com a própria comunidade bacteriana nativa.

A população de *A. amazonense* decaiu com a aproximação do ápice da planta e foi encontrada em maior número no entrenó 1 com um número aproximado de 10^4 células por grama de tecido fresco (Figura 5). Ainda na Figura 5, observa-se que a população de *B. tropica* foi detectada em maior número, chegando próximo a 10^5 células por grama de tecido fresco, mas, também foi menor nas folhas.

A análise dos dados presentes na Figura 5 mostra que não existe diferença estatística na população de bactérias diazotróficas endofíticas na arquitetura da planta. As regiões do nó e entrenó parecem representar melhor a colonização das cinco espécies utilizadas no inoculante, porém não apresentaram diferença estatística. Não foi observada diferença entre a população presente no nó e no entrenó. Sendo assim, foi definido que a estratégia de coleta para análises futuras constituir-se-ia em uma amostragem composta com os entrenós da base, ápice e intermediários. Buscou-se fazer uma amostragem homogênea na planta inteira para realizar as análises moleculares e microbiológicas visando identificar as bactérias presentes nos tecidos. O entrenó foi definido como a região para os estudos programados, dado a maior facilidade de manipulação deste material vegetal durante a maceração.

Experimento de Mapeamento

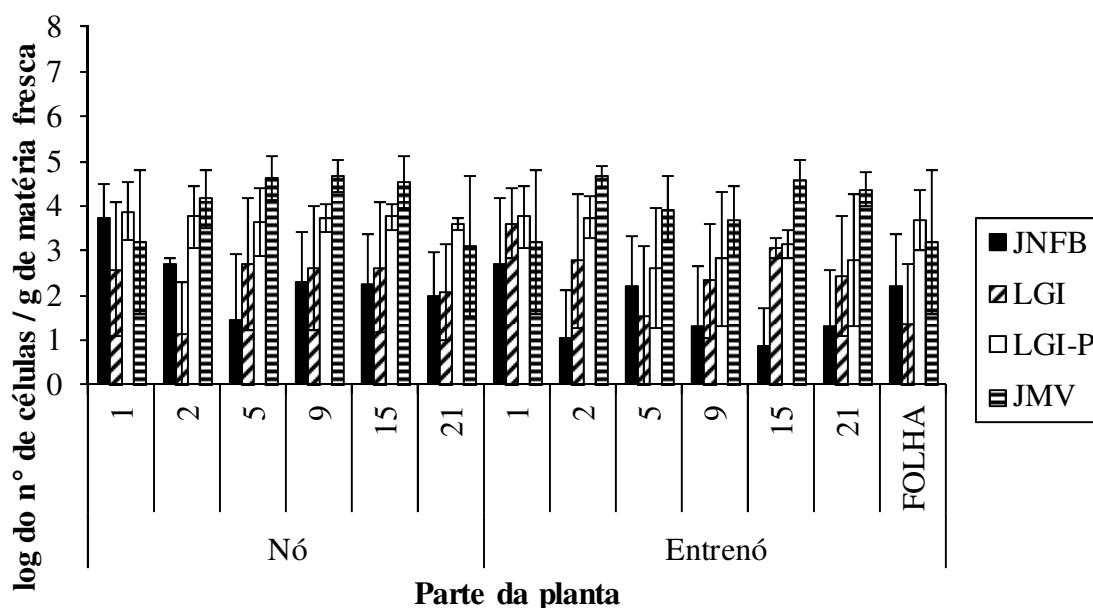


Figura 5: Número de bactérias diazotróficas cultivadas nos meios de cultivo JNFB, LGI, LGI-P caldo e JMV presentes nas diferentes regiões do colmo e folha de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515, inoculada com bactérias diazotróficas endofíticas. Dados médios de 3 repetições; Os números 1, 2, 5, 9, 15 e 21 correspondem a posição ascendente do nó ou entrenó coletados dos colmos das plantas de cana-de-açúcar.

* As médias não diferiram estatisticamente pelo teste Scott Knott a 10% de significância. Barras verticais representam o erro padrão da média.

4.1.2 Localização das bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas em cana-de-açúcar pela técnica de DGGE

A película aerotática presente nos meios semi-sólidos provenientes das amostras correspondentes aos entrenós 1 e 2 foi amplificada pela técnica de PCR utilizando iniciadores para a região 16S rDNA. Como pode ser observado na Figura 6, a amplificação direta da película foi realizada, gerando um produto de aproximadamente 430 pares de bases e sem a presença de produtos inespecíficos. Porém, a fraca intensidade das bandas no gel de agarose para a maioria das amostras sugere uma amplificação insuficiente para as análises em DGGE. Sendo assim, 20 μ l das amostras de películas armazenadas em água foram inoculadas em 5 mL de meio DYG'S (RODRIGUES NETO et al., 1986) por 16 horas a 30° C sob uma agitação de 150 rpm. Foi realizada nova reação de PCR utilizando 1 μ l da cultura crescida em meio DYG'S. A nova reação de PCR apresentou um produto de 430 pb mais intenso e sem a presença de produtos inespecíficos como observado na Figura 7. Este método difere do habitual, onde geralmente realiza-se a extração de DNA antes de se proceder com a reação de PCR.



Figura 6: Eletroforese em gel de agarose (1%) referente ao produto de amplificação da reação de PCR utilizando películas das bactérias presentes nos meios de cultivo semi-sólido e armazenadas em água. Meios de cultura utilizados para o NMP: JNFB, LGI, LGI-P CALDO e JMV.



Figura 7: Eletroforese em gel de agarose (1%) referente ao produto de amplificação da reação de PCR utilizando a cultura em meio DYG'S das amostras da figura anterior. Meios de cultura utilizados para o NMP: JNFB, LGI, LGI-P CALDO e JMV.

Os produtos gerados pelas reações de PCR foram submetidos à técnica de DGGE que permitiu verificar a ocorrência de bandas correspondentes em altura a *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* e *A. amazonense* (Figura 8).

Visando quantificar a frequência de ocorrência destas bactérias nas amostras analisadas montou-se uma tabela baseada na matriz binária de ausência e presença de bandas que mostra uma maior ocorrência de *H. seropedicae* (46,6%) seguida de *A. amazonense* (36,6%) e *H. rubrisubalbicans* (16,6%) (Tabela 7). Além das bandas correspondentes as bactérias do inoculante, observa-se também bandas em outras alturas, o que reforça a semi-especificidade dos meios de cultura.

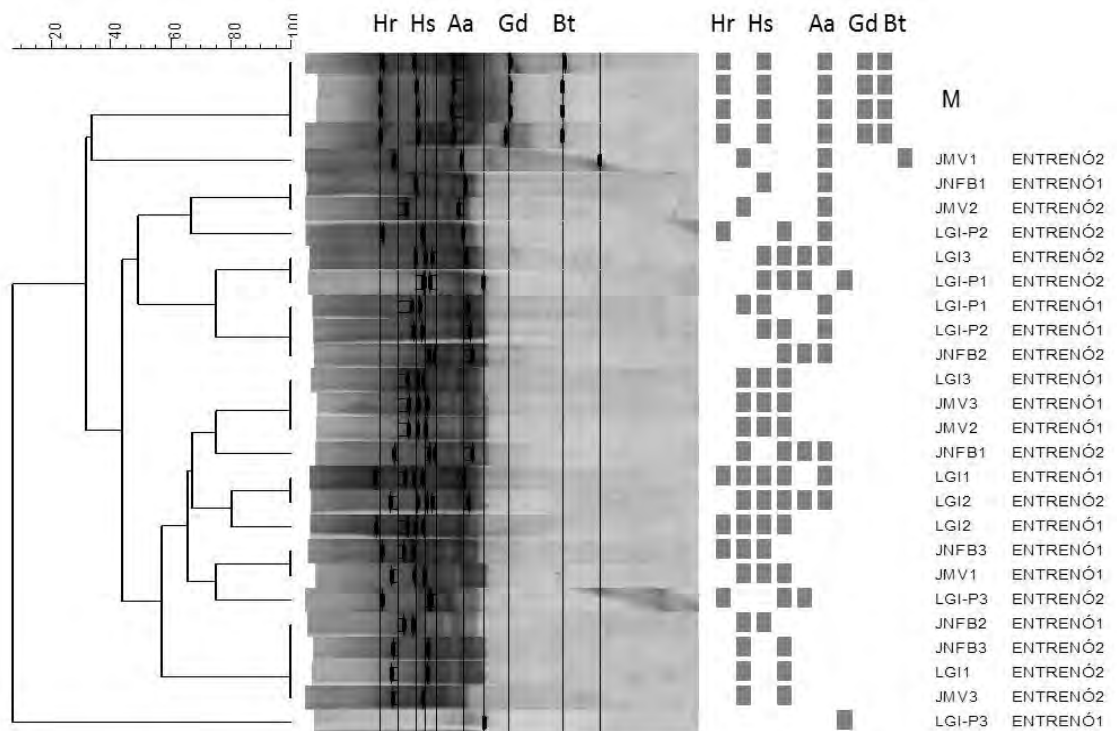


Figura 8: Dendrograma de similaridade (UPGMA) obtido a partir da análise do gel de DGGE com o programa GelCompar II, seguido do Gel de poliacrilamida em posição horizontal e pela matriz binária de ausência e presença de bandas. Foi analisada a similaridade pelo Coeficiente de Jaccard $\{(Tol\ 1,3\% - 1,3\%) (H > 0\%, S > 0\%) [0\% - 100\%]\}$. M – Marcadores contendo as cinco bactérias utilizadas no inoculante padrão: Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*. JNFB, LGI, LGI-P CALDO e JMV foram os meios de cultura utilizados para coletar as películas.

Tabela 7: Número de bandas contabilizadas a partir da matriz binária de ausência e presença de bandas na **Figura 8**, indicando a porcentagem de bandas correspondentes às bactérias do inoculante e a porcentagem de amostras que apresentaram as bandas correspondentes às bactérias do inoculante.

Bactérias	Nº de Bandas	(%) Bandas	(%) Amostras
<i>H. rubrisubalbicans</i>	5	16,6	20,8
<i>H. seropedicae</i>	14	46,6	58,3
<i>A. amazonense</i>	11	36,6	45,83
<i>G. diazotrophicus</i>	0	0	0
<i>B. tropica</i>	0	0	0

*Bandas correspondente às bactérias do Inoculante

4.2 Monitoramento das Bactérias Diazotróficas Endofíticas Correspondentes às Inoculadas em Cana-de-açúcar Cultivada nos Estado de São Paulo e Rio Grande do Sul

4.2.1 Quantificação da população de bactérias diazotróficas pelo método do número mais provável (NMP)

4.2.1.1 Material vegetal direto do campo

a) Experimento conduzido no estado de São Paulo

A população de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar inoculadas, adubadas com adubo nitrogenado e plantas controle foi estimada pelo método do número mais provável. Foram utilizados os meios semi-sólidos e semi seletivos JNFB para *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, LGI para *A. amazonense*, LGI-P caldo para *G. diazotrophicus* e, JMV para *B. tropicalis*.

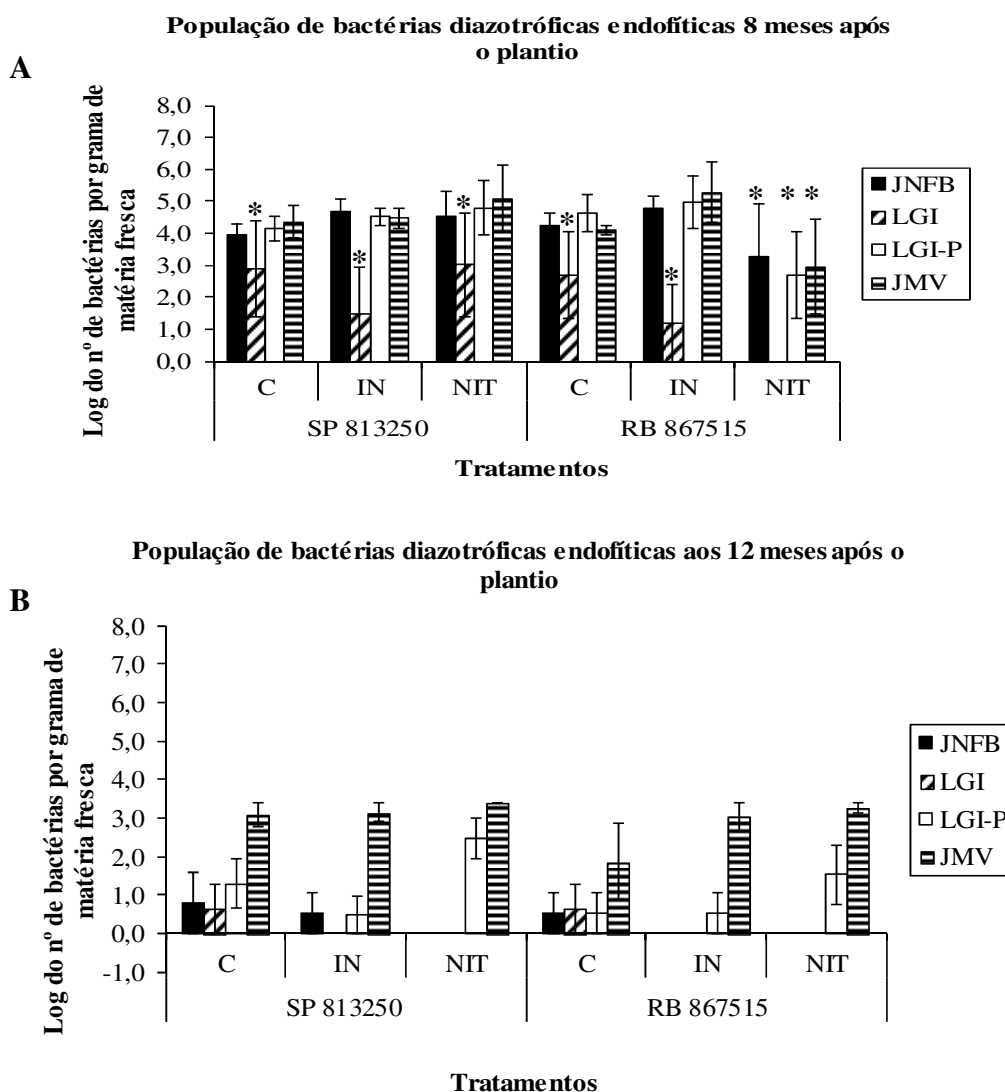


Figura 9: Logaritmo do número de células de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de tecido fresco da base do colmo de plantas de cana-de-açúcar. Variedades SP813250 e RB867515. C – Controle, IN – Inoculado, NIT – Nitrogenado. Dados médios de 3 repetições. Meios de cultivo utilizados JNFB, LGI, LGI-P caldo e JMV.

*Médias diferem estatisticamente pelo teste Scott Knott a 10% de significância. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Foi observada uma baixa população de bactérias diazotróficas endofíticas para todos os meios utilizados, variando de não detectada a 10^5 células por grama de tecido fresco (Figura 9A). Ainda na Figura 9A não se observa diferença estatística para a variedade SP813250, enquanto que para a variedade RB867515 o tratamento nitrogenado proporcionou uma diminuição significativa na população de bactérias diazotróficas endofíticas. Diminuição na população de bactérias diazotróficas endofíticas decorrente do uso de adubos nitrogenados foi observada em canaviais no México e na Índia (FUENTES-RAMÍRES et al., 1993, 1999; MUTHUKUMARASAMY, 1999). No Brasil, Reis Júnior et al. (2000) observou que doses de 300 kg N ha^{-1} (superiores das recomendadas) diminuiriam a população de *G. diazotrophicus*, mas não afetaram a população de *H. seropedicae*.

O meio LGI foi o que apresentou menor população de bactérias diazotróficas endofíticas diferindo estatisticamente dos demais, enquanto que o JMV apresentou a maior população, embora, não tenha diferido estatisticamente (Figura 9A).

Aos doze meses a população de bactérias apresentou um decréscimo ainda mais severo, variando de não detectada a 10^3 células por grama de tecido fresco (Figura 9B). Reis Júnior et al. (2000b) ao avaliar a ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar observaram que a população de *G. diazotrophicus* diminuiu com a aproximação do final do ciclo da cultura.

b) Experimento conduzido no estado do Rio Grande do Sul

No Rio Grande do Sul foi avaliado apenas o genótipo RB867515 submetido aos tratamentos de adubação com 120 kg N ha^{-1} ou inoculação com as bactérias diazotróficas endofíticas, além do tratamento controle. No experimento conduzido no Sul, as populações de bactérias diazotróficas endofíticas encontraram-se abaixo do nível de detecção da técnica para a maioria dos tratamentos. A exceção foi para o meio JMV semi-específico para *B. tropica*, que apresentou uma população de até 10^4 células por grama de tecido fresco aos sete meses após o plantio (Figura 10A) e 10^3 células por grama de tecido fresco aos nove meses após o plantio (Figura 10B). Provavelmente, as baixas temperaturas e/ou a alta incidência da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea Saccharalis*) podem ter dificultado o estabelecimento das bactérias do inoculante.

Quando a planta é ferida ou infectada por herbívoros ou patógenos, aumentam-se os níveis de receptor quinase similar à prolina extensina (PERK1), e um sinal é transduzido para o interior da célula desencadeando resposta defensiva da planta hospedeira (SILVA & GORING, 2002). Acredita-se assim, que uma resposta da planta ao ataque da broca pode ter afetado indiretamente as bactérias do inoculante.

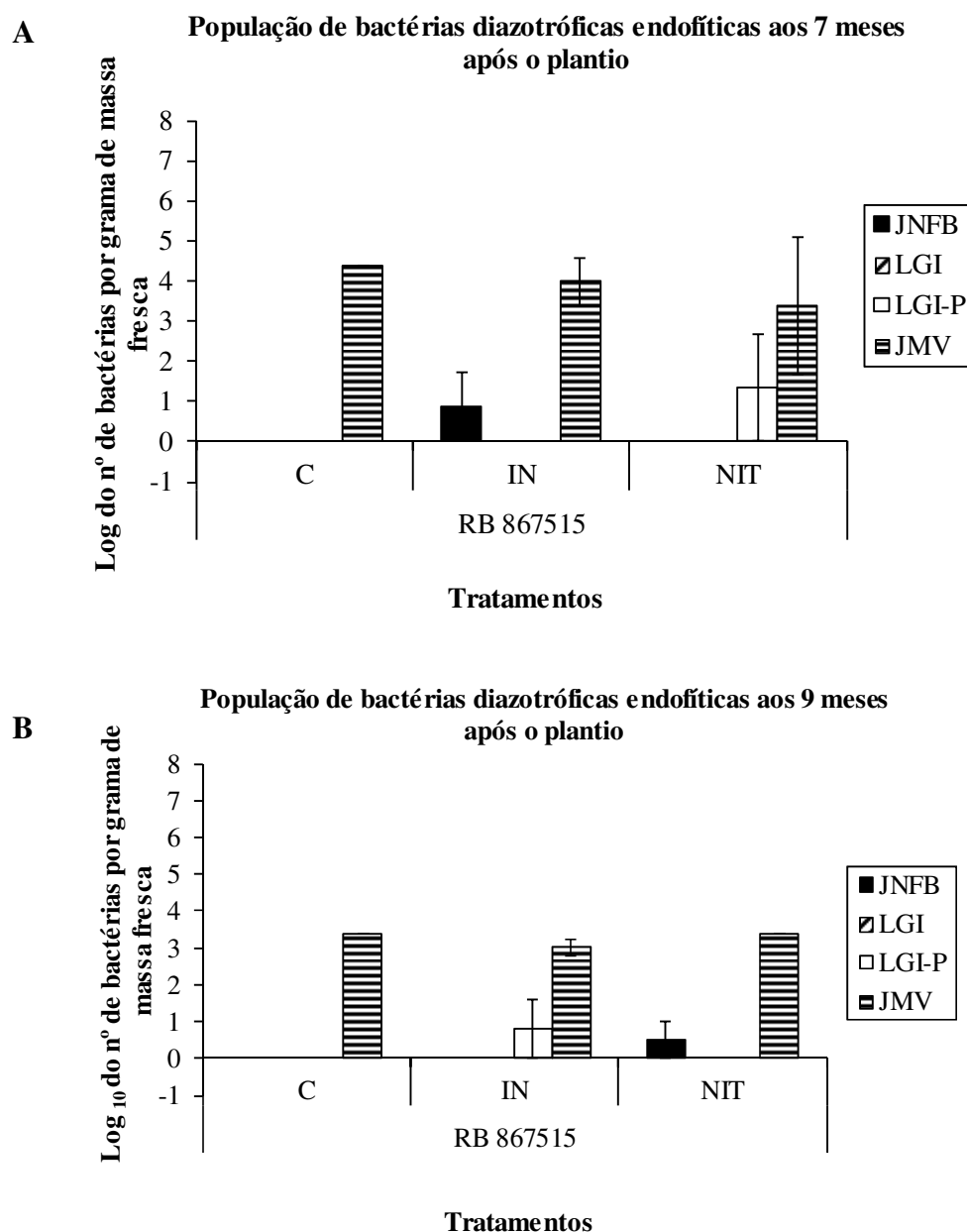


Figura 10: Logaritmo do número de células de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de tecido fresco da base do colmo de plantas de cana-de-açúcar. Variedade RB867515. Dados médios de 3 repetições. C – Controle, IN – Inoculado, NIT – Nitrogenado. Meios de cultivo utilizados JNFB, LGI, LGI-P caldo e JMV. As barras verticais representam o erro padrão da média.

4.2.1.2 População de bactérias diazotróficas endofíticas do material vegetal germinado em casa de vegetação

Amostras dos colmos das plantas de cana-de-açúcar foram coletadas nos experimentos de campo para cada estado correspondente, São Paulo e Rio Grande do Sul. Os colmos foram plantados em bandejas acondicionadas em casa de vegetação por um período de 45 a 60 dias (Figura 11).

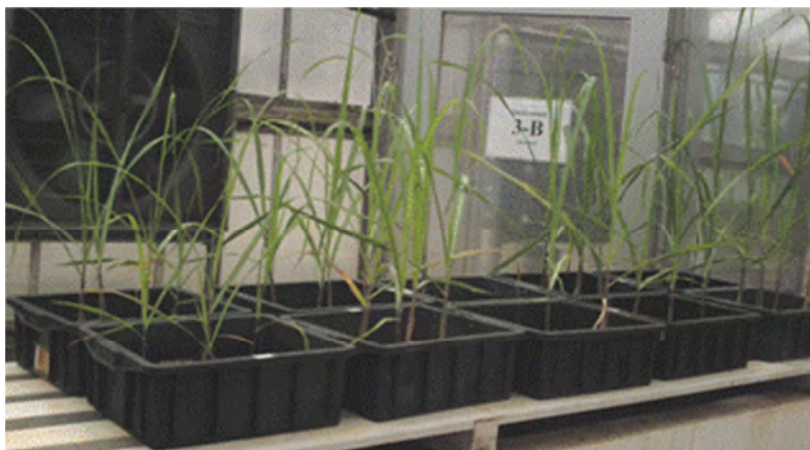


Figura 11: Toletes de cana-de-açúcar germinados em bandejas aclimatadas em casa-de-vegetação.

A população de bactérias diazotróficas endofíticas foi avaliada nos colmos das novas plantas pelo método do NMP. Foi observada uma população variando de 10^4 a 10^7 bactérias por grama de tecido fresco (Figura 12A). Neste método, de formação de película em meio JNFB e LGI, as bactérias *Herbaspirillum* spp. e *Azospirillum amazonense* que apresentaram uma população muito baixa quando analisadas do material direto do campo (10^1) (Figura 9B), agora apresentaram uma população superior a 10^4 . Estas bactérias superaram 10^5 células no tratamento inoculado para ambas as variedades. Esta estratégia possibilitou observar maiores números de bactérias diazotróficas endofíticas. Resultados semelhantes foram observados por Silva-Froufe et al. (2009) utilizando NMP e Elisa para quantificar a população de *G. diazotrophicus*, *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* em plantas de cana-de-açúcar da variedade SP701143. Estes autores quantificaram as bactérias nos toletes das plantas vindas do campo e nas plantas após germinar os toletes em casa-de-vegetação aos 20 e 40 dias após o plantio dos toletes. Os autores encontraram populações de *H. seropedicae* um pouco mais baixos que os observados para *G. diazotrophicus*, de aproximadamente $4,6 \times 10^5$ células g^{-1} de material fresco, utilizando anticorpos policlonais pelo método de ELISA. Quarenta dias após a germinação, esta população aumentou 16 vezes atingindo $2,4 \times 10^8$ células g^{-1} de material fresco nas raízes e $2,4 \times 10^8$ células g^{-1} de material fresco da parte aérea. Valores estes superiores aos de *G. diazotrophicus*. Os autores também observaram que a população natural de *G. diazotrophicus* presente no colmo de cana-de-açúcar antes da germinação, utilizando anticorpos contra a estirpe PAL 3 foi estimada em $5,6 \times 10^5$ células g^{-1} de material fresco. Quarenta dias após a germinação, este número aumentou para $7,9 \times 10^7$ células g^{-1} de material fresco.

No experimento com toletes provenientes do experimento da região Sul observa-se um pequeno aumento na população de bactérias diazotróficas endofíticas ao germinar os toletes em casa de vegetação, porém, ainda encontra-se em um número baixo e não detectado para a maioria dos tratamentos aos 9 meses após o plantio (Figura 12B). Porém, aos 11 meses após o plantio as populações de bactérias diazotróficas endofíticas variaram de 10^4 a 10^7 bactérias por grama de tecido fresco (Figura 12B).

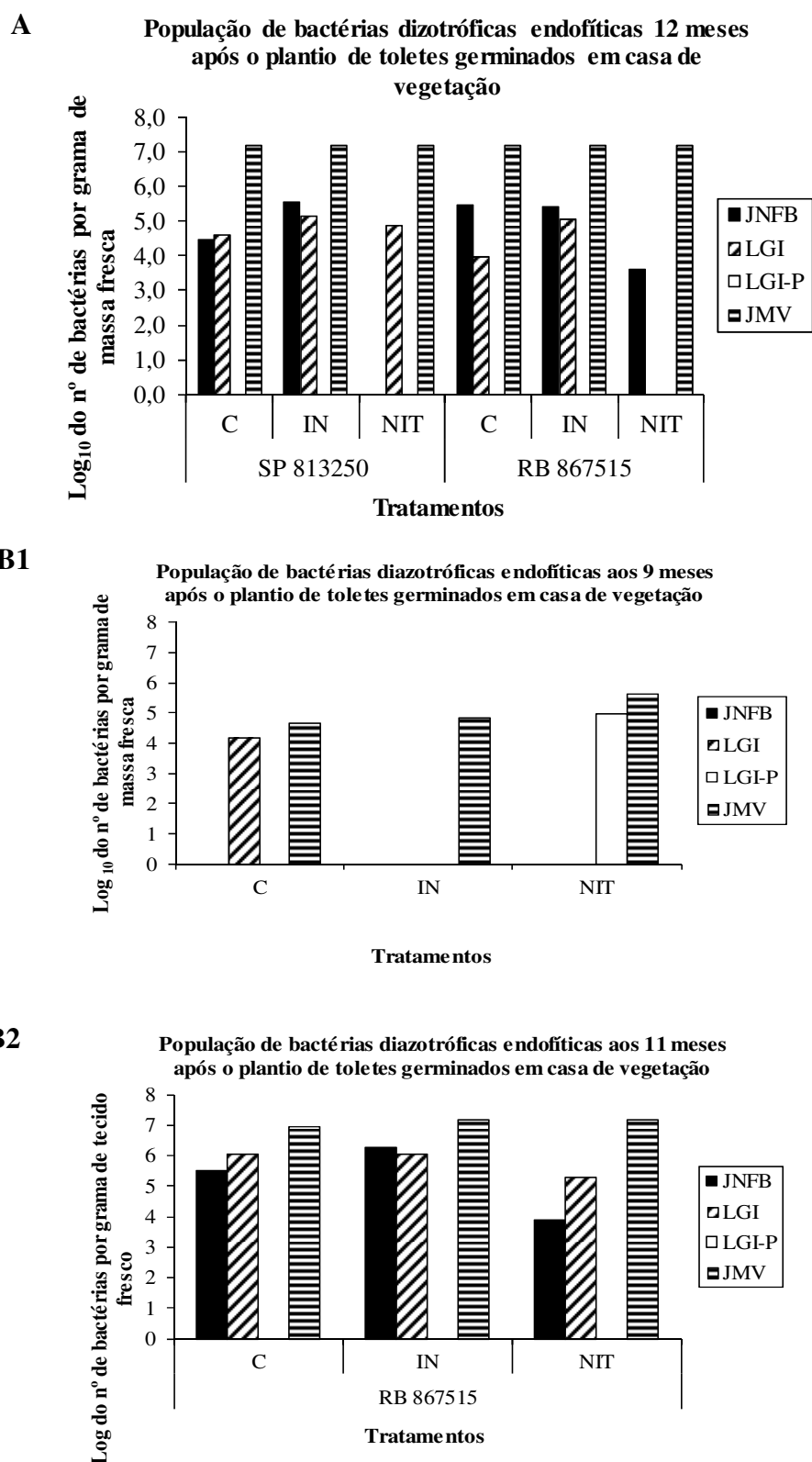


Figura 12: Logaritmo do número de células de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de tecido fresco do colmo de plantas de cana-de-açúcar coletadas aos 9, 11 e 12 meses após o plantio, germinadas em casa de vegetação e mantidas por um período de 45 a 60 dias. Variedades SP813250 e RB867515. C – Controle, IN – Inoculado, NIT – Nitrogenado. Dados de amostra composta. Meios de cultivo utilizados JNFB, LGI, LGI-P caldo e JMV. A – Toletes coletados do experimento no estado de São Paulo

(12 meses) ; **B** - Toletes coletados do experimento no estado do Rio Grande do Sul (9 e 11 meses).

4.2.2 Amplificação da sequência repetitiva BOX-PCR das bactérias inoculadas e *H. seropedicae*, estirpe ZAE94 (BR 11417)

A amplificação com iniciador para BOX-PCR mostra um polimorfismo de bandejamento existente entre as bactérias contidas no inoculante e a estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* (Figura 13). Este polimorfismo evidencia a diferença genética existente entre as estirpes e possibilita o desenho de iniciadores espécie-específicos. Possivelmente, iniciadores estirpe específicos podem ser desenhados a partir das bandas diferentes entre as bactérias. Para tal seria necessário eluir as bandas com diferentes massas moleculares entre as bactérias, reamplificar e sequenciar. No entanto, esta foi uma estratégia ou alternativa a ser realizada, caso os iniciadores desenhados não ficassem específicos nas reações de qPCR.

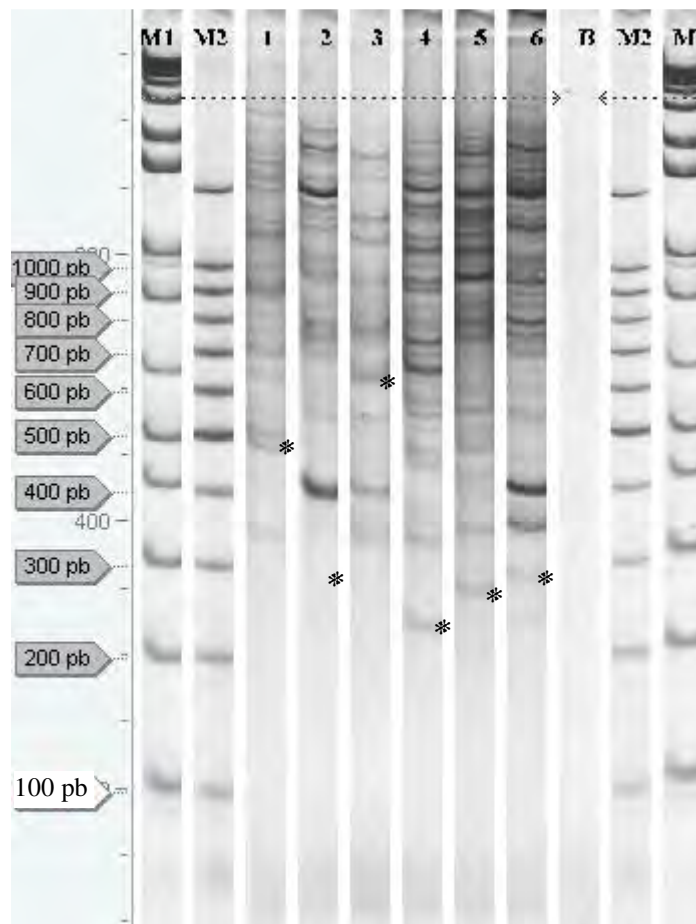


Figura 13: Gel de acrilamina:bis-acrilamida 3% submetido a eletroforese de 75 v por 5.5 horas em cuba vertical. M1 e M2, marcadores de massa molecular, M1 – 1Kb, M2 – 100 bp. Amostras de 1 – 6, estirpes bacterianas: 1 – *H. rubrisubalbicans* (estirpe HCC103); 2 – *H. seropedicae* (HRC54); 3 – *A. amazonense* (CBamC); 4 – *G. diazotrophicus* (PAL5); 5 – *B. tropica* (Ppe8); 6 – *H. seropedicae* (ZAE94). B – branco.

*Bandas potenciais para eluição, sequenciamento e desenho dos iniciadores.

4.2.3 Ajuste da técnica de PCR para detectar e quantificar por qPCR as bactérias inoculadas em cana-de-açúcar

A amplificação com iniciador para BOX-PCR (Figura 13) mostra um polimorfismo de bandejamento existente entre as bactérias inoculadas e a estirpe ZAE94 de *H. seropedicae*. Este polimorfismo evidencia a diferença genética existente entre as estirpes e possibilita o desenho de iniciadores espécie-específicos.

Foram desenhados 24 iniciadores para distinguir as bactérias presentes no inoculante de outras espécies bacterianas com o objetivo de identificá-las e quantificar a população nos tecidos de plantas inoculadas (Tabela 5). As análises no *Blast* evidenciaram especificidade para as bactérias alvo, assim como as análises de PCR virtual no programa vector NTI mostraram 100% de anelamento (Dados não demonstrados). As análises no banco de dados *probe check* confirmaram a especificidade dos iniciadores. Após estas análises reações de PCR foram feitas para avaliar a eficácia destes iniciadores testando diferentes concentrações de iniciadores, MgCl₂, DMSO, tempo e temperatura de anelamento. Diferentes condições de reação foram testadas na busca para definir uma condição ideal para cada par de iniciadores. Foram ajustadas as condições para cada uma das cinco bactérias.

Os iniciadores para *Aa* – *A. amazonense* apresentaram como condição ideal de reação: 2 mM de MgCl₂ e temperatura de anelamento de 63°C por 25 segundos. Os iniciadores *Hr2* para *H. rubrisubalbicans* e *Bt2* para *B. tropica* apresentaram condição ideal para amplificação a mesma concentração de cloreto de magnésio para *Aa* (2mM), porém com temperatura de anelamento de 62°C por 15 segundos. Os iniciadores para *G. diazotrophicus* apresentaram condições de reação: 1,5 mM de MgCl₂, com temperatura de anelamento de 63°C por 10 segundos. Para *H. seropedicae* (HRC54) as condições ideais foram: 2,0 mM de MgCl₂, com temperatura de anelamento de 62°C por 15 segundos. A concentração dos iniciadores foi de 0,12 μM para todos os iniciadores.

As condições de reação definidas mostram que os iniciadores selecionados são espécie-específicos (Figura 14).

a) Especificidade e limite de detecção dos iniciadores selecionados.

A especificidade dos iniciadores selecionados foi verificada utilizando o DNA de outras espécies bacterianas. Os iniciadores mostraram se espécie-específicos com exceção do par de iniciadores para *A. amazonense* (AaCBAmC F/R) que parece ser estirpe-específico pois não amplificou a estirpe Y2 desta mesma espécie (Figura 14 e Tabela 8).

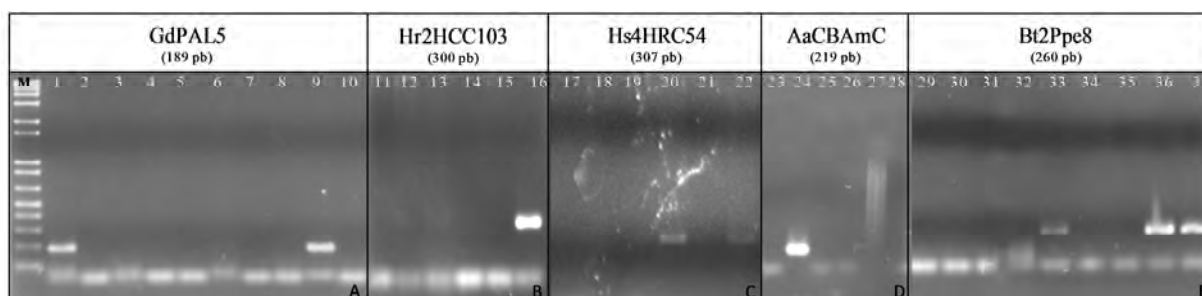


Figura 14: Eletroforese em géis de agarose 2%, submetidos a 100 v por 80 min. Produtos de PCR amplificados com iniciadores específicos para as espécies bacterianas: Gd – *G. diazotrophicus*, Aa – *A. amazonense*, Hs1 e Hs2 – *H. seropedicae* (Estirpe ZAE 94), Hs3 - *H. seropedicae* (Estirpe HRC54), Hr – *H. rubrisubalbicans*, Bt – *B. tropica* especificados na Tabela 5.

M – Marcador de massa molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). Números de 1 – 37 correspondem ao DNA “template” ou água utilizados na reação:

Gel A: 1 – Gd (PAL5); 2 – Aa (CBamC); 3 - Hs (ZAE94); 4 - Hs (ZAE94); 5 - Hs (HRC54); 6 - Hs (HRC54); 7 – Bt (Ppe8); 8 – Hr (HCC103); 9 – Misturas das 6 estirpes bacterianas e 10 – Água.

Gel B: 11 – Gd (PAL5); 12 – Aa (CBamC); 13 - Hs (ZAE94); 14 - Hs (HRC54); 15 - Bt (Ppe8); 16 - Hr (HCC103).

Gel C: 17 – Gd (PAL5); 18 – Aa (CBamC); 19 - Hs (ZAE94); 20 - Hs (ZAE94); 21 - Hs (HRC54); 22 - Hs (HRC54).

Gel D: 23 – Gd (PAL5); 24 – Aa (CBamC); 25 - Hs (ZAE94); 26 - Hs (HRC54); 27 - Bt (Ppe8); 28 - Hr (HCC103).

Gel E: 29 – Gd (PAL5); 30 – Aa (CBamC); 31 - Hs (ZAE94); 32 - Hs (HRC54); 33 - Bt (Ppe8); 34 - Hr (HCC103); 35 – Água; 36 – Repetição do DNA bacteriano alvo dos iniciadores desenhados e 37 – Misturas das 6 estirpes bacterianas.

Tabela 8: Estirpes e origem de isolamento das bactérias utilizadas nas reações de PCR para testar a especificidade dos iniciadores. Amplificação constatada (+), ausente (-). Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*

Espécie	Estirpe	Origem isolamento	PCR com iniciadores espécie-específicos				
			Gd	Aa	Hs3	Hr2	Bt2
<i>G. diazotrophicus</i>	PAL5*	Raízes de cana-de-açúcar	+	-	-	-	-
	PAL3	Raízes de cana-de-açúcar	+	-	-	-	-
<i>H. seropedicae</i>	HRC54*	Raízes de cana-de-açúcar	-	-	+	-	-
	ZAE94	Raízes de arroz	-	-	+	-	-
<i>H. rubrisubalbicans</i>	HCC103*	Colmos de cana-de-açúcar	-	-	-	+	-
<i>H. frisingense</i>	GSF30	Folhas de capim-elefante	-	-	-	-	-
<i>A. amazonense</i>	CBAmC*	Colmos de cana-de-açúcar	-	+	-	-	-
	Y2	Rizosfera de capim vermelho	-	-	-	-	-
<i>A. lipoferum</i>	SP59	Raízes de trigo	-	-	-	-	-
<i>A. brasilensi</i>	SP245	Raízes de trigo	-	-	-	-	-
	SP7	Rizosfera de digitaria	-	-	-	-	-
<i>B. tropica</i>	Ppe8*	Plântulas de cana-de-açúcar	-	-	-	-	+
<i>B. vietnamiensi</i>	TVV75	Rizosfera de arroz	-	-	-	-	-
<i>B. kururiensi</i>	M130	Raízes Arroz	-	-	-	-	-
	KP23	-	-	-	-	-	-
<i>B. silvatlântica</i>	SRMrh-20	Rizosfera de milho	-	-	-	-	-

*Inoculadas em cana-de-açúcar

Os iniciadores selecionados apresentaram uma detecção bastante sensível, possibilitando amplificar concentrações de DNA variando de 0,5 ng a 0,000000005 ng dependendo dos iniciadores espécie-específicos utilizados (Figura 15).

Os iniciadores mais sensíveis foram os específicos para as espécies bacterianas *H. seropedicae* e *G. diazotrophicus* que amplificaram até 0,000000005 ng de DNA bacteriano, seguidos pelos iniciadores para a espécie de *B. tropica* que amplificaram até 0,00005 ng, e dos iniciadores para *A. Amazonense* amplificando até 0,0005 ng. Os iniciadores para *H. rubrisubalbicans* foram os que apresentaram menor detecção (0,5 ng).

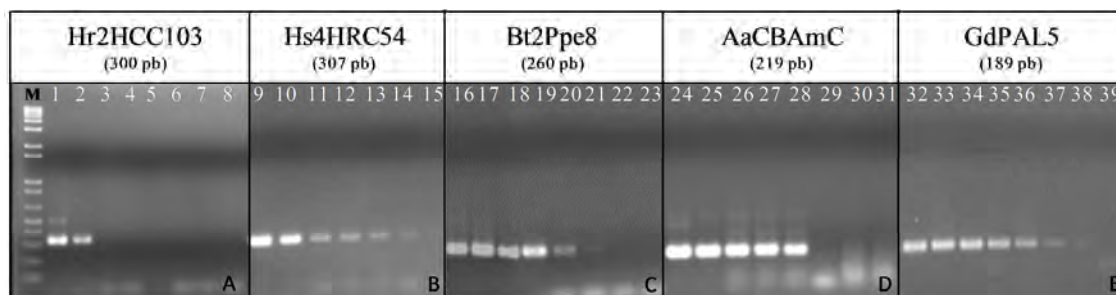


Figura 15: Eletroforese em géis de agarose 2%, submetidos a 100 v por 80 min, evidenciando produtos de PCR amplificados com iniciadores específicos para as espécies bacterianas: Gd – *G. diazotrophicus*, Aa – *A. amazonense*, Hs4 - *H. seropedicae* (Estirpe HRC54), Hr – *H. rubrisubalbicans*, Bt – *B. tropica*. Especificados na Tabela 5.

M – Marcador de massa molecular 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen®). Números de 1 a 39 correspondem às diferentes concentrações de DNA utilizadas como molde na reação:

Gel A: Hr2HCC103 – Amostras 1 a 8 (5 a 0,0000005 ng de DNA, respectivamente).

Gel B: Hs4HRC54 – Amostras 9 a 15 (0,0005 a 0,0000000005 ng de DNA, respectivamente).

Gel C: Bt2Ppe8 – Amostras 16 a 23 (0,005 a 0,0000005 ng de DNA, respectivamente).

Gel D: AaCBAmC – Amostras 24 a 31 (5 ng a 0,000005 ng de DNA, respectivamente) e

Gel E: GdPAL5 – Amostras 32 a 39 (0,5 a 0,0000000005 ng de DNA, respectivamente).

b) Curva Padrão para qPCR

O DNA das estirpes bacterianas foram amplificados por PCR convencional com os iniciadores 27F e Amp2, purificados com kit wizard e utilizados para gerar a curva padrão utilizando os iniciadores para qPCR PAL5F e PAL5R, Ppe8F1 e Ppe8R1, CBAmCF e CBAmCR, HCC103F2 e HCC103R2, HRC54F2 e HRC54R2. As diluições da primeira reação de PCR utilizadas variaram de 10^2 a 10^{-8} ng.

As concentrações de DNA utilizadas foram substituídos na equação 1, a fim de obter o número de cópias do 16S (Tabela 9). Os valores obtidos dos números de cópias possibilitaram a geração das curvas padrão para número de cópias do 16S plotando estes valores com os CT's encontrados para cada espécie microbiana (Figura 16).

A eficiência dos iniciadores foi calculada pela equação: $E = 10^{(-1/\text{slope})-1}$ e apresentou valores na ordem de 97% para PAL 5, 96% para Ppe8, 93% para CBAmC, 71% para HCC103 e 94% para HRC54. A regressão linear entre as diluições de DNA e as médias de CT apresentou R^2 superior a 0,99 para todos os iniciadores (Tabela 9)

Tabela 9: Valores da concentração de DNA utilizada nas reações de qPCR, respectivos número de cópias e CT's médios obtidos para cada espécie microbiana correspondentes a concentração de DNA utilizada nas reações de qPCR. (-) Não determinado. Hr – *H. rubrisubalbicans*, Hs – *H. seropedicae*, Aa – *A. amazonense*, Gd – *G. diazotrophicus* e Bt – *B. tropica*.

[DNA] ng	Nº de cópias	Média CT				
		Gd	Bt	Aa	Hs	Hr
5×10^2	$3,02 \times 10^{11}$	-	-	-	-	4,51
5×10^1	$3,02 \times 10^{10}$	-	-	-	-	8,52
5×10^0	$3,02 \times 10^9$	-	-	4,29	10,02	11,93
5×10^{-1}	$3,02 \times 10^8$	8,49	10,79	9,40	14,43	16,03
5×10^{-2}	$3,02 \times 10^7$	12,77	14,27	12,50	17,77	21,07
5×10^{-3}	$3,02 \times 10^6$	16,31	18,08	15,64	21,33	25,73
5×10^{-4}	$3,02 \times 10^5$	19,66	21,15	19,20	24,69	29,94
5×10^{-5}	$3,02 \times 10^4$	22,71	24,37	22,71	28,28	-
5×10^{-6}	$3,02 \times 10^3$	25,98	28,26	25,76	31,67	-
5×10^{-7}	$3,02 \times 10^2$	29,20	31,26	-	34,54	-
R2 (%)		99,74	99,92	99,54	99,83	99,7

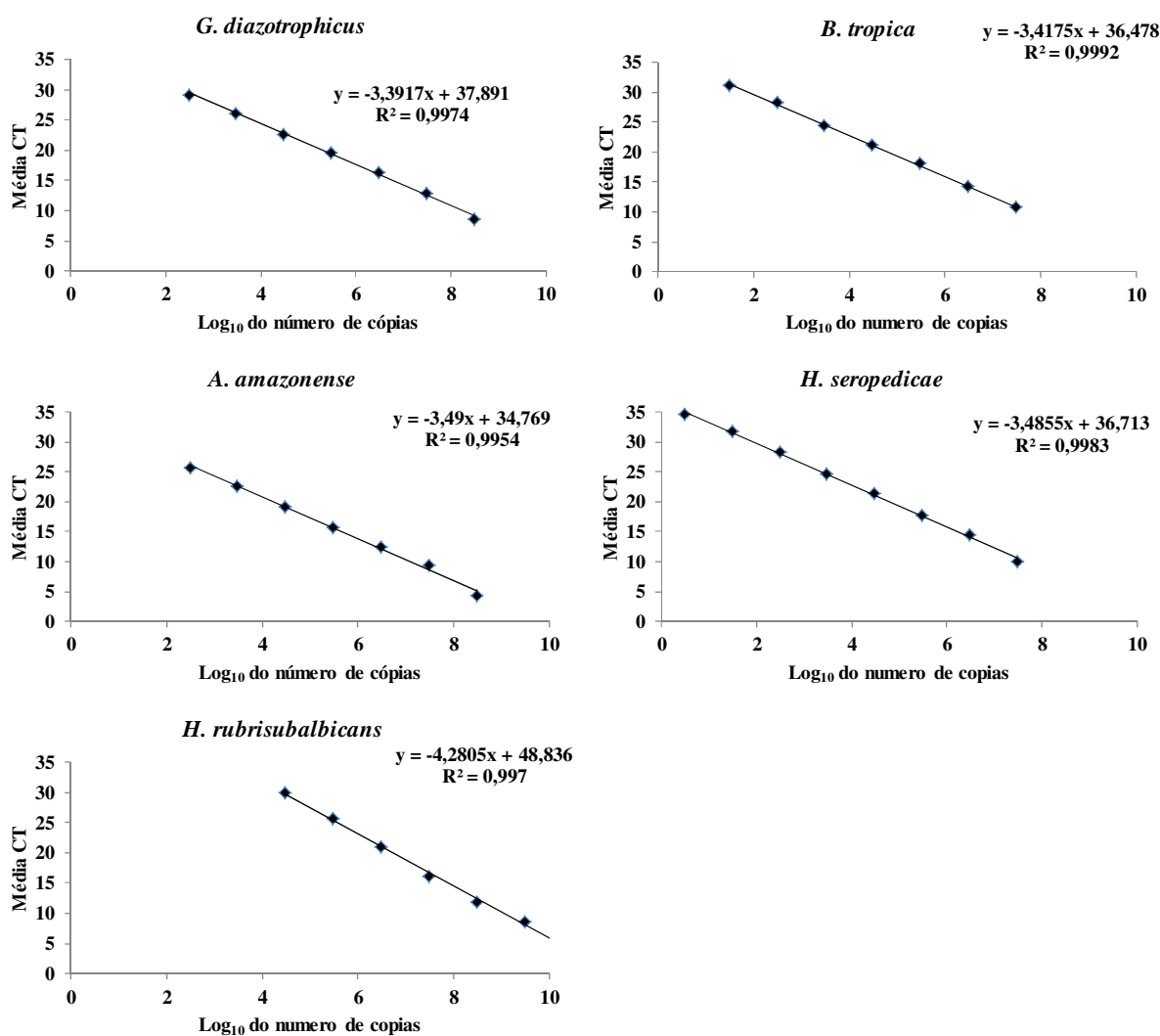


Figura 16: Curva padrão do Log₁₀ do número de cópias.

c) Quantificação do número de cópias do gene 16S de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar por qPCR

c.1) São Paulo

Nos experimentos conduzidos no estado de São Paulo houve diferença entre época de coleta e as bactérias. Também houve interação entre as épocas de coleta e as bactérias e entre as bactérias e os tratamentos. O número de bactérias foi superior aos 8 meses. Logo, a população bacteriana diminuiu ao longo do tempo (Figura 17 e Figura 18).

A população de *A. amazonense* e *H. seropedicae* diminuiu aos 12 meses nas duas variedades avaliadas. Para *H. seropedicae* a redução ocorre de 10^3 cópias por grama de matéria fresca aos 8 meses para um número tão baixo a ponto de não ser detectada pela técnica de qPCR. Para *A. amazonense* a redução foi menor.

A bactéria *H. rubrisubalbicans* teve número superior a *B. tropica*, que por sua vez foi superior a *A. amazonense*, que foi superior a *G. diazotrophicus*, que foi superior a bactéria *H. seropedicae* (Figura 17). Na interação entre bactérias e as épocas de coleta, para as bactérias *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense* e *B. tropica* aos 8 meses o num foi maior, já para a bactéria *G. diazotrophicus*, aos 12 meses o num foi maior.

Desdobrando as épocas de coleta dentro da bactéria, aos 8 meses a bactéria *H. rubrisubalbicans* teve maior número que *B. tropica*, que foi maior que *A. amazonense*, que foi superior a *G. diazotrophicus*, que por sua vez foi maior que *H. seropedicae*. Já aos 12 meses a bactéria *H. rubrisubalbicans* foi superior a *B. tropica*, que foi superior a *G. diazotrophicus*, que por sua vez foi maior que *A. amazonense*, que foi maior que a *H. seropedicae*. Portanto, o comportamento das bactérias *A. amazonense* e *G. diazotrophicus* se inverteu aos 8 meses e 12 meses.

Na interação entre as bactérias e os tratamentos, para os tratamentos controle, inoculado e nitrogenado o número foi superior na bactéria *H. rubrisubalbicans*, seguida por *B. tropica*, que foi maior que *A. amazonense*, que foi maior que *G. diazotrophicus* que por sua vez foi maior que a *H. seropedicae*. Desdobrando o tratamento nas bactérias, somente na bactéria *H. seropedicae* se observou diferença entre os tratamentos, sendo o controle superior ao inoculado, e este por sua vez superior ao nitrogenado.

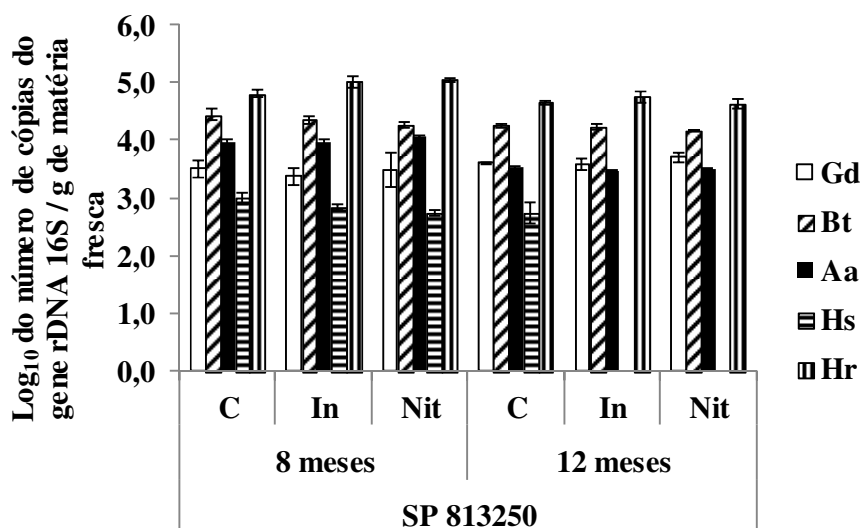


Figura 17: Log₁₀ do número de cópias do gene rDNA16S de bactérias diazotróficas endofíticas obtidas por grama de tecido fresco. Tratamentos: C – Controle; In – Inoculado e Nit – Nitrogenado. Variedade de cana-de-açúcar SP813250.

* As médias não diferiram estatisticamente pelo teste LSD a 10% de significância. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Na variedade RB867515, semelhante à variedade SP813250, houve diferença e interação entre as épocas de coleta e as bactérias. O número de bactérias foi superior aos 8 meses também diminuindo ao longo do tempo (Figura 18).

A bactéria *H. rubrisubalbicans* teve número superior a *B. tropica*, que por sua vez foi superior a *A. amazonense*, que foi superior a *G. diazotrophicus*, que foi superior a *H. seropedicae*.

Na interação entre as bactérias e as épocas de coleta, para as bactérias *H. rubrisubalbicans* e *A. amazonense* na primeira coleta (8 meses) apresentou maior número, já para a bactéria *G. diazotrophicus*, na segunda coleta (12 meses) houve número maior (Figura 18). Desdobrando as épocas de coleta dentro das bactérias, aos 8 meses a bactéria *H. rubrisubalbicans* teve maior número que *B. tropica*, que foi maior que *A. amazonense*, que foi superior a *G. diazotrophicus*, que por sua vez foi maior que *H. seropedicae*. Na segunda coleta (12 meses) a bactéria *H. rubrisubalbicans* foi superior a *B. tropica*, que foi superior a *G. diazotrophicus*, que por sua vez foi maior que *A. amazonense*, que foi maior que *H. seropedicae*. Portanto, o comportamento da *A. amazonense* e *G. diazotrophicus* se inverteu entre 8 e 12 meses.

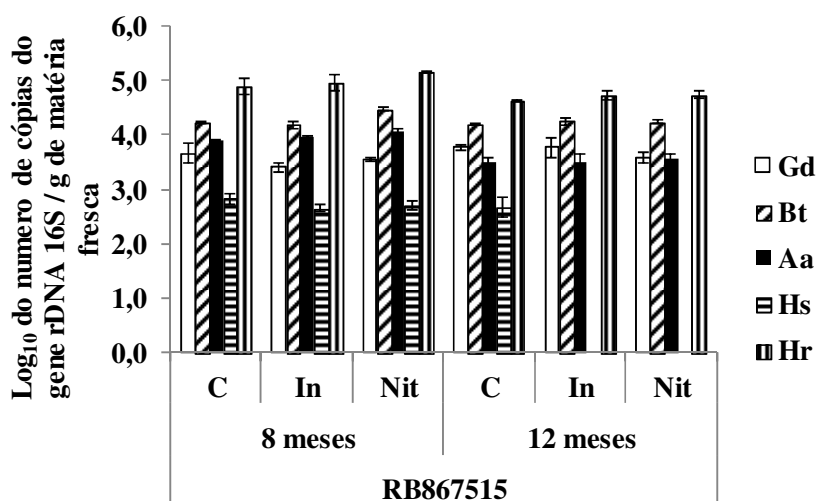


Figura 18: Log₁₀ do número de cópias do gene rDNA16S de bactérias diazotróficas endofíticas obtidas por grama de tecido fresco. Tratamentos: C – Controle; In – Inoculado e Nit – Nitrogenado. Variedade de cana-de-açúcar RB867515.

* As médias não diferiram estatisticamente pelo teste LSD a 10% de significância. As barras verticais representam o erro padrão da média.

c.2) Rio Grande do Sul

Com exceção de *B. tropica* a maioria das bactérias inoculadas não foi detectada pelo método do NMP. *H. seropedicae* sendo encontrada em menor número e *B. tropica* apresenta a população mais estável no decorrer do ciclo da cultura (Figura 19).

Houve diferença entre as épocas de coleta e as bactérias. Semelhante ao experimento de São Paulo a população bacteriana foi superior na primeira coleta (7 meses). Logo, o número das bactérias também diminuiu ao longo do tempo. Fato este não perceptível nas análises do NMP.

A bactéria *H. rubrisubalbicans* teve população superior a *G. diazotrophicus*, que por sua vez foi superior a *B. tropica*, que foi superior a *A. amazonense*, e esta foi superior a *H. seropedicae*.

Comparando-se aos resultados em SP, o comportamento com relação ao tempo foi equivalente no Rio Grande do Sul e a bactéria *H. rubrisubalbicans* sempre foi melhor e a *H. seropedicae* pior, no entanto as demais bactérias tiveram comportamentos distintos.

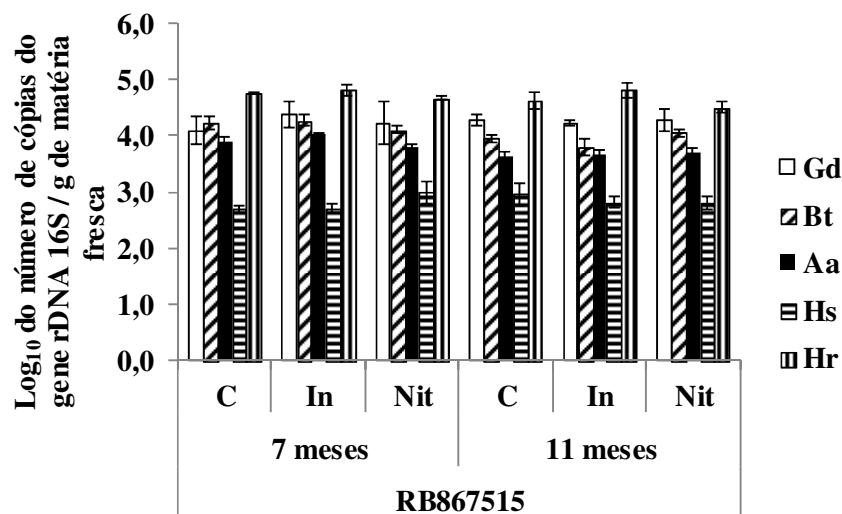


Figura 19: Log₁₀ do número de cópias do rDNA16S de bactérias diazotróficas endofíticas obtidas por qPCR aos 7 e 11 meses após o plantio. A – Quantificação por reação de qPCR. B – Estimativa da quantificação por grama de tecido fresco. Tratamentos: C – Controle; In – Inoculado e Nit – Nitrogenado.

* As médias não diferiram estatisticamente pelo teste LSD a 10% de significância. As barras verticais representam o erro padrão da média

d) Determinação da curva padrão para a quantificação do número de células da bactéria *G. diazotrophicus* por qPCR

Foram desenhados seis iniciadores para discriminar *G. diazotrophicus* das outras espécies bacterianas. O conjunto de iniciadores utilizados para a amplificação específica de 16S rDNA *G. diazotrophicus* foram concebidos com base nas sequências de rRNA 16S depositadas no NCBI. A análise utilizando o Blast mostrou especificidade para a bactéria alvo, além disso, a análise de PCR no programa vector NTI mostrou 100% de anelamento (dados não mostrados). Análise no programa probeCheck (<http://131.130.66.200/cgi-bin/probecheck/content.pl?id=home>) confirmou a especificidade dos primers.

O melhor par de iniciadores PAL5F 5'- GGCTTAGCCCCCTCAGTGTCG - 3' e PAL5R 5'- GAAACAGCCATCTCTGACTGC - 3' foi checado em gel de agarose como mostrado na Figura 14. Estes iniciadores amplificam um fragmento de 189 pb sem a presença de produto inespecífico.

Para os demais iniciadores desenhados para *G. diazotrophicus* foi observado amplificação inespecífica, além de baixa eficiência de amplificação do qPCR na concentrações de primer 100 nmoles. Para os primers PAL5F e PAL5R a melhor eficiência de amplificação foi nas concentrações de 200 e 300 nmoles. Desta forma, as reações subsequentes foram realizadas utilizando 200 nmoles de cada iniciador e uma temperatura de anelamento de 63°C - 10 seg por apresentar os melhores resultados.

A especificidade dos iniciadores foi avaliada utilizando como molde o DNA genômico extraído de 16 estirpes de bactérias isoladas previamente de cana-de-açúcar, capim elefante, arroz, capim vermelho, trigo, digitaria e milho (Tabela 8) e pertencentes a diferentes gêneros: *Gluconacetobacter*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Azospirillum* e *Burkholderia*. Os iniciadores PAL5F e PAL5R se mostraram específicos para a bactéria *G. diazotrophicus*, sendo amplificado um fragmento de 189 pb do gene *rrs*, confirmando as análises “*in silico*”. Para os

demais iniciadores para *G. diazotrophicus* na Tabela 5 foi observada amplificação também para outras espécies bacterianas.

O limite de detecção da PCR convencional foi determinada amplificando o fragmento de 189 pb alvo até uma concentração mínima de 5×10^{-9} ng de molde, equivalente a aproximadamente 12 células bacterianas (Figura 15) calculadas de acordo com a equação 1.

O fragmento de 1512 pb do 16S rDNA da estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus* amplificado por PCR convencional foi utilizado para gerar a curva padrão para qPCR utilizando os iniciadores específicos para esta bactéria. As diluições utilizadas para estimar o número de bactérias e gerar a curva variaram de 5×10^{-1} a 5×10^{-7} ng (Tabela 10). O número de bactérias foi calculado com base no número de cópias do gene 16S no genoma de *G. diazotrophicus* (BERTALAN et al., 2010).

Tabela 10: Estimativa do número de bactérias em função do CT médio obtido para cada concentração de DNA.

[DNA] ng	Nº de bactérias / reação de PCR	Média CT
5×10^{-1}	$1,21 \times 10^9$	8,49
5×10^{-2}	$1,21 \times 10^8$	12,77
5×10^{-3}	$1,21 \times 10^7$	16,31
5×10^{-4}	$1,21 \times 10^6$	19,66
5×10^{-5}	$1,21 \times 10^5$	22,71
5×10^{-6}	$1,21 \times 10^4$	25,98
5×10^{-7}	$1,21 \times 10^3$	29,20

A eficiência dos iniciadores apresentou valores na ordem de 97% e a curva padrão gerada pelas médias de CT e pelo Log_{10} do número de bactérias permitiram calcular o número de células de *G. diazotrophicus* nas amostras de cana-de-açúcar (Figura 20, Figura 21 e Figura 22). A regressão linear entre a quantidade de bactérias e as médias de CT apresentaram $R^2 = 0,99$ (Figura 20).

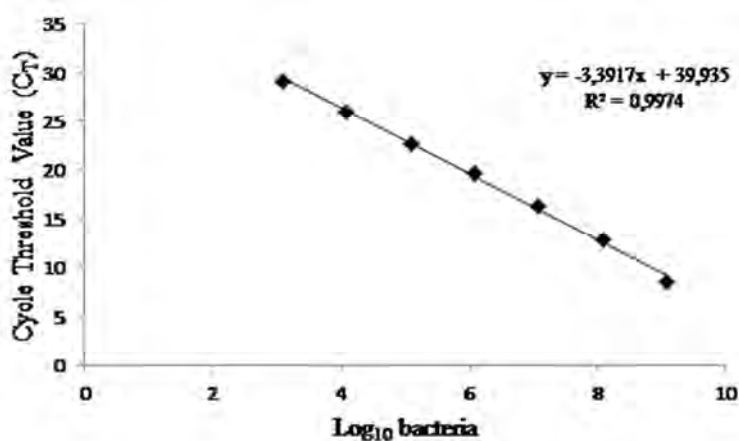


Figura 20: Curva Padrão das diluições de DNA versos médias de CT. Foram utilizadas 3 repetições para todas as diluições.

e) **Detecção e quantificação de células de *G. diazotrophicus* em cana-de-açúcar inoculada com o inoculante de bactérias diazotróficas endofíticas e cultivadas no Sul do Brasil**

O DNA total foi extraído de plantas de cana-de-açúcar cultivadas sob condições de campo no sul do Brasil foi amplificado com os *iniciadores* específicos para *G. diazotrophicus* em reação de qPCR, e o produto gerado de 189 bp foi confirmado em gel de agarose como descrito anteriormente, corroborando com as análises na curva de “*melting*” gerada no qPCR.

A curva padrão gerada pelas médias de CT utilizando diferentes concentrações de DNA do gene 16S permitiu calcular o número de bactérias presentes nos tecidos das plantas de cana cultivadas em condições de campo no sul do Brasil, por meio da substituição dos valores de CT das amostras na curva (Figura 20). O número de células bacterianas em colmos de plantas de canas de açúcar variou de 10^4 – 10^5 bactérias por grama de matéria fresca, sendo maior aos 7 meses no tratamento inoculado (Figura 21). Embora não tenha diferido estatisticamente, o número de células variou ao longo do tempo para todos os tratamentos analisados. O tratamento controle apresentou um pequeno acréscimo de $6,5 \times 10^4$ – $8,0 \times 10^4$ bactérias por grama de matéria fresca dos sete aos 11 meses, enquanto o tratamento inoculado apresentou pequeno decréscimo de $1,2 \times 10^5$ – $6,7 \times 10^4$ bactérias por grama de matéria fresca, no mesmo período. O tratamento adubado com adubo nitrogenado manteve uma população de *G. diazotrophicus* praticamente estável, variando apenas de $1,2 \times 10^5$ – $8,8 \times 10^4$ bactérias por grama de matéria fresca (Figura 21). O coeficiente de variação gerado pela análise estatística foi de 16%. Possivelmente, a não observação de diferença estatística pode ser devido à presença de grande número de bactérias, mesmo nas plantas não inoculadas. Utilizando o método proposto por Ruppel et al. (2006) foi realizada a quantificação do número de células por grama de matéria fresca de planta, observou-se que a quantidade de células de *G. diazotrophicus* ficou entre 10^4 e 10^5 bactérias por grama de colmo fresco. Para essas mesmas amostras de tecido vegetal não foi observada a formação de película aerotática, utilizando a técnica NMP (Número Mais Provável) com o meio de cultura semi-seletivo LGI-P caldo.

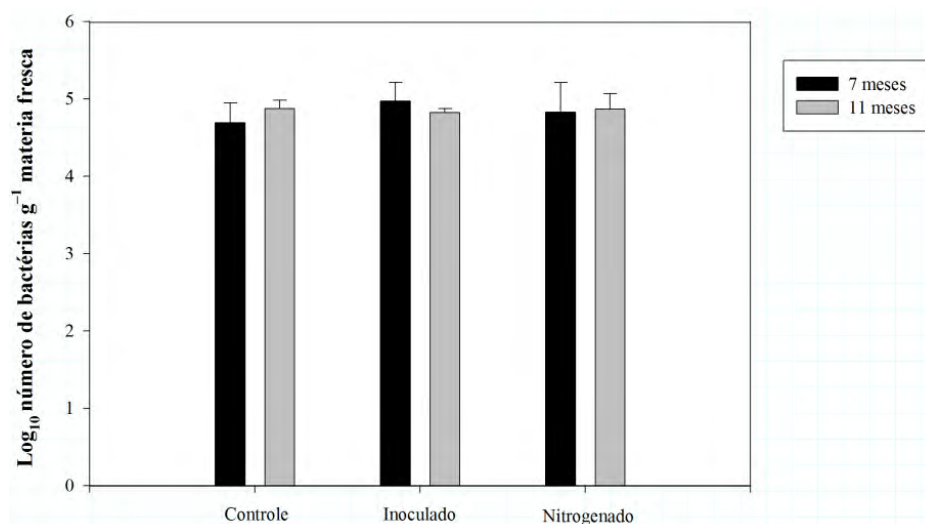


Figura 21: Quantificação do número de células da bactéria *G. diazotrophicus* por qPCR em planta de cana de açúcar com diferentes idades, inoculadas e não inoculadas com uma mistura de cindo bactérias. Os valores não diferem estatisticamente pelo teste LSD a 10% de significância.

f) Detecção e quantificação de células de *G. diazotrophicus* em cana-de-açúcar inoculada com o inoculante de bactérias diazotróficas endofíticas e cultivadas no estado de São Paulo

O número de células de *G. diazotrophicus* quantificada por qPCR no estado de São Paulo evidenciam um pequeno aumento na população entre 8 e 12 meses após o plantio, em todos os tratamentos, independente da variedade de cana avaliada, embora não haja diferença estatística (Figura 22). Esta população avaliada por NMP mostrou um decréscimo na população no decorrer do ciclo da cultura (Figura 9). Trabalhos avaliando a população de *G. diazotrophicus* por NMP já mostraram a redução populacional desta bactéria com o final do ciclo da cultura (REIS JÚNIOR et al., 2000; GOMES et al., 2005). O fato de nas reações de qPCR esta população parecer estar mais estável, pode ser explicado pelo princípio da técnica de PCR que irá amplificar o fragmento de DNA, mesmo a bactéria não estando viva ou viável.

Alguns autores observaram que a utilização da técnica do NMP utilizando de meios semi-específicos é repleta de dificuldades, e as quantificações obtidas quase sempre subestimam o tamanho verdadeiro das populações, como observado para *G. diazotrophicus* (LI & MACRAE 1992; SILVA-FROUFE et al., 2009). Silva-Froufe e colaboradores (2009) apontam algumas causas que podem explicar a subestimativa da população de *G. diazotrophicus* por NMP, como por exemplo, o método assumir que todas as bactérias são libertadas dos tecidos da planta onde estão aderidas e que não são formados agregados, de modo que os extratos da maceração contêm todas as bactérias presentes no tecido da planta. Outra questão discutida por estes autores é que as diluições seriadas são baseadas em uma suspensão homogênea de células bacterianas individuais. Assume-se ainda que as células individuais de organismos-alvo podem crescer nestas condições e sem outras bactérias presentes na suspensão para inibir o seu crescimento em meio semi-sólido (SILVA-FROUFE et al., 2009).

A quantificação de *G. diazotrophicus* é normalmente realizada utilizando meio de cultura denominado LGI-P (REIS et al., 1994). O crescimento bacteriano é confirmado pela característica da película formada sobre a superfície do meio semi-sólido e o número de bactérias é estimado utilizando a Tabela McCrady (REIS et al., 1994). No entanto, tal como discutido por Silva-Froufe et al., (2009) este método apresenta algumas limitações, como o crescimento de outros microrganismos que podem inibir *G. diazotrophicus*, o que leva a uma subestimação da população.

Além disso, as células bacterianas podem apresentar-se de forma viável, mas não cultivável que conduziria a uma subestimativa como observado para as bactérias do gênero *Herbaspirillum* (OLIVARES et al., 1996). Por outro lado, a PCR em tempo real foi utilizada para a detecção e quantificação de várias espécies de bactérias presentes em diferentes tipos de amostras (LACAVA et al., 2006; RUPPEL et al., 2006; SAUVAGE et al., 2007; SELLECK et al., 2008; COELHO et al., 2009; TRABELSI et al., 2009; TIMMUSK et al., 2009; DONAGHY et al., 2010; FELTEN et al., 2010; JUNG et al., 2010) e, portanto, pode ser uma alternativa valiosa para a quantificação de bactérias diazotróficas endofíticas.

Os iniciadores PAL5F / PAL5R que foram desenhados para detecção de *G. diazotrophicus*, demonstraram uma alta sensibilidade e especificidade, sendo possível detectar até 5 fg de DNA molde, equivalente a 12 células bacterianas, mesmo com a reação de PCR convencional (Figura 15). Valores semelhantes foram relatados por Jung et al. (2010) para quantificação de *Lactococcus garvieae* utilizando qPCR. No caso de *L. garvieae*, utilizando alimentos e amostras ambientais, Jung et al. (2010) quantificaram por PCR em tempo real até 32 fg de DNA genômico, equivalente a 10 células bacterianas usando os iniciadores espécie-específicos para o gene codificador do 16S rRNA. Além disso, a sensibilidade do método foi semelhante ao obtido para as bactérias patogênicas (SAILS et al., 2003; YANG et al., 2003; LAMBERTZ et al., 2008).

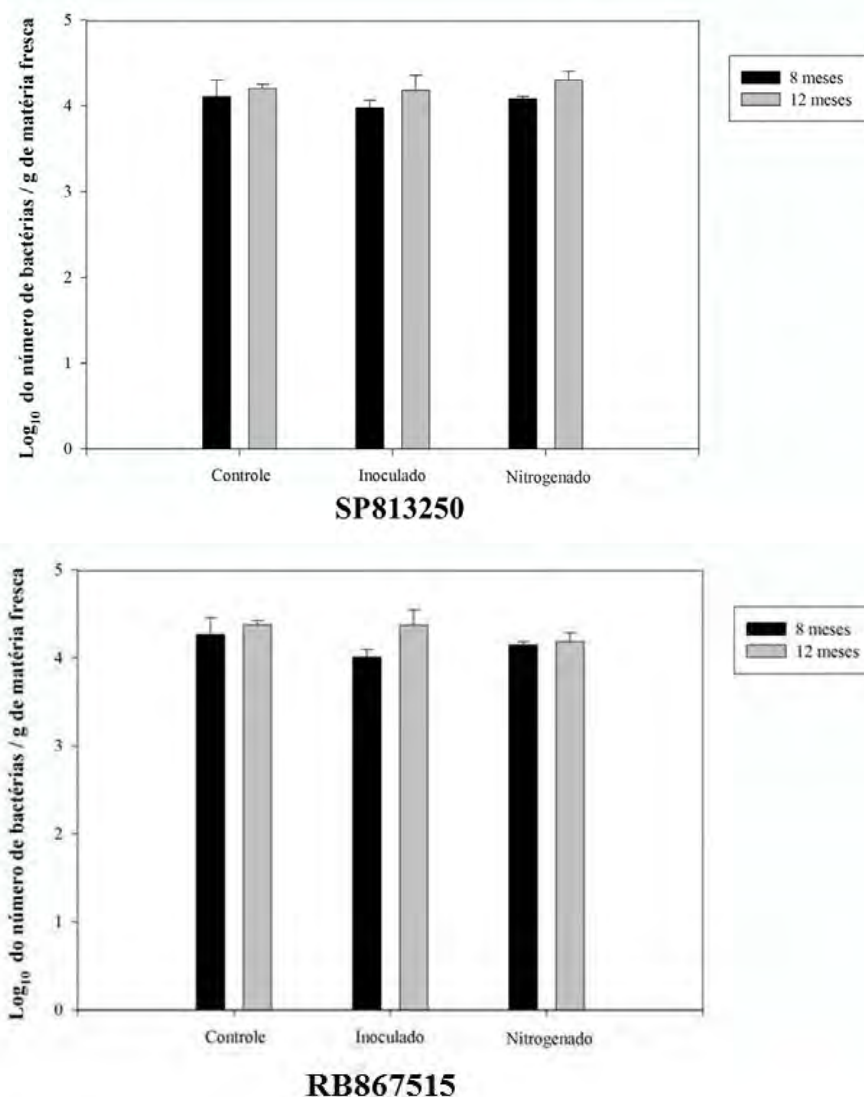


Figura 22: Quantificação do número de células da bactéria *G. diazotrophicus* por qPCR em planta de cana de açúcar com diferentes idades, inoculadas e não inoculadas com uma mistura de cinco bactérias. Os valores não diferem estatisticamente pelo teste LSD a 10% de significância.

Silva-Froufe et al. (2009) utilizando anticorpos policlonais observaram o limite de detecção mínimo de *G. diazotrophicus* de 10^5 células mL^{-1} . Já no presente estudo, o DNA total extraído de tecidos de cana permitiu quantificar uma população mínima por PCR em tempo real de até $9,1 \times 10^3$ bactérias por grama de caule fresco, na variedade SP81320 cultivados durante 8 meses em condições de campo. Resultados similares foram observados para a bactéria endofítica *Methylobacterium mesophilicum* durante a colonização da planta *Catharanthus roseus* (LACAVA et al., 2006). Uma população de \log_{10} 4,6 células de *M. mesophilicum* foi detectada quando as plantas foram inoculadas apenas com esta bactéria e \log_{10} 2,6 quando as plantas foram inoculadas com uma mistura de *M. Methylobacterium* e *Xyllela fastidiosa*, provavelmente devido a uma competição entre elas.

Rizobactérias promotoras do crescimento foram também detectadas e quantificadas utilizando PCR em tempo real com iniciadores espécie-específicos e sondas TaqMan para *E. radicitans* (RUPPEL et al., 2006). A população desta bactéria associada com *Brassica oleracea* variou 10^7 - 10^9 células por grama de tecido foliar fresco, cerca de 10^8 células por

grama de raiz fresca (RUPPEL et al., 2006). Estes autores mostraram uma significativa colonização das folhas com a população na gama de $3,9 \times 10^4$ a $1,8 \times 10^7$ células por grama de folha fresca dependendo da concentração do inóculo inicial. Este valor foi de cerca de 10^7 células por grama de raiz, 14 dias após a inoculação. O número de cópias de rDNA 16S de *E. radicincitans* representaram cerca de 10-16% do total da comunidade bacteriana.

Estudos anteriores desenvolveram iniciadores espécie-específicos para detectar bactérias endofíticas por PCR convencional, em tecidos de plantas da família *Poaceae* (KIRCHHOF et al., 1998; SIEVERS et al., 1998; SEVILLA et al., 2001; FRANKE-WHITTLE et al., 2005; MUTHUKUMARASAMY et al., 2005; MEHNAZ et al., 2006; LIN et al., 2011; SHIME-HATORRI et al., 2011). No entanto, este é o primeiro relato da utilização de PCR em tempo real para a quantificação de bactérias endofíticas em plantas de cana cultivadas sob condições de campo, e inoculadas ou não com um inoculante misto composto por cinco bactérias diazotróficas endofíticas. O desenho e validação de iniciadores para PCR em tempo real específicos para bactérias diazotróficas endofíticas, é o primeiro passo que permite a utilização deste método para a quantificação de bactérias colonizando tecidos de diferentes plantas. Este estudo utilizou colmos de cana de plantas de diferentes idades, no entanto, a mesma estratégia pode ser utilizada para a quantificação de bactérias em outros tecidos vegetais. Além disso, existe a possibilidade de utilização de outros genes, tais como o gene *nifH* (CHURCH et al., 2005a; CHURCH et al., 2005b; SHORT et al., 2005; JURAEVA et al., 2006; COELHO et al., 2009) e genes constitutivos (GALISA et al., 2012).

O par de iniciadores desenhados para *G. diazotrophicus* foi muito específico para a detecção da espécie. Em contraste, com o método dependente de cultivo utilizando o meio semi-sólido LGI -P onde nenhuma população de *G. diazotrophicus* foi detectada nos tecidos das plantas, o PCR em tempo real foi capaz de detectar entre $6,5 \times 10^4$ e $1,2 \times 10^5$ bactérias por grama de caule fresco. Portanto, a técnica mostrou sensibilidade para a quantificação da espécie diazotrófica endofítica colonizando tecidos vegetais de cana, mesmo quando a população bacteriana está abaixo do limite de detecção pelo método dependente de cultivo.

4.2.4 Diversidade do gene *nifH* em variedades de cana-de-açúcar utilizando a técnica de “nested-pcr” e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante – DGGE

Os produtos de PCR aplicados em gel de agarose apresentaram respectivamente 360 pb na primeira e 320 pb na reação de “nested pcr” sem a presença de produto inespecífico. Observa-se uma diferença bastante pequena no perfil de bandas entre diferentes bactérias fixadoras de nitrogênio (Figura 23). As bactérias *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* apresentaram o posicionamento de bandas na mesma altura, enquanto as bactérias *A. amazonense* e *G. Johanae* migraram um pouco mais no gel em altura semelhante (Figura 23). A bactéria que ficou mais distante foi a estirpe 3267 do gênero *Bradyrhizobium*.

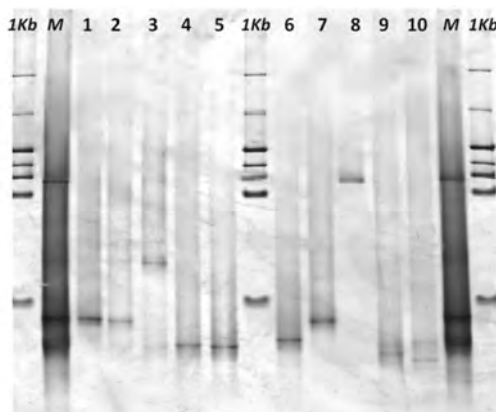


Figura 23: Gel de poliacrilamida (8%) com gradiente desnaturante (45% - 65%). Perfil de DGGE do gene *nifH*. 1Kb – Marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). M – Mistura das bactérias; 1 – *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; 2 – *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5; 3 – *Acetobacter liquefaciens*; 4 – *Azospirillum amazonense*; 5 – *G. Johanae*, CFN; 6 – *Burkholderia tropica*; 7 – *Herbaspirillum seropedicae*; 8 – *Bradyrhizobium*, 3267. 9 – *Burkholderia vietnamiense*, Tv75; 10 – *Burkholderia kururiense*, M130.

O DNA extraído das amostras de cana-de-açúcar e amplificado com os iniciadores para *nifH* apresentaram uma baixa diversidade nos perfis de DGGE (Figura 24, Figura 25, Figura 26 e Figura 27). Ainda nestas figuras observa-se uma banda na mesma altura para todos os tratamentos analisados, não havendo diferença entre os tratamentos.

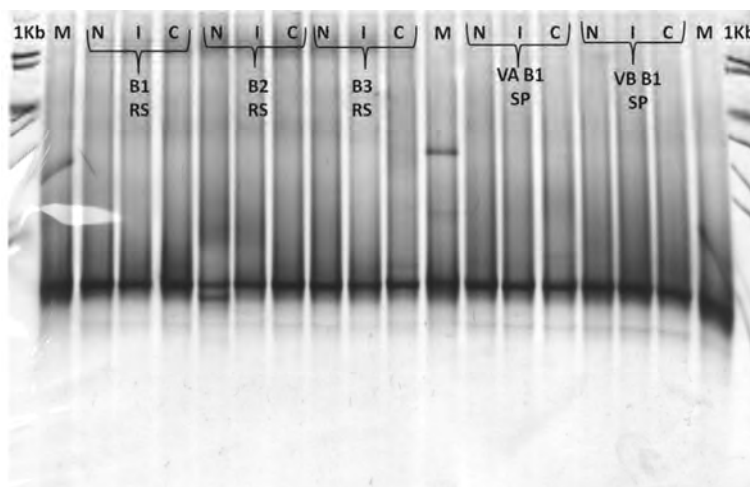


Figura 24: Gel de poliacrilamida (8%) com gradiente desnaturante (45% - 65%). Perfil de DGGE do gene *nifH* das amostras de campo. 1ª Coleta. 1Kb – Marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). M – Marcador, mistura bacteriana (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia tropica*, *G. Johanae* e *Acetobacter liquefaciens*). N – Tratamento Nitrogenado. I – Tratamento Inoculado. C – Tratamento Controle. B1 RS – Bloco 1, Coleta do Estado do Rio Grande do Sul. B2 RS – Bloco 2, Coleta do Estado do Rio Grande do Sul. B3 RS – Bloco 3, Coleta do Estado do Rio Grande do Sul. VA B1 SP – Variedade A, Bloco 1, Coleta do Estado de São Paulo. VB B1 SP – Variedade B, Bloco 1, Coleta do Estado de São Paulo.

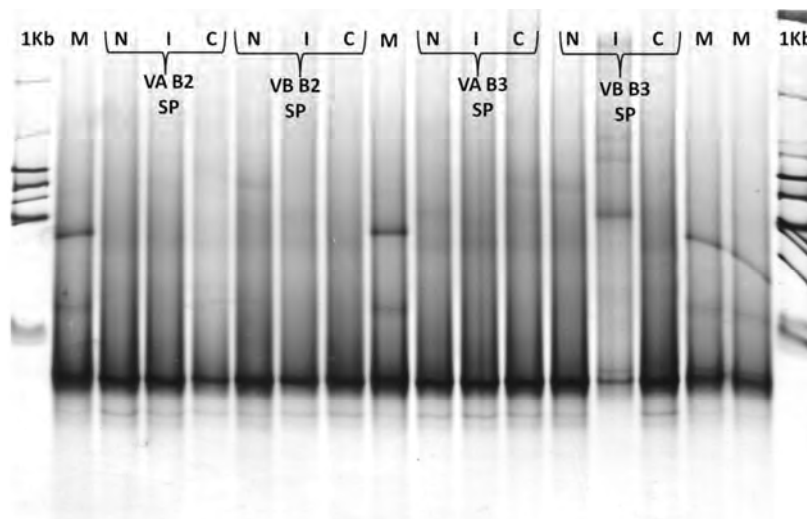


Figura 25: Gel de poliacrilamida (8%) com gradiente desnaturante (45% - 65%). Perfil de DGGE do gene *nifH* das amostras de campo. **1ª Coleta.** 1Kb – Marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). M – Marcador. N – Tratamento Nitrogenado. I – Tratamento Inoculado. C – Tratamento Controle. VA B2 SP – Variedade A, Bloco 2, Coleta do Estado de São Paulo. VB B2 SP – Variedade B, Bloco 2, Coleta do Estado de São Paulo. VA B3 SP – Variedade A, Bloco 3, Coleta do Estado de São Paulo. VB B3 SP – Variedade B, Bloco 3, Coleta do Estado de São Paulo.

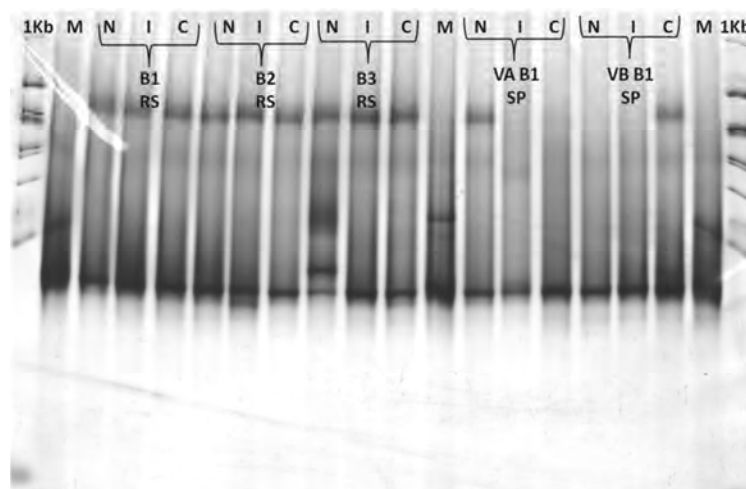


Figura 26: Gel de poliacrilamida (8%) com gradiente desnaturante (45% - 65%). Perfil de DGGE do gene *nifH* das amostras de campo. **2ª Coleta.** 1Kb – Marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). M – Marcador. N – Tratamento Nitrogenado. I – Tratamento Inoculado. C – Tratamento Controle. B1 RS – Bloco 1, Coleta do Estado do Rio Grande do Sul. B2 RS – Bloco 2, Coleta do Estado do Rio Grande do Sul. B3 RS – Bloco 3, Coleta do Estado do Rio Grande do Sul. VA B1 SP – Variedade A, Bloco 1, Coleta do Estado de São Paulo. VB B1 SP – Variedade B, Bloco 1, Coleta do Estado de São Paulo.

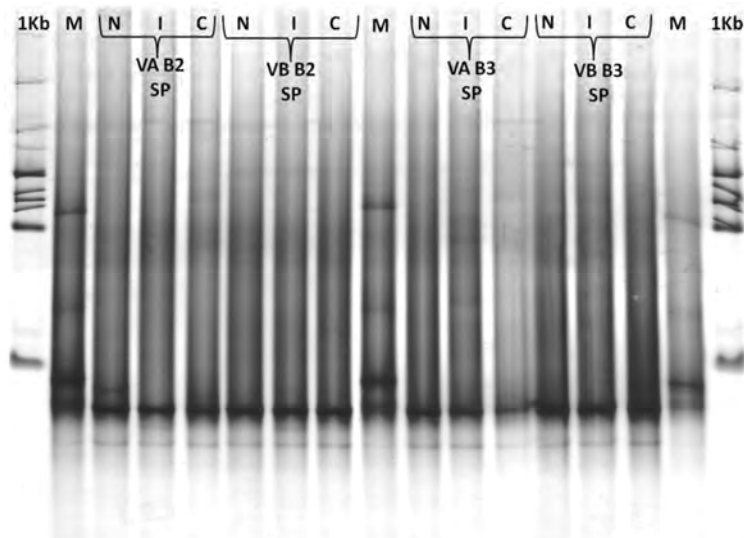


Figura 27: Gel de poliacrilamida (8%) com gradiente desnaturante (45% - 65%). Perfil de DGGE do gene *nifH* das amostras de campo. **2ª Coleta.** 1Kb – Marcador de massa molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). M – Marcador. N – Tratamento Nitrogenado. I – Tratamento Inoculado. C – Tratamento Controle. VA B2 SP – Variedade A, Bloco 2, Coleta do Estado de São Paulo. VB B2 SP – Variedade B, Bloco 2, Coleta do Estado de São Paulo. VA B3 SP – Variedade A, Bloco 3, Coleta do Estado de São Paulo. VB B3 SP – Variedade B, Bloco 3, Coleta do Estado de São Paulo.

4.3 Confirmação do Estabelecimento das Bactérias Diazotróficas Componentes do Inoculante nos Tecidos de Cana-de-Açúcar através do Uso de Mutantes Naturais Resistentes a Diferentes Antibióticos

a) Obtenção de mutantes resistentes através da metodologia de concentração mínima inibitória (CMI)

Foi observado maior resistência das bactérias *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* e *B. tropica* na presença do antibiótico ampicilina (Figura 28). Ainda na Figura 28 observa-se maior sensibilidade da bactéria *H. rubrisubalbicans* aos antibióticos tetraciclina e gentamicina. Contudo, o cloranfenicol foi o antibiótico escolhido para realizar repicagens futuras visando à seleção de colônias com maior nível de resistência devido ao melhor crescimento bacteriano em baixas concentrações. Na Tabela 11 observa-se que a bactéria *H. seropedicae* apresentou maior sensibilidade aos antibióticos tetraciclina, gentamicina e cloranfenicol, porém, o antibiótico escolhido para as repicagens sucessivas foi o ácido nalidíxico, pois permite uma melhor separação entre as duas bactérias já que apresentam uma CMI para este antibiótico mais distante e crescem no mesmo meio de cultivo, o JNFB. Para as demais estirpes bacterianas foram escolhidos os antibióticos que as bactérias apresentaram maior sensibilidade: Tetraciclina para *B. tropica*, Canamicina para *G. diazotrophicus* e Estreptomomicina para *A. amazonense*. Para as bactérias *G. diazotrophicus* (estirpe PAL5) e *A. amazonense* (estirpe CBamC) foi utilizado como referência o trabalho de Oliveira e colaboradores 2009b (Figura 29 e Tabela 11).

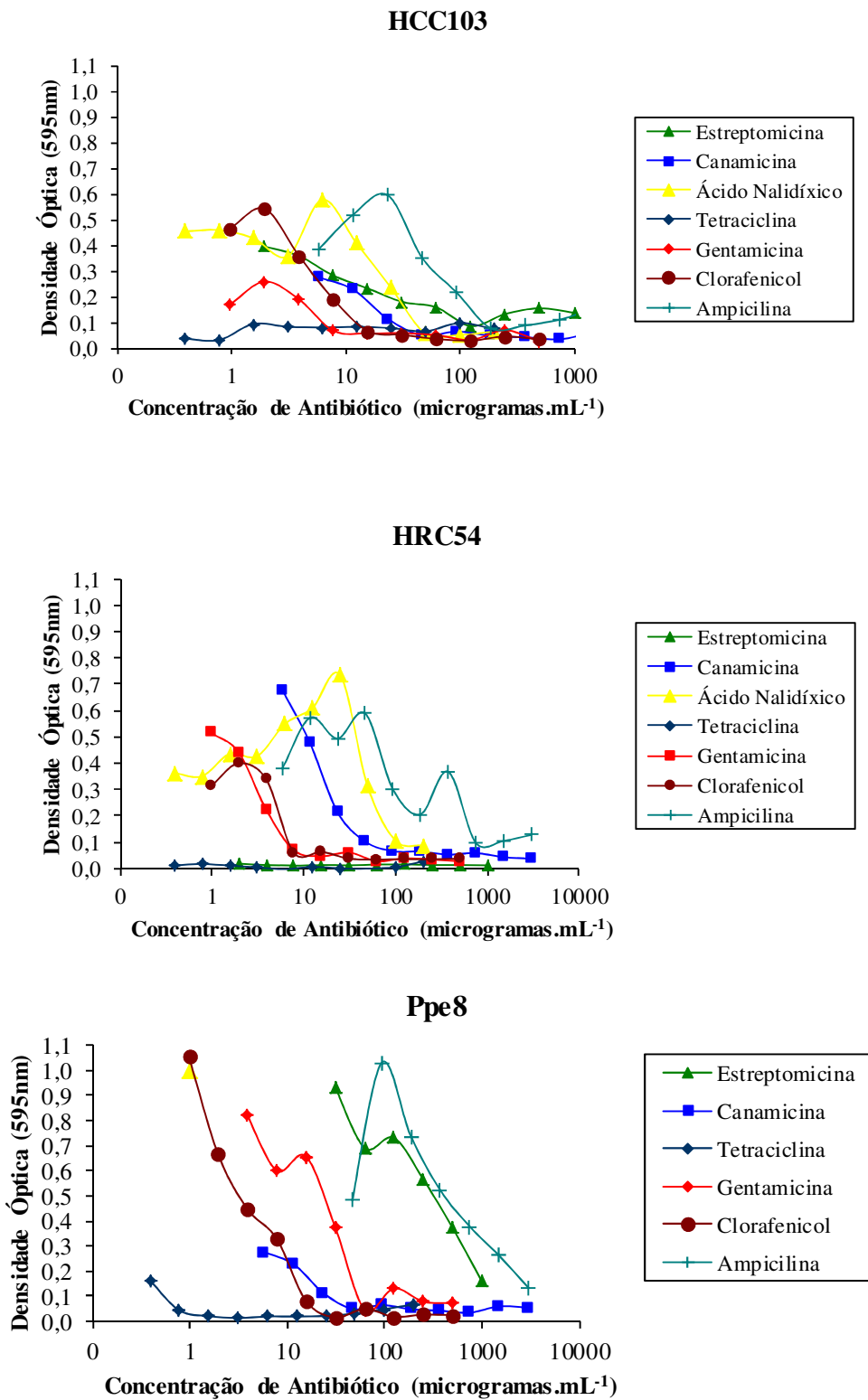


Figura 28: Crescimento bacteriano das estirpes HCC 103 de *H. rubrisubalbicans*, HRC54 de *H. seropedicae* na presença de sete antibióticos.

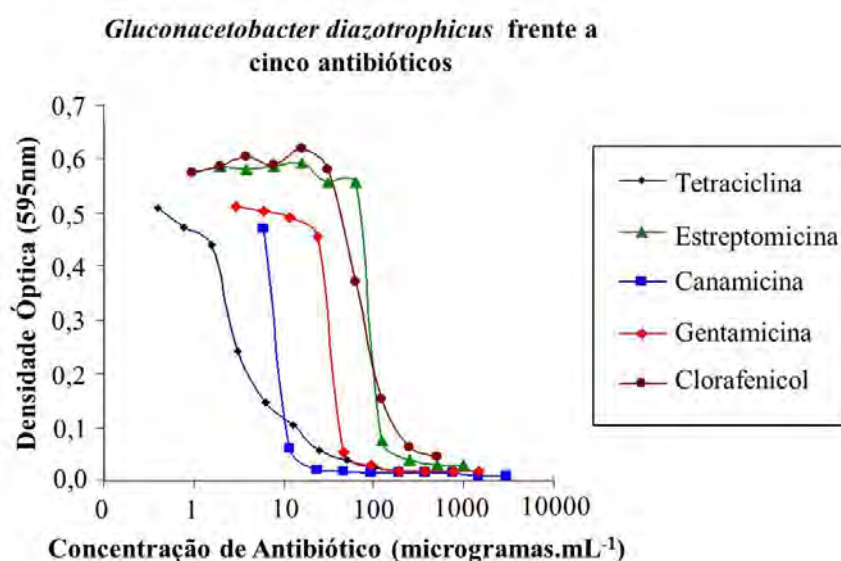


Figura 29: Crescimento de uma estirpe (*G. diazotrophicus* PAL5) frente a cinco antibióticos (Adaptado de Oliveira et al., 2009b)

Tabela 11: Concentração Mínima Inibitória dos antibióticos selecionados para as bactérias *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *G. diazotrophicus*, *A. amazonense* e *B. tropica*.

Espécies bacterianas	CMI (µg/mL)							Referência
	Str	Kan	Nal	Tet	Gen	Chl	Amp	
<i>H. rubrisubalbicans</i>	125,0	46,9	50,0	<0,03	7,8	<u>15,6</u>	375,0	Este trabalho
<i>H. seropedicae</i>	125,0	93,8	<u>200,0</u>	<0,04	7,8	7,8	750,0	
<i>B. tropica</i>	1000,0	93,8	-	<u>0,8</u>	125,0	15,6	3000,0	
<i>G. diazotrophicus</i>	125	<u>12</u>	-	100	47	250	-	OLIVEIRA et al., 2009b
<i>A. amazonense</i>	<u>16</u>	6	-	50	12	8	-	

Str – Estreptomicina; Kan – Canamicina; Tet – Tetraciclina; Gen – Gentamicina; Chl – Cloranfenicol; Amp – Ampicilina.

* Marcações sublinhadas indicam a CMI correspondente ao antibiótico escolhido para induzir resistência em cada estirpe bacteriana.

Foram obtidos mutantes naturais resistentes aos antibióticos selecionados que posteriormente foram utilizados no experimento de inoculação em casa de vegetação.

b) Experimento de inoculação em casa de vegetação com mutantes naturais resistentes a diferentes antibióticos

No monitoramento do estabelecimento de bactérias diazotróficas endofíticas por meio da utilização de mutantes induzidos, inoculados nas plantas de cana sob condições de casa de vegetação, foi observado que aos 50 dias após o plantio, a população bacteriana estava abaixo do limite de detecção da técnica. Aos 90, 120 e 150 dias após o plantio foi observado uma menor população no tratamento controle (Figura 30, Figura 31 e Figura 32).

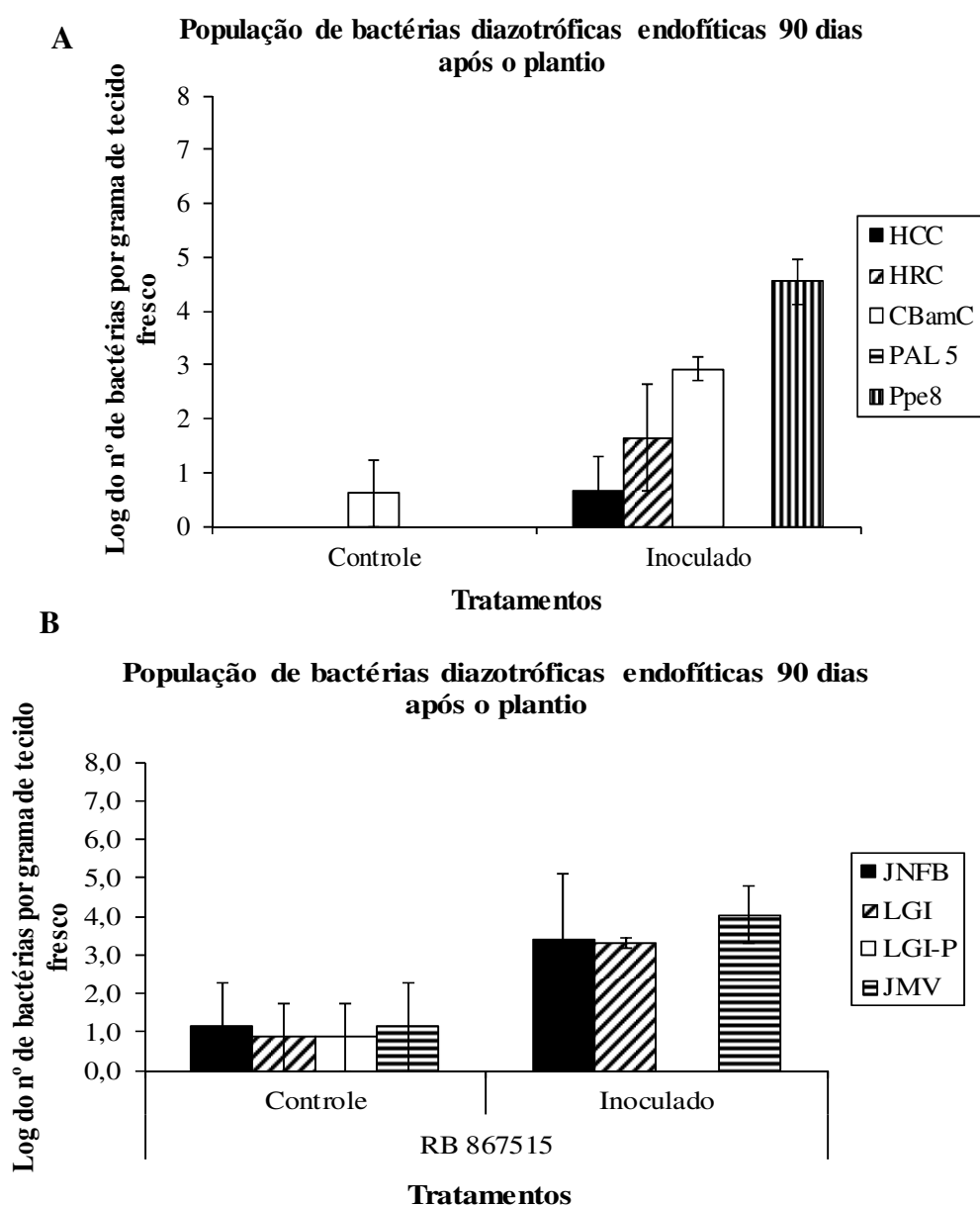


Figura 30: Logaritmo do número de células de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de tecido fresco de plantas de cana-de-açúcar. Variedades RB867515. A – Meios de cultura com antibióticos; B – Meios de cultura sem antibiótico.

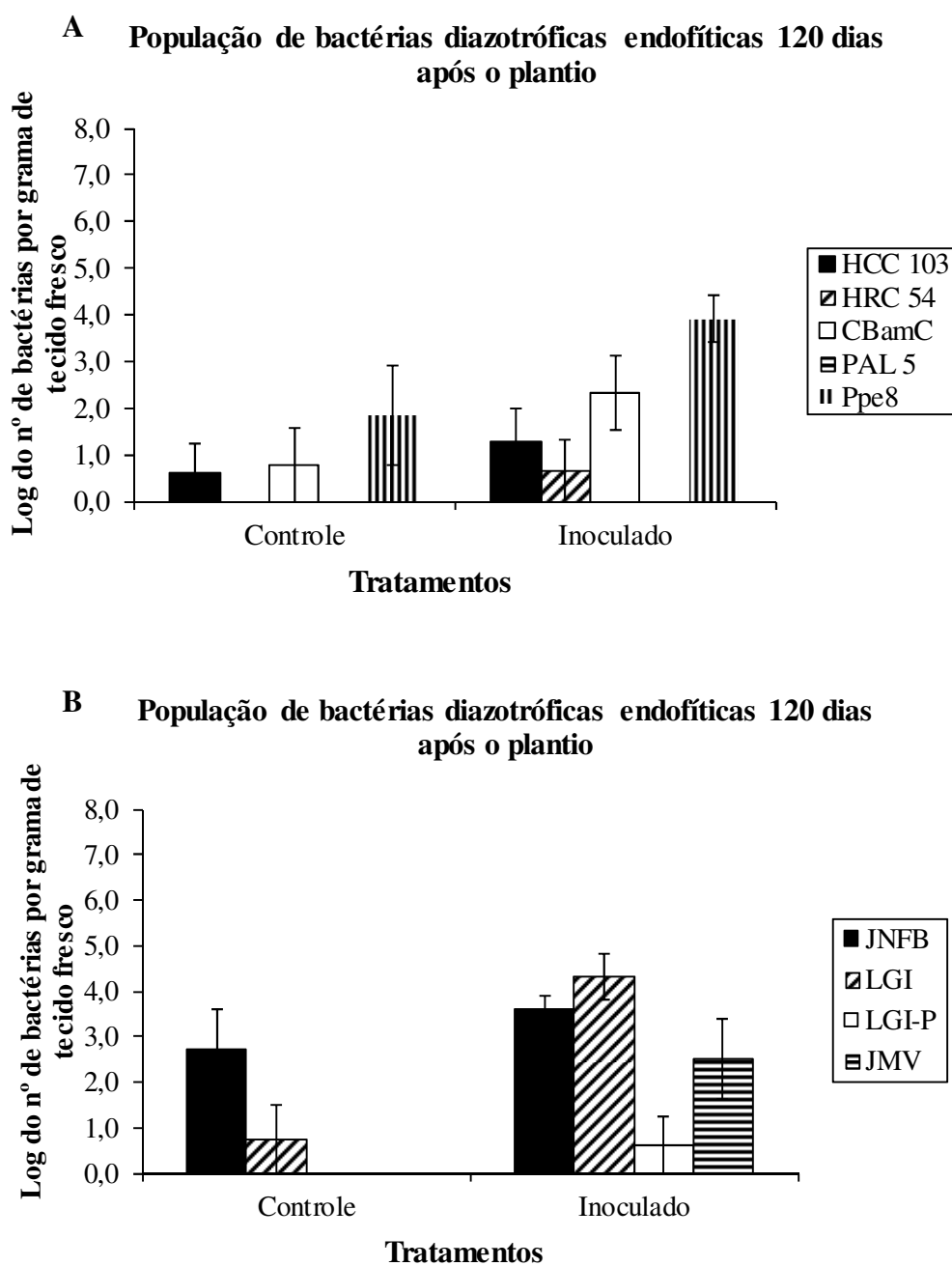


Figura 31: Logaritmo do número de células de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de tecido fresco de plantas de cana-de-açúcar. Variedades RB867515. A – Meios de cultura com antibióticos; B – Meios de cultura sem antibiótico.

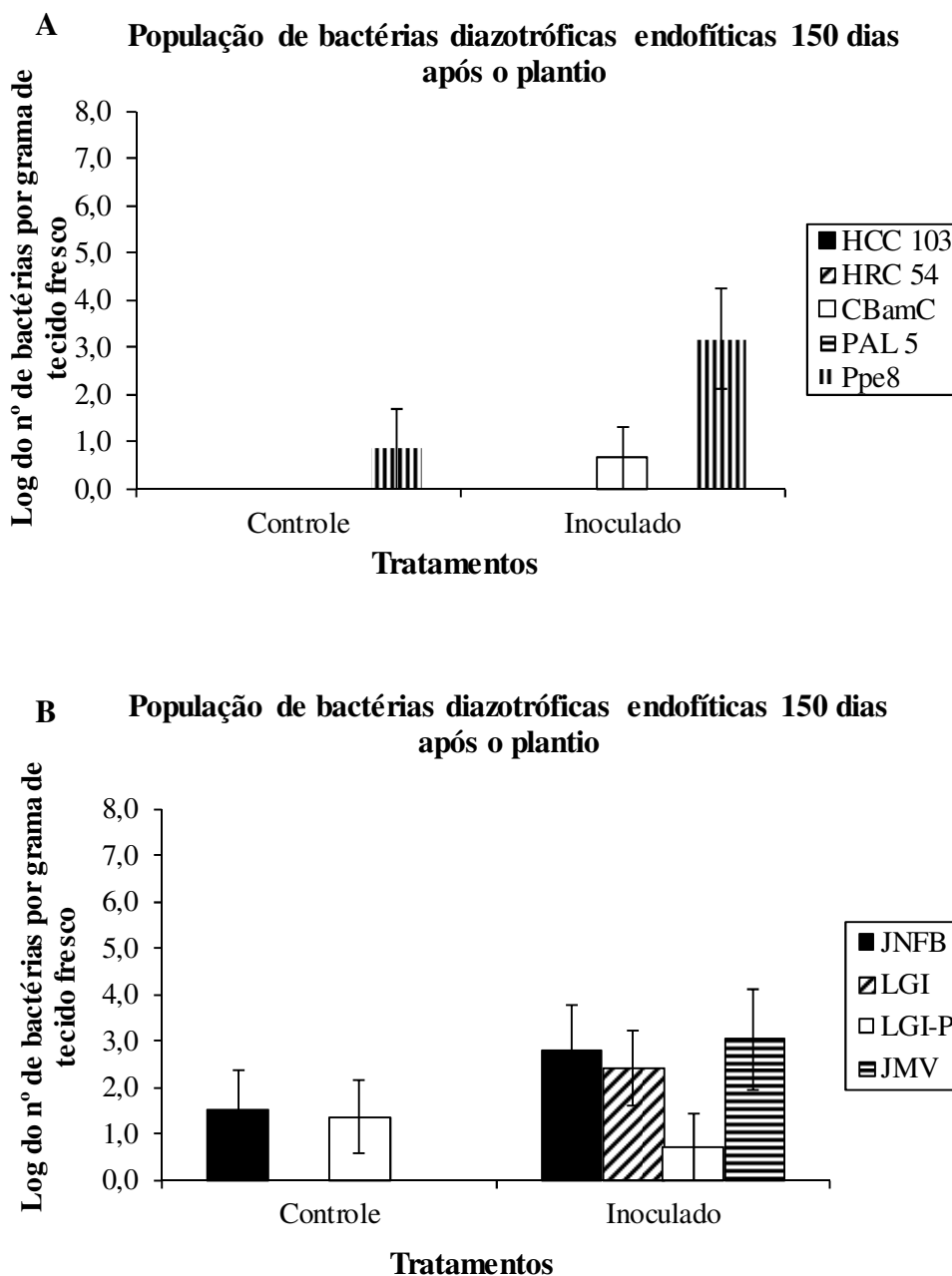


Figura 32: Logaritmo do número de células de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de tecido fresco de plantas de cana-de-açúcar. Variedades RB867515. A – Meios de cultura com antibióticos; B – Meios de cultura sem antibiótico.

Nos meios com antibiótico foi observada uma menor população de bactérias diazotróficas endofíticas, provavelmente devido à ausência da população de estirpes selvagens resistentes que comumente habitam o interior das plantas de cana-de-açúcar. Este fato sugere que a marca de seleção para resistência a antibióticos foi eficiente, pois separa as bactérias inoculadas das pré-existentes nas plantas, possibilitando assim o monitoramento das bactérias inoculadas. Os dados obtidos dos meios sem antibióticos reforçam esta hipótese, apresentando uma maior população bacteriana quando comparados com a população obtida dos meios com antibiótico (Figura 32A).

5 CONCLUSÕES

- As bactérias diazotróficas estudadas foram encontradas colonizando e infectando toda a planta e estão presentes indiscriminadamente nos nós, entrenós e folhas, quando analisadas pelo método do Número Mais Provável.

- Não foi observada diferença estatística na população de bactérias diazotróficas endofíticas presentes nos tecidos das plantas controle e as inoculadas quando avaliados pelas técnicas de NMP e qPCR.

- A técnica de qPCR permitiu a detecção de bactérias diazotróficas endofíticas que não foram quantificadas pela técnica de NMP.

- Os iniciadores utilizados para a detecção do gene *nifH* não mostraram diferença na diversidade de bactérias diazotróficas presentes nas variedades RB867515 e SP813250 de cana-de-açúcar quando avaliadas pela técnica de PCR-DGGE.

- O uso de estirpes marcadas para resistência a antibióticos permitiu confirmar o estabelecimento, em até 150 dias após o plantio, das 5 estirpes utilizadas como inoculante na variedade de cana-de-açúcar RB867515 crescida em condições de casa de vegetação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos com bactérias diazotróficas endofíticas vêm sendo realizados desde a década de 50 com os primeiros trabalhos no Brasil liderados pela Doutora Johanna Döbereiner. Com o avanço dos estudos, foram realizados vários experimentos em outros países além do Brasil, como México, Índia, Alemanha e Argentina dentre outros, reportando aumentos na nutrição nitrogenada, incrementos na produtividade de colmos, resistência a doenças e na sobrevivência de plantas de cana-de-açúcar inoculadas, além de acréscimos no comprimento e volume das raízes. No Brasil, com o isolamento e identificação da bactéria endofítica *G. diazotrophicus* por Cavalcante e Döbereiner (1988), pelo grupo liderado pela Dra Johanna, os estudos de inoculação desta cultura foram intensificados. Com o avanço das pesquisas e dos resultados obtidos, outras bactérias diazotróficas *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*, identificadas por este mesmo grupo foram acrescentadas aos experimentos realizados com esta cultura (OLIVEIRA et al., 2002, 2006).

A mistura dessas cinco bactérias diazotróficas endofíticas foi então recomendada por Reis e colaboradores (2009) para inoculação em cana-de-açúcar. Estas bactérias podem desempenhar um papel importante na agricultura, conferindo vantagens para a planta, como capacidade de transformar o N₂ em amônia através da FBN. Entretanto, o conhecimento da interação dessas bactérias com a planta, sua localização ao longo da planta, já que não há estruturas indicadoras de infecção bacteriana, como nas plantas leguminosas, e o estabelecimento das bactérias inoculadas ainda estavam desconhecidos.

Neste contexto, este trabalho contribuiu para responder a estes questionamentos, proporcionando um melhor entendimento da interação destas bactérias com a planta de cana-de-açúcar. Onde foi possível conhecer os nichos de colonização, além de quantificar por diferentes técnicas a população capaz de infectar e colonizar os tecidos da planta.

Foi realizado ainda, o monitoramento das bactérias efetivamente inoculadas através de mutação espontânea, desta população de diazotrofos, assim avaliando a população cultivável capaz de colonizar as plantas de cana em um período de cinco meses.

Vale ressaltar a realização do primeiro monitoramento da população bacteriana em toda a extensão da parte aérea das plantas de cana, por meio de técnicas de cultivo e análises moleculares, onde pudemos observar que as bactérias do inoculante colonizam a planta inteira, inclusive as folhas.

Neste trabalho, também foi confeccionado iniciadores para PCR em tempo real, capazes de quantificar até 12 células (no caso de *G. diazotrophicus*) nas plantas de cana cultivadas em condições de campo, mostrando assim um grande avanço na detecção desta bactéria, não só em plantas de cana, mas possivelmente em outras plantas e/ou ambientes. Destacando que nesse caso, a população não foi detectada pelo método tradicional com utilização de meios de cultura - NMP. Mostrando assim, a alta eficiência dos iniciadores associada à elevada sensibilidade da técnica de PCR em tempo real.

Entretanto, muito ainda deve ser feito no sentido de buscar soluções elucidativas para que estas bactérias cumpram o seu papel na sustentabilidade da cultura, que é tão importante para o nosso País. Além disso, pode-se ainda e paralelamente continuar a busca por novos isolados em outras variedades, em regiões diferentes, que sejam mais eficientes, seja de forma individual ou em conjunto e que possam ser efetivos nas diferentes regiões sucroalcooleira do Brasil.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. Most probable number method for microbial population. In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R., (Ed.) Methods of soil analysis. ed. Madison: ASA/SSSA, 1982, p.815-820.

AMANN, R.; LUDWIG, W.; SHLEIFER, K. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiology Reviews, v.59, p.143-169, 1995.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.48, p.5-16, 2001.

ASSIS, S. M. P. Antagonismo de *Bacillus spp.* e bactérias endofíticas a *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson em plantas de couve (*Brassica oleraceae* var. *acephala* L.). 1995. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1995. 130f.

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

BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.77, p.549-579, 2005.

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

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculations on root infection and nitrogen incorporation in wheat. Canadian Journal of Microbiology, v.29, p.924-929, 1983.

BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum spp.* no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. 1996. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1996. 235 f.

BALDANI, V. L. D.; ALVAREZ, M. A. DE B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum spp.* in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. Plant and Soil, v.90, p.35-46, 1986a.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of fields grown wheat with *Azospirillum spp.* In Brazil. Biology and fertility of soil, v.4, p.57-60, 1987.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Symbiosis, v.13, p.65-73, 1992.

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and weed seedlings growing in soil. *Microbial Ecology*, v.29, p.269-281, 1995.

BASSLER, H. I.; FLOOD, S. J. A.; LIVAK, K.J.; MARMARO, J.; KNORR, R.; BATT, C.A. Use of fluorogenic probe in a PCR-base assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.3724-3728, 1995.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; DE PADUA, V.; ROUWS, L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANCA, L.; MAGALHAES, V.; ALQUERES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M. M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMAO, T.; MACEDO, J.; VALADAO, A.; DRECHSEL, M.; FREITAS, F.; VIDAL, M.; GUEDES, H.; RODRIGUES, E.; MENESES, C.; BRIOSO, P.; POZZER, L.; FIGUEIREDO, D.; MONTANO, H.; JUNIOR, J.; DE SOUZA FILHO, G.; MARTIN QUINTANA FLORES, V.; FERREIRA, B.; BRANCO, A.; GONZALEZ, P.; GUILLOBEL, H.; LEMOS, M.; SEIBEL, L.; ALVES-FERREIRA, M.; SACHETTO-MARTINS, G.; COELHO, A.; SANTOS, E.; AMARAL, G.; NEVES, A.; PACHECO, A. B.; CARVALHO, D.; LERY, L.; BISCH, P.; ROSSLE, S. C.; URMENYI, T.; RAEI PEREIRA, A.; SILVA, R.; RONDINELLI, E.; VON KRUGER, W.; MARTINS, O.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P. C. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, v.10, p.1-17, 2010.

BODDEY, L. H.; BALDANI, J. I.; GOI, S. R. Localização de *Burkholderia* spp. em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar. in: XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador, BA. Anais e resumos do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia. Sociedade Brasileira de Microbiologia, p.190, 1999.

BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp on the nitrogen assimilation in field grown wheat. *Plant and Soil*, v. 95, p. 109-121, 1986.

BOECKMAN, F.; HAMBY, K.; TAN, L. Real-Time PCR using the iCycler iQ Detection System and Intercalation Dyes. Bio-Rad Tech note 2684 (Amplification). Bio-Rad Laboratories, Inc. 1-2, 2000.

BRIONES JR.; A. M.; OKABE, S.; UMEMIYA, Y.; RAMSING, N. B.; REICHARDT, W.; OKUYAMA, H. Ammonia-oxidizing bacteria on root biofilms and their possible contribution to N use efficiency of different rice cultivars. *Plant and Soil*, v.250, p.335-348, 2003.

CALLAGHAN, M. O.; GERARD, E.M.; HEILIG, G.H. J.; ZHANG, H.; JACKSON, T. A.; GLARE, T.R. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – A Tool For Plant Protection Research. *New Zealand Plant Protection*, v.56, p.143-150, 2003.

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

CHONG, C. W.; ANNIE TAN, G. Y.; WONG, R. C. S.; RIDDLE, M. J.; TAN, I. K. P. DGGE Fingerprinting of bacteria in soils from eight ecologically different sites around Casey Station, Antarctica. *Polar Biology*, v.32, p.853-860, 2009.

CHURCH, M. J.; JENKINS, B. D.; KARL, D. M.; ZEHR, J. P. Vertical distributions of nitrogen-fixing phylotypes at Stn ALOHA in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Aquatic Microbial Ecology*, v.38, p.3-14, 2005a.

CHURCH, M. J.; SHORT, C. M.; JENKINS, B. D.; KARL, D. M. & ZEHR, J. P. Temporal patterns of nitrogenase gene (*nifH*) expression in the oligotrophic north pacific ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, p.5362-5370, 2005b.

COCHRAN, W. G. Estimation of bacterial densities by means of the most probable number. *Biometrics*, v.6, p.105-116, 1950.

COELHO, M. R. R.; MARRIEL, I. E.; JENKINS, S. N.; LANYON, C. V.; SELDIN, L.; O'DONNE A. G. Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. *Applied Soil Ecology*, v.42, p.48-53, 2009.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - CQFSRS/SC. Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. 10.ed. Porto Alegre, SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400p.

CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Report*, v.19, p.299-306, 2001.

CUBERO, J. & GRAHAM J. H. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.1257-1264, 2002.

DESJARDIN, L. E.; CHEN, Y.; PERKINS, M. D.; TEIXEIRA, L.; CAVE, M. D.; EISENNACH, K. D. Comparison of the ABI 7700 system (Taqman) and competitive PCR for quantification of IS 6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. *Journal Clinical Microbiology*, v.36, p.1964-1968, 1998.

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

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI; Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB. 1995, 60 p.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen fixing sites. In: *Proceedings of the First International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington State University Press, Pullman, USA, p. 518-538, 1976.

DOLKEN, L.; SCHULER, F.; DOLKEN, G. Quantitative detection of t (14;18)-positive cell by real-time quantitative PCR using fluorogenic probes. *Biotechniques*, v.6, p.1058-1064, 1998.

DONAGHY, J. A.; JOHNSTON, J.; ROWE, M. T. Detection of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis in cheese, milk powder and milk using IS900 and f57-based qPCR assays. *Journal of Applied Microbiology*, v.110, p.479–489, 2010.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; MCCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. R.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. *Plant Physiology*, v.105, p.1139–1147, 1994.

DONG, Z.; HEYDRICH, M.; BERNARD, K.; McCULLY, M. E. Further evidence that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.1743-1846, 1995.

DOYLE, J. J. & DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *PhytochemBull*, v.19, p.11-15, 1987.

FELTEN, A. V.; DÉFAGO, G.; MAURHOFER, M. Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHA0 and Pf153 in the rhizosphere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency. *Journal of Microbiological Methods*, v.81, p.108–115, 2010.

FERREIRA, J. S. Inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado: qualidade do inoculante e necessidade da reinoculação. 2008 Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.2008, 69f.

FRANKE-WHITTLE, I. H.; O'SHEA, M. G.; LEONARD, G. J.; WEBB, R. I.; SLY, L. I. Investigation into the ability of *Gluconacetobacter sacchari* to live as an endophyte in sugarcane. *Plant and Soil*, v.29, p.271-285, 2005.

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

FUENTES-RAMIREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPULVEDA-SANCHEZ, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Location of *Acetobacter diazotrophicus* in inoculated sugarcane stem by GUS detection. In: 11th International Congress on Nitrogen Fixation. Abstract 13, 1997.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant and Soil*, v.154 (2), p.145-150, 1993.

GALISA, P. S.; DA SILVA, A. H.; MACEDO, A. V. M.; REIS, V. M.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L. Identification and validation of reference genes to study the gene expression in *Gluconacetobacter diazotrophicus* grown in different carbon sources using RT-qPCR. *Journal of Microbiology Methods*, v.91(1), p.1-7. 2012.

GARCIA DE SALAMONE, I. E.; SALVO, L. P.; ESCOBAR O.; JHOVANA S.; BOA SORTE, P. M. F.; URQUIAGA, S.; TEIXEIRA, K. R. S. Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. *Plant and Soil*, v.336, p.351-362, 2010.

GARCIA-PICHEL, F.; LÓPEZ-CORTÉS, A.; NÜBEL, U. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crusts from the Colorado plateau. *Applied and environmental microbiology*, v.67(4), p.1902-1910, 2001.

GELSOMINO, A.; KEIJZER-WOLTERS, A. C.; CACCO G.; VAN ELSAS, J. D. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, v.38, p.1-15, 1999.

GOMES, A. A. Distribuição de carboidratos e Nitrogênio em cana-de-açúcar (*saccharum spp*) em associação com bactérias diazotróficas endofíticas. Tese (Doutorado em Agronomia - Fitotecnia). Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.120f.

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

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real Time quantitative PCR. *Genome Research*, v.6, p.986-994, 1996.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: VAN ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (Eds.), *Modern Soil Microbiology*, Marcel Dekker, New York, 1997. p. 353–373.

HIGGINS, J. A.; EZZELL, J.; HINNEBUSCH, B. J.; SHIPLEY, M.; HENCHAL, E.A.; IBRAHIN, M.S. 5' nuclease PCR assay to detect *Yersinia pestis*. *Journal Clinical Microbiology*, v.36, p.2284-2288, 1998.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplifications reactions. *Bio/Technology*, v.11, p.1026-1030, 1993.

HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. *The College of Agriculture*, 1950. 32p. (Circular, 347).

JAMES, E. & OLIVARES, F. L. Infection and Colonization of Sugar Cane and Other Gramineous Plants by Endophytic Diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.17, p.77-119, 1998.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. *Journal of Experimental Botany*, v.48, p.785-797, 1997.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. Journal of Experimental Botany, v.45, p.757-766, 1994.

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

JUNG, M.Y.; CHANG, Y. H.; KIM, W. A real-time PCR assay for detection and quantification of *Lactococcus garvieae*. Journal of Applied Microbiology, v.108, p.1694-1701, 2010.

JURAEVA, D.; GEORGE, E.; DAVRANOV, K.; RUPPEL, S. Detection and quantification of the *nifH* gene in shoot and root of cucumber plants. Canadian Journal of Microbiology, v.52, p.731-739, 2006.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; SANTOS, J. C. P.; BERTON-JUNIOR, J. F. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. Soil & Tillage Research, v.87, n.2, p.205-217, 2006.

KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. Canadian Journal of Microbiology, v.44(1), p.12-19, 1998.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. Plant and soil, v.273, p. 91-99, 2005.

LACAVAL, P. T. and AZEVEDO, J. L. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo de ecologia microbiana. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.) Microbiologia Ambiental. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, Brasil. p.107-124, 008.

LACAVAL, P. T.; LI, W. B.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; HARTUNG, J. S. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants. Journal of Microbiological Methods, v.65, p.535-541, 2006.

LAMBERTZ, S. T.; NILSSON, C.; HALLANVUO, S.; LINDBLAD, M. Real-time PCR method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in food. Applied Environmental Microbiology, v.74, p.6060-6067, 2008.

LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature, v.442 (7104), p.806-809, 2006.

LI, R. P. & MACRAE, I. C. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. Soil Biology & Biochemistry, v.23, p. 999-1002, 1992.

- LIN, S. Y.; SHEN, F. T.; YOUNG, C. C. Rapid detection and identification of the free-living nitrogen fixing genus *Azospirillum* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.99, p.837–844, 2011.
- LLOYD-JONES, G. & HUNTER, D. W. F. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v.33, p. 2053-2059, 2001.
- LÓPEZ, N. I.; HAEDO, A. S. & MÉNDEZ, B. S. Evaluation of *Xanthomonas campestris* survival in a soil microcosm system. *International Microbiology*, v.2, p.111-114, 1999.
- LOPEZ-CORTES, L. F.; RUIZ, R.; VICIANA, P. Pharmacokinetic interactions between rifampin and efavirenz in patients with tuberculosis and HIV infection. In: Program and abstracts of the 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections; February 4-8, Chicago, Illinois. Abstract 32, 2001.
- MACGREGOR, B. J.; Molecular approaches to the study of aquatic microbial communities. *Current Opinion in Biotechnology*, v.10, p.220–224, 1999.
- MACNAUGHTON, S. J.; STEPHEN, J. R.; VENOSA, A. D.; DAVIS, G. A.; CHANG, Y. J.; WHITE, D. C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied Environmental Microbiology*, v.65, p.3566-3574, 1999.
- MAGALHÃES, F. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciência*, v.55, p.417-430,1983.
- MARIANO, R. L. R. & McCARTER, S. M. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato and weeds. *Fitopatologia Brasileira*, v.16, p.86-91, 1991a.
- MARIANO, R. L. R. & McCARTER, S. M. Epiphytic survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato and weeds. *Fitopatologia Brasileira*, v.16, p.92-97, 1991b.
- MARIANO, R. L. R. & McCARTER, S. M. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species. *Microbial Ecology*, v.26, p.47-58, 1993.
- McCRADY, M. H. The numerical interpretation of fermentation-tubes results. *Journal of Infectious Diseases*, v.17, p.183-212, 1915.
- MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. Isolation and identification of *Gluconacetobacter azotocaptans* from corn rhizosphere. *Systematic and Applied Microbiology*, v.29, p.496-501, 2006.
- MENESES, C. H. S. G.; ROUWS, L. F. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the Nitrogen-Fixing Endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.24, p.1448-1458, 2011.
- MUELLER-DOMBOIS, D. & ELLEMBERG, H. Aims and methods of vegetation ecology. *Jonh Wiley*, v.1, p.1-547, 1974.

- MUNOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial Ecology*, v.46, p.454-464, 2003.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; CLEENWERCK, I.; REVATHI, G.; VADIVELU, M.; JANSSENS, D.; HOSTE, B.; GUM, K. U.; PARK, K. D.; SON, C. Y.; SA, T.; CABALLERO-MELLADO, J. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Systematic and Applied Microbiology*, v.28, p.277–286, 2005.
- MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. *Biology and Fertility of Soils*, v.29, p.157–164, 1999.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, p.695 – 700, 1993.
- MUYZER, G.; HOTTENTRÄGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA: A new molecular approach to analyze the genetic diversity of mixed microbial communities. In: AKKERMANS, A. D. L.; VAN ELSAS, J. D.; DE BRUIJN, F.J. (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer, Dordrecht, 1996, p.1–27.
- NATHEER, S. E. & MUTHUKKARUPPAN, S. Assessing the in vitro zinc solubilization potential and improving sugarcane growth by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Annals of Microbiology*, v.62, p.435-441, 2012.
- NJOLOMA, J.; TANAKA, K. SHIMIZU, T.; NISHIGUCHI, T.; ZAKRIA, M.; AKASHI, R.; OOTA, M.; AKAO, S. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum* sp B501gfp1. *Biology and Fertility of Soils*, v.43, p.137–143, 2006.
- NÜBEL, U.; ENGELEN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, v.178, p.5636–5643, 1999.
- OKON, Y. & KAPULNIK, Y. Development and function of Azospirillum-inoculated roots. *Plant and Soil*, v.90, p.3-16, 1986.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, v.21, p.197–200, 1996.
- OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S. S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant and soil*, v.284, p.23-32, 2006.

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

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S. S.; DOBEREINER, J. ; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*, v.242, p.203-215, 2002.

OLIVEIRA, T. F.; FERREIRA, J. S.; BOA SORTE, P. M. F.; REIS, V. M.; BALDANI, J.I.; SCHWAB, S. Concentração mínima inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia (2009b). *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - Embrapa Agrobiologia*, v.49, p.01.

PAHL, A.; KUHLEBRANDT, U.; BRUNE, K.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSNER, A. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. *Journal Clinical Microbiology*, v.37, p.1958-1963, 1999.

PEDRAZA, R. O.; BELLONE, C. H.; BELLONE, S. C.; BOA SORTE, P. M. F.; TEIXEIRA, K.R.S. . *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *European Journal of Soil Biology*, v.45, p.36-43, 2009.

PEREIRA, J. A. R.; CAVALCANTE, V. A.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Field Inoculation of Sorghum And Rice With *Azospirillum* spp And *Herbaspirillum Seropedicae*. *Plant and Soil*, v.10, p.269-274, 1988.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPOLITO, G. S.; SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. *Revista Ciência Agronômica (UFC. Impresso)*, v.44, p.363-370, 2013.

PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, p.763-770, 2004.

PIRES-ALVES, M. & NOVAIS, C. M. PCR em Tempo Real. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, v.33, p.10-13, 2004.

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

RAMOS, H. J. O.; RONCATO-MACCARI, L. D. B.; SOUZA, E. M.; SOARES-RAMOS, J. R. L.; HUNGRIA, M.; PEDROSA, F. O. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. *Journal of Biotechnology*, v.97, p.243-252, 2002.

REIS JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. S.; DOBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and

Acetobacter diazotrophicus in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant and soil*, v.219, p.153-159, 2000a.

REIS JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. S.; DOBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, p.985-994, 2000b.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. Recomendação de uma mistura deestirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 113435), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366). Seropédica, Embrapa Agrobiologia. 2009. 4p. (Circular Técnica).

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; DOBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.10, p.401-405, 1994.

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

REIS, V. M.; SANTOS, P. E. L.; SALGADO, S. T.; VOGEL, J.; STOFFLES, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; MELLADO, J. C. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.54, p.2155-2162, 2004.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, v.1, p.16-20, 1986.

ROSADO, A. S.; VAN ELSAS, J. D.; SELDIN, L. Reclassification of *Paenibacillus durum* (formerly *Clostridium durum* Smith and Cato (1974) Collins et al. 1994 as a member of the species *P. azotofixans* (formerly *Bacillus azotofixans* Seldin et al.) Ash et al. 1994. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.47, p.569-572, 1997.

ROSENBAUM, V. & RIESNER, D. Temperature gradient gel electrophoresis: thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts. *Biophysical Chemistry*, v.26, p.235-246, 1987.

ROUWS, L. F. M.; MENESES, C. H. S. G.; GUEDES, H. V.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I.; SCHWAB, S. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. *Letters in Applied Microbiology*, v.51, p.325-330, 2010.

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

SAILS, A. D.; FOX, A. J.; BOLTON, F. J.; WAREING, D. R.; GREENWAY, D. L. A real-time PCR assay for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Applied Environmental Microbiology*, v.69, p.1383–1390, 2003.

SALA, V. M. R. Resposta da cultura do trigo aos novos endófitos, *Achromobacter* e *Zoogloea*, em condições de campo. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP. 2006.139f.

SAUVAGE, H.; MOUSSART, A.; BOIS, F.; TIVOLI, B.; BARRAY, S.; LAVAL, K. Development of a molecular method to detect and quantify *Aphanomyces euteiches* in soil. *FEMS Microbiology Letters*, v.273, p.64–69, 2007.

SCHLOTTER, M.; HARTMANN, A. Production and characterization of strain-specific monoclonal antibodies against outer membrane components of *Azospirillum brasilense* Sp245. *Hybrid*, v.15, p.225-232, 1996.

SELLECK, R.; JIMENEZ, O.; AIZPURUA, C.; FERNANDEZ-FRUTOS, B.; DE LEON, P.; CAMACHO, M.; FERNANDEZ-MOREIRA, D.; YBARRA, C.; CABRIA, C. J. Recovery of *Francisella tularensis* from soil samples by filtration and detection by real-time PCR and ELISA. *Journal of Environmental Monitoring*, v.10, p.362–369, 2008.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N_2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and *nif* mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.14, p.358-366, 2001.

SHIME-HATTORI, A.; KOBAYASHI, S.; IKEDA, S.; ASANO, R.; SHIME, H.; SHINANO, T. A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v.111, p.915–924, 2011.

SHORT, S. M. & ZEHR, J. P. Quantitative analysis of *nifH* genes and transcripts from aquatic environments. *Methods Enzymology*, v.397, p.380-394, 2005.

SIEVERS, M.; SCHLEGEL, H. G.; CABALLERO-MELLADO, J.; DÖBEREINER, J.; LUDWIG, W. Phylogenetic identification of two major nitrogen-fixing bacteria associated with sugarcane. *Systematic and Applied Microbiology*, v.21, p.505-508, 1998.

SILVA, L. G. *Estudos da colonização em cana-de-açúcar (Saccharum spp.) por Gluconacetobacter diazotrophicus e Herbaspirillum spp. utilizando técnicas imunológicas*. 1999. Tese (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio Janeiro, Seropédica, RJ 1999.122f.

SILVA, M. F. & REIS, V. M. Técnica de adsorção para obtenção de soro policlonal estirpe específico de bactérias diazotróficas. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2005. 10p. (Comunicado Técnico 76).

SILVA, N. & GORING, D. The praline-rich, extension-like receptor kinase 1 (PERK1) gene is rapidly induced by wounding. *Plant Molecular Biology*, v.50, p. 667-685, 2002.

- SILVA-FROUFE, L. G.; BODDEY, R. M.; REIS, V. M. Quantification of natural populations of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum spp.* in sugar cane (*Saccharum spp.*) using different polyclonal antibodies. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, p.866-878, 2009.
- SOARES, R. S.; ROESCH, L. F. W.; ZANATTA, G.; CAMARGO, F. A. O.; PASSAGLIA, L.M.P. Occurrence and distribution of nitrogen fixing bacterial community associated with oat (*Avena sativa*) assessed by molecular and microbiological techniques. *Applied Soil Ecology*, v.33, p.221-234, 2006.
- SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A. K.; YADAV, R. L. Improving Sugarcane Growth and Nutrient Uptake by Inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Plant and soil*, v.47, n.2-3, p.155-162, 2005.
- TESKE, A.; SIGALEVICH, P.; COHEN, Y.; MUYZER, G. Molecular identification of bacteria from a coculture by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA fragments as a tool for isolation in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, v.62, p.4210-4215, 1996.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v.22, p.4673-4680, 1994.
- TIMMUSK, S.; PAALME, V.; LAGERCRANTZ, U.; NEVO, E. Detection and quantification of *Paenibacillus polymyxa* in the rhizosphere of wild barley (*Hordeum spontaneum*) with real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v.107, p.736-745, 2009.
- TORSVIK, V.; VREÁS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic Diversity-Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. *Science*, v.296, p.1064-1066, 2002.
- TRABELSI, D.; PINI, F.; AOUANI, M. E.; BAZZICALUPO, M.; MENGONI, A. Development of real-time PCR assay for detection and quantification of *Sinorhizobium meliloti* in soil and plant tissue. *Letters in Applied Microbiology*, v.48, p.355-361, 2009.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of America Journal*, v.56, p.105-114, 1992.
- VANDE BROEK, A. & VANDERLEYDEN, J. Review: Genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *Critical Review of Plant Science*, v.14, p.445-466, 1995.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; de BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cell Biology*, v.5, p.25-40, 1994.
- WELLER, A.; ELPHINSTONE, J. G.; SMITH, N. C.; BOONHAM, N.; STEAD D. E. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.2853-2858, 2000.

WINTZINGERODE, F.; GÖBEL, U. B.; STACKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Review*, v.21, p.213–229, 1997.

YANG, C.; JIANG, Y.; HUANG, K.; ZHU, C.; YIN, Y. Application of real-time PCR for quantitative detection of *Campylobacter jejuni* in poultry, milk and environmental water. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v.38, p.265–271, 2003.