

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA –
CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Estudo da Comunidade de Bactérias Diazotróficas
Associada a Plantas de Capim-Elefante**

Sandy Sampaio Videira

2012



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

ESTUDO DA COMUNIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ASSOCIADA A PLANTAS DE CAPIM-ELEFANTE

SANDY SAMPAIO VIDEIRA

Sob a Orientação da professora

Vera Lúcia Divan Baldani

e Co-orientação dos pesquisadores

Jean Luiz Simões de Araújo e

Segundo Sacramento Urquiaga Caballero

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora em**
Ciências, no curso de Pós-Graduação
em Agronomia, Área de Concentração
em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2012

579.3
V652e
T

Videira, Sandy Sampaio, 1981-

Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas associada a plantas de capim-elefante / Sandy Sampaio Videira – 2012. 105 f. : il.

Orientador: Vera Lúcia Divan Baldani.

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

Bibliografia: f. 82-102.

1. Bactérias - Teses. 2. Bactérias diazotróficas – Estudo de casos - Teses. 3. Capim-elefante – Teses. I. Baldani, Vera Lúcia Divan, 1954-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. 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

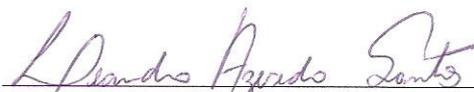
SANDY SAMPAIO VIDEIRA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo, como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** em Agronomia.

TESE APROVADA EM 15/02/2012.



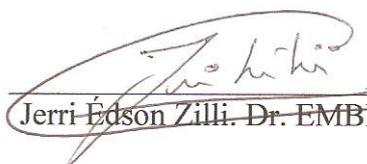
Vera Lúcia Divan Baldani. Dra. EMBRAPA AGROBIOLOGIA
(Orientadora)



Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ



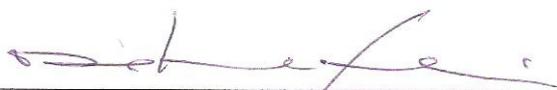
Bruno José Rodrigues Alves. Dr. EMBRAPA AGROBIOLOGIA



Jerri Edson Zilli. Dr. EMBRAPA AGROBIOLOGIA



Silvia Regina Goi. Ph.D. UFRRJ



Deise Ferreira Xavier. Dra. EMBRAPA GADO DE LEITE

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
Eliane Sampaio e José L. Videira,
pelo amor que nos une, constante carinho e
dedicação; por minha formação e, por estarem
sempre ao meu lado.*

*A Antonio Carlos da S. Oliveira,
pela paciência, compreensão, apoio e companheirismo
durante todo o nosso convívio.*

AGRADECIMENTOS

Nos últimos quatro anos, aprendi muitas lições e atingi inúmeras metas em minha vida, e muitas foram às pessoas que compartilharam para meu crescimento profissional e pessoal. Neste momento tão especial, gostaria de agradecer-las pela companhia, compreensão, amizade, incentivo e aprendizado.

Aos meus pais, Eliane e José Luiz, pelo amor e apoio incondicional. Vocês foram os alicerces fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. Espero que um dia possa retribuir pelo menos um pouquinho de tudo o que recebi de vocês.

Ao Antonio Carlos por estar sempre presente, mesmo a milhas e milhas de distância; pelo carinho, incentivo, paciência e amor ao longo de tantos anos.

A família Sampaio e Videira, incluindo os queridos agregados e em especial a minha eterna vovó Cici, que mais do que ninguém, sabe o quanto este estudo foi especial para mim. Vocês são maravilhosos!

A família Oliveira por serem tão especiais e me tratarem com tanto carinho.

Aos pequeninos Raianny, Nina Sarah, Guilherme, Annabel e Sofia por tornarem minha vida muito mais divertida.

Aos amigos-irmãos Bia, Jaime, Re, Cel e Patty, pela amizade, apoio e incentivo durante anos de convívio. Apesar da distância entre nós, vocês são realmente especiais!

*"Uma atmosfera amorosa em sua casa é a base de sua vida."
(Dalai-Lama)*

A Prof^a. Dr^a. Vera Baldani por ter me orientado, tranquilizado e incentivado para que eu pudesse cumprir as minhas metas acadêmicas e pessoais; pela confiança e amizade nestes onze anos de convivência.

Aos Profs. Drs. Jean Luiz Simões de Araújo e Segundo Urquiaga pela co-orientação e pelas valiosas críticas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a Joana Falcão Salles, pela supervisão, ensinamentos e confiança durante o estágio realizado na Universidade de Groningen, Holanda.

Ao Prof. Dr. Ivo Baldani pela gratificante amizade, paciência, dedicação e apoio incondicional durante todo o desenvolvimento desta tese.

*"A capacidade pouco vale, sem a oportunidade"
(Napoleão Bonaparte)*

Aos funcionários e amigos dos Laboratórios de Gramíneas e Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia: Wilson, Lúcio, Pat Gitahy; German, Danilo, Ana Paula, Gabriela,

Daniele, Cecília, Fabrício, Valfredo, Renan, Esdras, Patty, Paulo, Carlos, Leona, Aline, Helma e aos demais alunos e agregados, não menos importantes, pelo convívio diário e ajuda.

Gostaria de fazer um agradecimento especial ao meu querido amigo Péricles Galisa... Obrigada pela convivência, pelo auxílio nas coletas e preparo de amostras e, principalmente, pela amizade e momentos de descontração durante a realização deste trabalho. Você estará sempre em meu coração. Fique em Paz...

Ao Geraldo Baeta, pela grande amizade e pelos momentos de alegria ao longo desses anos.

As Dr^{as} Márcia Vidal, Verônica Reis e Marcia Reed, por serem sempre tão atenciosas e solícitas, pela simplicidade, gentileza e ajuda. Vocês jamais serão esquecidas.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade de Groningen, Özgül, Miao, Pilar, Rashid, Riita, Stéphanie, Sasha, Silvia, Jolanda, Dr^a.Joana F. Salles e Dr. Jan Dirck van Elsas pela amizade e ajuda nos laboratórios. Cheers!

Aos amigos Brasileiros na Holanda, Michele Pereira e Silva e Armando Dias pelas discussões construtivas, amizade, divertido convívio e por compartilharem meu “sofrimento” durante o período que trabalhamos juntos. Nós somos uma ótima equipe!

A Joana F. Salles pela amizade, generosidade e pelos churrascos à moda holandesa com os adoráveis Lars, Mees e Pim.

Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só.
(Amir Klink)

Aos membros da banca, Profs. Drs. Leandro A. Santos, Bruno J. R. Alves, Jerri Édson Zilli, Silvia Regina Goi e Deise F. Xavier. Obrigada pela disponibilidade e interesse por conhecer meu estudo.

Aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo e da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela assistência durante minha vida acadêmica e pela dedicação e esforço em manter a qualidade do curso.

A Embrapa Agrobiologia pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro que permitiram dedicar-me integralmente à pesquisa que agora concluo.

Por fim, mas não por último, agradeço à *Deus* por sempre me iluminar e guiar.

Parafrazeando Chico Xavier, “*Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar...*”

Muito Obrigada =D

BIOGRAFIA

SANDY SAMPAIO VIDEIRA, filha de José Luiz Videira e Eliane Sampaio Videira, nasceu em 02 de abril de 1981 na Cidade do Rio de Janeiro. Ingressou no Centro Federal de Educação Tecnológica de Química de Nilópolis/RJ, concluindo o curso técnico em Saneamento Básico no ano de 2001. Formada em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 2006. Durante a graduação foi estagiária da Embrapa Agrobiologia, e posteriormente, bolsista de iniciação científica do CNPq, na área de Microbiologia e Bioquímica do Solo, de 2001 a 2006. Em março de 2006 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo da UFRRJ, onde iniciou o mestrado como bolsista do CNPq no primeiro ano. No segundo ano foi selecionada, por mérito, como bolsista do Edital Bolsa Nota 10 da FAPERJ, no segundo ano, em Fevereiro de 2008 defendeu a dissertação *Taxonomia Polifásica de Bactérias Diazotróficas do Gênero Sphingomonas e Efeito da Inoculação em Plantas de Arroz*, desenvolvida na Embrapa Agrobiologia sob a orientação da Prof. Dr. Vera Baldani. Neste mesmo ano foi aprovada e selecionada no curso de doutorado do CPGA-CS/UFRRJ, ainda sob a orientação da Prof. Dr. Vera Baldani. Durante o último ano do curso de doutorado, seu projeto foi selecionado pela FAPERJ para Estágio de Doutorado no Exterior (Doutorado-sanduíche). Na Universidade de Groningen – Holanda, onde permaneceu durante 6 meses, desenvolveu atividades relacionadas com sua tese sob orientação da Prof^a. Dr^a. Joana Falcão Salles.

RESUMO GERAL

VIDEIRA, Sandy Sampaio. **Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas associada a plantas de capim-elefante** 2012. 105f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Neste estudo, uma fração da comunidade de bactérias diazotróficas associada a raízes e parte aérea de diferentes genótipos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) foi analisada por métodos dependentes e independentes de cultivo. Duzentas e quatro estirpes bacterianas foram isoladas dos genótipos Cameroon e CNPGL91F06-3 e caracterizadas genotipicamente através de BOX-PCR. Das análises de agrupamento geradas a partir dos perfis de BOX-PCR, um total de 47 estirpes foram selecionadas para identificação taxonômica através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. A análise de similaridade de fragmentos do gene 16S rRNA revelaram que 36% das sequências pertenciam ao gênero *Gluconacetobacter*, 31% a *Azospirillum* spp, 21% a *Enterobacter* spp. Estes resultados foram confirmados pela análise do gene *nifH*, embora, bactérias identificadas como *Gluconacetobacter* apresentaram sequências de *nifH* homólogas a *Enterobacter* spp. Adicionalmente, as 204 estirpes foram investigadas quanto à capacidade de fixar nitrogênio, produzir fitoreguladores e solubilizar fosfatos. Do total, 75.5% apresentaram atividade da nitrogenase, 97% produziram compostos indólicos, 22% solubilizaram fosfato e 15% apresentaram as três características. Para avaliar, sob condições de vaso, a resposta dos genótipos Cameroon e Roxo à inoculação com estirpes dos gêneros *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Gluconacetobacter* previamente caracterizadas. O rendimento de biomassa, o acúmulo de nutrientes na parte aérea, bem como o teor de proteína nos tecidos, não foram beneficiados significativamente pela inoculação com bactérias diazotróficas; embora incrementos na massa seca de raiz e acúmulo de N e P tenham sido detectados. Como os benefícios proporcionados à planta hospedeira apresentaram variação de estirpe para estirpe, e as análises foram realizadas pontualmente aos 60 dias após plantio, não foi possível determinar se as estirpes inoculadas apresentaram competência no estabelecimento e quais fatores influenciaram a interação planta-bactéria. A diversidade, estrutural e funcional, foi acessada pela técnica de PCR-DGGE a partir de sequências de 16S rRNA e *nifH* obtidas diretamente de amostras de raiz e colmo de 5 genótipos de capim-elefante. A estrutura das comunidades, bacteriana e diazotrófica, foi mais influenciada pelo tecido vegetal do que pelos genótipos, sendo a raiz considerada um ambiente mais complexo em relação ao colmo. A população bacteriana metabolicamente ativa foi identificada em 3 dos 5 genótipos testados; e os grupos detectados com maior frequência foram Proteobacteria, constituído de β - (*Leptothrix* spp e *Burkholderia* spp), α - (*Bradyrhizobium* spp, *Methylobacterium* spp e *Rhizobium* spp), γ - (*Steroidobacter* spp) e Actinobacteria (*Actinoplanes* spp, *Conexibacter* spp, *Solirubrobacter* spp e *Amycolatopsis* spp). Nas bibliotecas construídas de *nifH*-cDNA, 26,4% do total de fragmentos foram relacionados com sequências de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Sequências menos abundantes pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Klebsiella* e *Enterobacter* spp também foram detectadas, mas sua distribuição entre as amostras foi aleatória.

Palavras-chave: *Pennisetum purpureum*. Comunidade bacteriana. Promoção de crescimento vegetal

GENERAL ABSTRACT

VIDEIRA, Sandy Sampaio. **Community analysis of diazotrophic bacteria associated with elephant grass**. 2012. 105p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

In this study, a fraction of the diazotrophs community associated with roots and shoots of different elephant grass genotypes (*Pennisetum purpureum*) was assessed by combined use of culture-dependent and -independent approaches. A total of 204 bacterial strains were isolated from Cameroon and CNPGL91F06-3 genotypes and genomically fingerprinted by BOX-PCR. From the cluster analysis generated from BOX-PCR profiles, 47 strains were selected for identification by partial 16S rRNA sequencing. Similarity analysis of the 16S rRNA gene fragments revealed that 36% of the sequences belonged to the *Gluconacetobacter* genus, 31% to *Azospirillum* spp and 21% to *Enterobacter* spp. These results were confirmed by *nifH* gene analysis, although bacteria identified as *Gluconacetobacter* showed sequences homologous to *nifH* gene from *Enterobacter* spp. Additionally, 204 strains were investigated for their ability to fix nitrogen, produce phytohormones and phosphate solubilization. Of the total, 75.5% had nitrogenase activity, 97% produced indole compounds, 22% solubilized phosphate and 15% showed all three characteristics together. To evaluate, under vessel experiment conditions, the response of Cameroon and Roxo genotypes to inoculation with *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Gluconacetobacter* strains previously characterized. The biomass yield, nutrient accumulation in the shoot as well as the protein content in elephant grass inoculated with diazotrophs were not significantly improved by inoculation, although increases in root dry weight and N and P have been detected. As the benefits to the host plant showed variation from strain to strain, and the analyzes were carried out punctually at 60 days after planting, it was not possible to determine if the inoculated strains were not able to penetrate into the tissues and which factors influenced the plant-bacterium interaction and the final production of the plants. The structural and functional diversity was assessed by PCR-DGGE from 16S rRNA and *nifH* sequences directly-obtained from root and stem of five elephant grass genotypes. The bacterial and diazotrophic community structure was more influenced by plant tissue than the genotypes, the root being considered a more complex niche in relation to the stem. The metabolically active bacterial population was identified in three of the five tested genotypes, and the groups most frequently detected were Proteobacteria, consisting of β - (*Leptothrix* spp and *Burkholderia* spp), α - (*Bradyrhizobium* spp, *Methylobacterium* spp and *Rhizobium* spp), γ - (*Steroidobacter* spp) and Actinobacteria (*Actinoplanes* spp, *Conexibacter* spp, *Solirubrobacter* spp and *Amycolatopsis* spp). In *nifH*-cDNA libraries, 26.4% of the fragments were related to different *Bradyrhizobium* spp. strains sequences. Less abundant sequences belonging to the genera *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Klebsiella* and *Enterobacter* spp were also detected, but their distribution among the samples was at random.

Key-words: *Pennisetum purpureum*. Bacterial community. Plant growth promoting

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1** Quantificação da população de bactérias diazotróficas cultiváveis (log do número de células por grama de tecido fresco) colonizando dois genótipos de capim-elefante usando 5 meios de cultivo semi-sólidos livres de nitrogênio.....20
- Tabela 2** Análise de similaridade de isolados representativos baseado no sequenciamento parcial do gene 16S rDNA.....25
- Tabela 3** Propriedades benéficas das bactérias diazotróficas isoladas de folha, colmo e raiz de capim-elefante.....30

CAPÍTULO II

- Tabela 1** Estirpes de bactérias diazotróficas utilizadas como inoculante em plantas de capim-elefante, selecionadas de acordo com a capacidade de reduzir acetileno, produzir hormônio vegetal e solubilizar fosfato e que constituíram os tratamentos do experimento.....44
- Tabela 2** Análise química das amostras de terra utilizadas para plantio dos genótipos de capim-elefante no experimento de vasos.....44
- Tabela 3** Número de bactérias diazotróficas (Log do número de células g⁻¹ de matéria fresca) na parte aérea e raiz de dois genótipos de capim-elefante submetido a diferentes tratamentos e colhidos aos 60 dias.....47
- Tabela 4** Número de bactérias diazotróficas (Log do número de células g⁻¹ de matéria fresca) na análise de desbobrimento da parte aérea e raiz de dois genótipos de capim-elefante submetido a diferentes tratamentos e colhidos aos 60 dias.....48
- Tabela 5** Produção de biomassa de parte aérea e raiz (g por vaso) de plantas de capim-elefante inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas durante 60 dias. Valores médios de 3 repetições.....49
- Tabela 6** Acúmulo de N, P e K na parte aérea de plantas de capim-elefante inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas durante 60 dias. Valores médios de 3 repetições.....49
- Tabela 7** Relação C:N, proteína bruta e contribuição da FBN estimada pela técnica de $\delta^{15}\text{N}$ na biomassa produzida por dois genótipos de capim-elefante inoculados com bactérias diazotróficas e cultivados por 60 dias.....50

CAPÍTULO III

- Tabela 1** Comparação das comunidades bacterianas acessadas por perfis de DGGE, baseada nos genes 16S rRNA e *nifH* e analisada pelo programa ANOSIM.....66
- Tabela 2** Análise estatística das bibliotecas dos genes 16S rRNA e *nifH* baseadas em amostras de cDNA de raiz e colmo de 3 genótipos de capim-elefante.....68

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** Tecidos de capim-elefante utilizados para a quantificação e isolamento da população de bactérias diazotróficas.....15
- Figura 2** Dendrograma obtido pela análise de grupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados obtidos dos meios JNFb e NFb. As similaridades foram calculadas usando coeficiente de Jaccard e os grupamentos usando UPGMA. Isolados indicados com o símbolo “*” foram usados para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA enquanto aqueles identificados com “★” foram usados para sequenciamento total do gene 16S rRNA. Estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), *H. rubrisubalbicans* (HCC103), *H. frisingense* (GSF30), *Azospirillum brasilense* (Sp7) e *A. lipoferum* (Sp59) foram incluídas na análise (☆).....21
- Figura 3** Dendrograma obtido pela análise de grupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados obtidos do meio LGI. As similaridades foram calculadas usando coeficiente de Jaccard e os grupamentos usando UPGMA. Isolados indicados com o símbolo “*” foram usados para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA enquanto aqueles identificados com “★” foram usados para sequenciamento total do gene 16S rRNA. A estirpe CBAmC de *Azospirillum amazonense* foi incluída na análise (☆).....22
- Figura 4** Dendrograma obtido pela análise de grupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados obtidos do meio LGI-P. As similaridades foram calculadas usando coeficiente de Jaccard e os grupamentos usando UPGMA. Isolados indicados com o símbolo “*” foram usados para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA enquanto aqueles identificados com “★” foram usados para sequenciamento total do gene 16S rRNA. Estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) e *Burkholderia tropica* (Ppe8) foram incluídas na análise (☆).....23
- Figura 5** Dendrograma obtido pela análise de grupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados obtidos do meio JMV. As similaridades foram calculadas usando coeficiente de Jaccard e os grupamentos usando UPGMA. Isolados indicados com o símbolo “*” foram usados para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA enquanto aqueles identificados com “★” foram usados para sequenciamento total do gene 16S rRNA. Estirpes de *Burkholderia silvatlantica* (SRMrh-20), *B. kururiensis* (KP23), *B. vietnamiensis* (TVV75) e *B. tropica* (Ppe8) foram incluídas na análise (☆).....24
- Figura 6** Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~ 1.450 bp), incluindo isolados representativos e estirpes de bactérias diazotróficas depositadas no banco de dados NCBI. Sequências de isolados representativos estão identificadas em negrito. A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e a árvore consenso gerada pelo programa MEGA5. Números localizados nos ramos da árvore indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (*bootstrap*). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de *Bacillus pumilus* foi utilizada como grupo externo.....26
- Figura 7** Árvore filogenética baseada em sequências do gene *nifH* (~ 350 bp), incluindo isolados representativos e estirpes de bactérias diazotróficas depositadas no banco

de dados NCBI. Sequências de isolados representativos estão identificadas em negrito. A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e a árvore consenso gerada pelo programa MEGA5. Números localizados nos ramos da árvore indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (*bootstrap*). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene *nifH* de *Bacillus pumilus* foi utilizada como grupo externo.....27

Figura 8 Colônias dos principais grupos fenotípicos de bactérias diazotróficas obtidas de plantas de Capim-elefante. A figura representam isolados representativos cultivados em meio sólido NFb 3X (A), LGI (B), LGI-P (C) e JMV (D). Fotos: Itamar G. Ignácio.....28

CAPÍTULO III

Figura 1 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) de fragmentos de 16S rDNA (A) e 16S rRNA (B) associados com raiz e caule de cinco genótipos de capim-elefante. As amostras incluídas nesta figura representam: raiz (R) e caule (S) do genótipo Cameroon (G1), Gramafante (G2); BAG02 (G3), Roxo (G4), CNPGL91F06-3 (G5); M Marcador. ‡ representa uma repetição da amostra SG5.....65

Figura 2 Análise de componentes principais (PCA) dos genes 16S rRNA (A) e *nifH* (B) associados com raízes e colmo de 5 genótipos de capim-elefante. Perfis de DGGE foram utilizados para construir uma matriz de similaridade para análise PCA. Cada amostra foi codificada de acordo com cores e formas dos símbolos: vermelho; fragmentos de DNA; azul: fragmentos de cDNA; símbolos cheios, amostras de raiz; símbolos vazios, amostras de colmo; círculos, genótipo Cameroon; quadrados, Gramafante; losango, BAG 02; retângulo, Roxo; triângulo, CNPGL91F06-3.....66

Figura 3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) de fragmentos do gene *nifH* derivados de DNA (A) e cDNA (B) associados com raiz e caule de cinco genótipos de capim-elefante. Três repetições foram usadas por amostra. As amostras incluídas nesta figura representam: raiz (R) e caule (S) dos genótipos Cameroon (G1), Gramafante (G2); BAG 02 (G3), Roxo (G4), CNPGL91F06-3 (G5); M, Marcador.....67

Figura 4 Curvas de rarefação das bibliotecas referentes aos genes 16S rRNA (A) e *nifH* (B) com o número de UTOs detectados vs o número de sequências amostradas em cada amostra. As abreviações na figura representam: raiz (R), colmo (S), genótipo Cameroon (G1), Roxo (G4) e CNPGL91F06-3 (G5).....68

Figura 5 Análise de coordenadas principais para as bibliotecas dos genes 16S rRNA (A) e *nifH* (B). Os diagramas foram construídos usando UniFrac, levando em consideração as informações filogenéticas de cada biblioteca. As abreviações na figura representam: raiz (R), colmo (S), genótipo Cameroon (G1), Roxo (G4) e CNPGL91F06-3(G5).....70

Figura 6 Abundância relativa da composição bacteriana de cada biblioteca do gene 16S rRNA ao nível de filo determinada pelo *RDP Classifier* com confiabilidade de 90% (A) e a abundância a nível de classe dos 2 filós mais dominantes, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (B). As abreviações na figura representam: raiz (R), colmo (S), genótipo Cameroon (G1), Roxo (G4) e CNPGL91F06-3 (G5).....71

Figura 7 Frequência dos diferentes gêneros bacterianos identificados através do gene 16S rRNA (A) e *nifH* (B) em raízes e colmo de 3 genótipos de capim-elefante. As

	abreviações na figura representam: raiz (R), colmo (S), genótipo Cameroon (G1), Roxo (G4) e CNPGL91F06-3(G5).....	72
Figura 8	Representação esquemática dos diferentes gêneros encontrados entre as amostras de raiz (A) e colmo (B) de capim-elefante com base em sequências de 16S rRNA. G1- Cameroon, G4- Roxo e G5- CNPGL91F06-3.....	76
Figura 9	Representação esquemática dos diferentes gêneros encontrados entre os genótipos de capim-elefante com base em sequências de 16S rRNA. G1- Cameroon, G4- Roxo e G5- CNPGL91F06-3.....	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA GERAL	2
2.1 A Cultura do Capim-elefante.....	2
2.2 Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal	3
2.3 A Fixação de Nitrogênio	5
2.4 A Fixação Biológica de Nitrogênio	5
2.5 Microrganismos Diazotróficos	6
3 CAPÍTULO I. OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS ÀS PLANTAS DE CAPIM-ELEFANTE	
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1 Condições Experimentais	14
2.2 Quantificação e Isolamento de Bactérias Diazotróficas	14
2.3 Estirpes-Referência.....	15
2.4 Caracterizações Moleculares	15
2.5 Caracterização Fenotípica.....	17
2.6 Caracterização Funcional	17
3 RESULTADOS	19
3.1 Quantificação e Isolamento de Bactérias Diazotróficas	19
3.2 Caracterizações Moleculares	19
3.3 Caracterização Fenotípica.....	27
3.4 Caracterização Funcional.....	28
4 DISCUSSÃO	32
4.1 Bactérias Diazotróficas Cultiváveis e Sua Diversidade Genética	32
4.2 Características de Promoção de Crescimento de Plantas	34
4 CAPÍTULO II. INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM PLANTAS DE CAPIM-ELEFANTE	
RESUMO	36
ABSTRACT	37
1 INTRODUÇÃO.....	38
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	43

2.1 Seleção de Estirpes e Genótipos.....	43
2.2 Preparo e Aplicação do Inoculante.....	43
2.3 Implantação do Experimento.....	43
2.4 Colheita e Análises	43
3 RESULTADOS	46
3.1 Quantificação da População de Bactérias Diazotróficas	46
3.2 Acúmulo de Biomassa e Nutrientes.....	46
4 DISCUSSÃO	51
4.1 Estabelecimento das Bactérias Diazotróficas Inoculadas.....	51
4.2 Efeito da Inoculação nas Plantas de Capim-elefante.....	52
5 CAPÍTULO III. DIVERSIDADE MOLECULAR DE BACTÉRIAS TOTAIS E DIAZOTROFICAS ASSOCIADAS ÀS PLANTAS DE CAPIM-ELEFANTE	
RESUMO	54
ABSTRACT	55
1 INTRODUÇÃO.....	56
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1 Amostragem	60
2.2 Extração de DNA Total	60
2.3 Extração de RNA Total e Síntese de cDNA.....	61
2.4 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	62
2.5 Construções das Bibliotecas Gênicas	62
3 RESULTADOS	64
3.1 Análise de PCR-DGGE da Comunidade Bacteriana.....	64
3.2 Análise de PCR-DGGE da Comunidade Diazotrófica.....	64
3.3 Bibliotecas Gênicas	66
4 DISCUSSÃO	73
4.1 Estrutura da Comunidade Bacteriana	73
4.2 Composição da Comunidade Bacteriana.....	74
6 CONCLUSÕES GERAIS	80
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
9 ANEXOS	103

1 INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as culturas com grande potencial bioenergético, plantas pertencentes à família Poaceae e com metabolismo fotossintético C_4 têm se destacado nesse cenário (BYRT et al., 2011). Dentre estas espécies vegetais, o capim-elefante foi identificado como cultura promissora, pois apresenta alta eficiência na conversão de energia luminosa em biomassa, elevada eficiência no uso da água e do nitrogênio foliar, tolerância mediana à salinidade e alagamento (Taylor et al., 2010).

Embora a elevada produção de biomassa seja uma das premissas para programas bioenergéticos, outro parâmetro que influencia a viabilidade destas culturas é o balanço energético, ou seja, a relação entre o total de energia contida no produto e o total de energia fóssil investida em todo o processo de produção (SAMSON et al., 2005). Neste contexto, os fertilizantes sintéticos, principalmente os nitrogenados, usados na produção do capim elefante tem sido um dos fatores que influencia negativamente o balanço energético desta cultura, já que os mesmos demandam elevadas quantidades de energia fóssil em sua fabricação.

Frente a este problema, o desenvolvimento de novas tecnologias que possam suprir total ou parcialmente a quantidade de nitrogênio e outros elementos para o desenvolvimento das plantas, bem como favorecer o crescimento vegetal, é condição essencial para a sustentabilidade dos sistemas bioenergéticos em expansão na agricultura. Dentre as tecnologias disponíveis, o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) apresenta-se como tema de grande interesse econômico, social e ambiental. Este processo é realizado por bactérias diazotróficas, que através da enzima nitrogenase, transformam o N molecular do ar em amônia, tornando o N disponível para as plantas (BALDANI e BALDANI, 2005).

Ao contrário das plantas de importância econômica estabelecidas há décadas, pouco se sabe sobre o processo de FBN e outros biológicos (biofertilizantes e bioestimulantes) em plantas com potencial agroenergético, como por exemplo o capim-elefante. Com a necessidade de expansão e conhecimento deste tipo de cultura, tornou-se premente a realização de estudos de isolamento, caracterização e identificação da diversidade microbiana associada a esta planta para a melhor exploração de seu potencial e desta forma tornar os programas bioenergéticos os mais sustentáveis possíveis.

As hipóteses testadas neste estudo foram: (i) diferentes genótipos de capim-elefante se associam com bactérias diazotróficas promotoras do crescimento vegetal; (ii) as bactérias associadas com capim-elefante promovem o crescimento vegetal das plantas hospedeiras; (iii) os métodos moleculares independentes de cultivo são capazes de detectar uma maior diversidade bacteriana quando comparado aos métodos cultiváveis.

Para testar as hipóteses levantadas, o objetivo geral da tese foi o de estudar, por métodos cultiváveis e não-cultivável, a comunidade de bactérias diazotróficas associadas a diferentes genótipos de capim-elefante.

O estudo foi dividido em 3 capítulos distintos com objetivos específicos: (i) quantificar, isolar, caracterizar e identificar uma fração das bactérias diazotróficas cultiváveis naturalmente associadas às plantas de capim-elefante; (ii) determinar, através de experimentos de inoculação, os efeitos de bactérias diazotróficas na promoção de crescimento de plantas de capim-elefante *in situ*; e (iii) avaliar a diversidade estrutural e funcional de bactérias totais e diazotróficas através de métodos independentes de cultivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA GERAL

2.1 A Cultura do Capim-elefante

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), comumente conhecido como pasto elefante, napier, cameroon, mineiro, entre outros (PEREIRA, 1993), é uma das gramíneas mais importantes e mais difundidas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (CARVALHO et al., 1994). Originária da África Tropical (atual Zimbábue), foi introduzida no Brasil em 1920 (VEIGA, 1985), no Rio Grande do Sul, a partir de estacas procedentes de Cuba (MOZZER, 1993). Sua descrição original data de 1827 (TCACENCO e BOTREL, 1997), sofrendo modificações ao longo do tempo. De acordo com a taxonomia atual, o capim-elefante pertence à classe Monocotyledonae, família Poaceae, subfamília Panicoideae, tribo Paniceae, gênero *Pennisetum*, o qual compreende mais de 140 espécies, sendo algumas de importância forrageira (*P. purpureum*, *P. clandestinum*, *P. unisetum*, *P. pedicellatum*), cerealífera (*P. americanum*) e ornamentais (*P. villosum* e *P. setaceum*) (KATIVU e MITHEN, 1987).

A espécie *P. purpureum* Schumack tem sido utilizada desde a década de 70 quase que exclusivamente como capineira para fornecimento de forragem verde em sistemas de produção de leite e carne, em decorrência do seu potencial produtivo e da sua qualidade (ALMEIDA et al., 2004). Quando adequadamente adubado, tem mostrado elevado rendimento de biomassa, chegando a produzir em média 30-40 T por hectare por ano manejado (CORSI e NUSSIO, 1992; PEREIRA, 1993; XAVIER et al., 1998), além disso, apresentam propagação vegetativa, alta rusticidade e resistência considerável à seca. A partir das dificuldades que o uso da madeira com fins energéticos começou a apresentar no final dos anos 80, seja por questões ambientais ou concorrência de usos mais nobres, alternativas à madeira passaram a serem observadas mais cuidadosamente, e as características de determinados genótipos de *P. purpureum* despertaram o interesse de grupos de pesquisa (SAMSON et al., 2005).

Neste novo cenário mundial de demanda de energia, o capim-elefante - entre outras culturas - tem sido apontado como uma espécie de grande potencial energético, principalmente devido a sua elevada produção de biomassa com baixa utilização de insumos. De acordo com Taylor et al. (2010) espécies de poáceas com metabolismo C₄, incluindo o capim-elefante, são culturas energéticas ideais por apresentarem alta eficiência na conversão de energia luminosa em biomassa, elevada eficiência no uso da água e do nitrogênio foliar, além de apresentar alta tolerância a salinidade e alagamento. Estas plantas estão entre as plantas mais produtivas do planeta, tanto como culturas agrícolas quanto ervas daninha (HATCH, 1987). Byrt et al. (2011), utilizando dados de Monteith (1978), mostraram a produção de biomassa para plantas C₃ e C₄ cultivadas sob condições ótimas de crescimento e evidenciaram claramente que a duração do ciclo de desenvolvimento das culturas influencia consideravelmente nas vantagens das gramíneas C₄ sobre as C₃. Uma comparação similar foi feita por El Bassam (1998) e Somerville et al. (2010), sem considerar o período de crescimento, mostraram a variação significativa na produção de biomassa entre diferentes espécies de plantas C₄, evidenciando uma produção de biomassa de até 80 T por hectare para plantas de cana-de-açúcar e capim-elefante e revelando a baixa performance de plantas como switchgrass e miscanthus, amplamente utilizadas em pesquisas nos EUA e Europa como plantas bioenergéticas (DOHLEMAN et al., 2009; SCHMER et al., 2008).

Embora a elevada produção de biomassa seja uma das premissas para programas bioenergéticos, outro parâmetro que influencia na viabilidade das culturas é o balanço energético, o qual estabelece uma relação entre o total de energia contida no produto e o total

de energia fóssil investida em todo o processo de produção (SAMSON et al., 2005). Em programas de produção de bioenergia, este parâmetro varia de 1,4-2,3 para milho, 10,8-11,3 para Switchgrass (VADAS et al. 2008), 22 para *Miscanthus* (ERCOLI et al., 1999), 8,1-21 para cana-de-açúcar (BODDEY et al. 2008), 21,7 para sorgo (SILVA e SERRA 1978) e 25 para capim-elefante (SAMSON et al., 2005). O aumento do balanço energético também contribui diretamente com a minimização das emissões de gases do efeito estufa - fator de grande representatividade em programas bioenergéticos (BYRT et al., 2011) - principalmente pela diminuição da quantidade de fertilizantes sintéticos aplicados, os quais demandam elevadas quantidades de energia fóssil em sua fabricação. Além disso, a cultura do capim-elefante, assim como as demais plantas com metabolismo C₄, contribui significativamente para o seqüestro de carbono, já que apresentam alta eficiência na fixação de CO₂ atmosférico durante o processo de fotossíntese para a produção de biomassa vegetal (von CAEMMERER e FURBANK, 2003). De acordo com Boddey et al., (2004), o teor de carbono nestas plantas é aproximadamente 42% com base em matéria seca; desta forma, considerando uma produção média de de 30-40 T de biomassa seca ha⁻¹ ano⁻¹ um total de 13-17 T de C ha⁻¹ seria acumulado por ano.

Diante do exposto, acredita-se que a inserção da cultura do capim-elefante como fonte de energia renovável contribuirá significativamente para o agronegócio, sendo viável economicamente e limpa do ponto de vista ambiental. Vale lembrar que em sistemas sustentáveis de produção de energia a minimização de insumos, tais como nitrogênio, fósforo e água torna-se essencial, pois influencia diretamente no balanço energético (BYRT et al., 2011). Dentro deste contexto, um dos desafios da pesquisa agropecuária para a implantação destes sistemas é o aumento ou manutenção do balanço energético, que pode ser favorecido pela minimização dos fertilizantes sintéticos e/ou utilização de fontes alternativas de incorporação de nutrientes ao sistema solo-planta, como os processos biológicos.

2.2 Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal

Estimulada pela crescente demanda, pela utilização consciente dos recursos ambientais e danos ao ambiente e à saúde humana induzidos por uso excessivo de pesticidas e fertilizantes (AVIS et al. 2008; LEACH e MUMFORD 2008), práticas agrícolas têm sido modificadas para uma abordagem mais sustentável e ambientalmente corretas (GAMALERO e GLICK, 2012). Embora a grande maioria destes estudos seja conduzida em culturas agrícolas destinadas a produção de alimentos, para sistemas sustentáveis de produção de energia a minimização de insumos e a otimização de processos biológicos que favoreçam o desenvolvimento das culturas são parâmetros obrigatórios. Neste contexto, microrganismos relacionados direta ou indiretamente com atividades benéficas ao crescimento das plantas tem representado uma alternativa atraente para a agricultura convencional (ANTOUN e PRÉVOST, 2005).

Dentro deste grupo de microrganismos, bactérias denominadas promotoras de crescimento de plantas (BPCP ou PGPB – *plant growth-promoting bacteria*) têm sido identificadas e podem beneficiar o crescimento de seus hospedeiros de forma direta - através de efeitos biofertilizantes e bioestimulantes - e de forma indireta, em função da atividade supressiva contra doenças e patógenos (SPAEPEN et al., 2009; CASSÁN et al., 2011). Mecanismos envolvidos na biofertilização incluem a fixação biológica de nitrogênio, solubilização e mineralização de fosfatos (GYANESHWAR et al., 2002), produção de sideróforos (DOBBELAERE et al., 2003) e melhoria na assimilação de N, P e K (WU et al., 2005). Em relação aos efeitos bioestimulantes, a produção de fitohormônios como o ácido 3-indol-acético (BACA e ELMERICH, 2007), citocininas (TAKEI et al., 2001) e giberilinas (CASSÁN et al., 2001) e modulação dos níveis de etileno (GLICK et al., 2007) são os processos mais estudados. Indiretamente, estes microrganismos podem favorecer o

crescimento das plantas através de mecanismos de biocontrole, onde o efeito deletério de fitopatógenos é minimizado ou eliminado pela produção de substâncias antagonistas, competição por nutrientes ou sítios de colonização, além de casos associados à indução de resistência sistêmica (BALLY e ELMERICH, 2007).

Dentre os mecanismos supracitados envolvidos na promoção de crescimento vegetal, grande atenção tem sido dada aos estudos de produção de fitoreguladores por BPCP (PATTEN e GLICK, 1996; GLICK et al., 1999). De Salamone et al. (2010) mostraram que quando as plantas encontram-se sob condições adversas, os níveis de fitoreguladores endógenos não são suficientes para o crescimento ótimo. Neste contexto, fitoreguladores produzidos extracelularmente por microrganismos têm sido considerados essenciais para o ciclo de desenvolvimento vegetal (De SALAMONE et al., 2010; GAMALERO e GLICK, 2012). Embora muitas substâncias de ocorrência natural relacionadas a promoção vegetal estejam sendo descritas, os compostos indólicos, como o ácido 3-indol acético (AIA), são os mais bem estudados. Fitoreguladores deste grupo favorecem a formação de raízes laterais e adventícias, processos de controle de crescimento vegetativo como tropismo, florescimento e frutificação das plantas, diferenciação dos tecidos vasculares. Além disso, afetam a fotossíntese, formação de pigmento, a biossíntese de vários metabólitos e resistência a fatores de estresse biótico (BASHAN e DE-BASHAN, 2010). Embora haja controvérsias sobre o efeito e a função dos compostos indólicos produzidos pelas bactérias associadas a plantas, esta característica tem sido considerada um dos principais mecanismos envolvidos na promoção do crescimento de plantas por bactérias como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Pseudomonas putida* e *Azospirillum lipoferum* (MEHNAZ e LAZAROVITS, 2006; RODRIGUES, 2008).

A promoção de crescimento de plantas por bactérias pode também ocorrer como uma consequência da provisão de nutrientes que não estejam disponíveis no solo; esses nutrientes incluem principalmente o fósforo e o nitrogênio. Para a disponibilização destes nutrientes, os principais mecanismos envolvidos são a solubilização de fosfato e a fixação de nitrogênio. Nos solos tropicais, intemperizados e argilosos, a capacidade de fixação de fósforo (P) é elevada, reduzindo sua labilidade nos solos e sua disponibilidade às plantas. Nestes sistemas, existem dois tipos de reação (i) adsorção de fosfato na superfície dos colóides e (ii) precipitação de fosfato por Fe^{3+} e Al^{3+} livres na solução do solo (HAVLIN et al., 1999). Muitos microrganismos do solo são capazes de solubilizar compostos fosfatados e reverter o processo de fixação de P, afetando diretamente a disponibilização deste elemento no sistema solo-planta. Muitos mecanismos têm sido propostos para explicar a solubilização microbiana de compostos fosfatados. Esses mecanismos incluem a (i) liberação de ácidos orgânicos produzidos durante a decomposição de carbono orgânico (KANG et al., 2002; HAMEEDA et al., 2006; BAR-YOSEF et al., 1999); (ii) excreção de prótons pela assimilação de NH_4^+ pelos microrganismos (ILMER et al., 1995; ABD-ALLA, 1994; ASEA et al., 1988); (iii) formação de complexos entre ácidos orgânicos/ânions com cátions (Al^{3+} , Fe^{3+} , Ca^{2+}) (WELCH et al., 2002); e (iv) desorção de fosfato dos colóides do solo (OSORIO, 2011). Além destes mecanismos, o incremento da área superficial das raízes pela extensão do sistema radicular, crescimento de raízes laterais e pêlos radiculares – em decorrência da produção de fitoreguladores - tem sido considerado de grande importância (MENDES e REIS JUNIOR, 2003). Cerca de 20 a 40% da população de microrganismos cultiváveis do solo – principalmente rizosférico – estão relacionados à disponibilização de fosfato no sistema solo-planta (DOBBELAERE et al., 2003). Bactérias capazes de promover o crescimento de plantas pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Bacillus* são particularmente ativos como solubilizadores de fosfato (OSORIO, 2011).

Além do fósforo, o nitrogênio (N) é outro macronutriente de baixa disponibilidade nos solos, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, de extrema importância para o desenvolvimento das plantas.

2.3 A Fixação de Nitrogênio

Apesar de extremamente abundante na atmosfera (~80%), essencialmente na combinação molecular N_2 , o nitrogênio é um dos principais barreiras para a produtividade agrícola. Isto acontece porque as plantas preferencialmente conseguem absorver o nitrogênio sob a forma de íons de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), cuja disponibilidade no solo é baixa. Desta forma, o aporte do nitrogênio aos solos torna-se necessário e ocorre através de processos como a fixação atmosférica, por descargas elétricas, fixação industrial, pelo processo Haber-Bosch, mineralização da matéria orgânica e a fixação biológica (CARVALHO, 2002). Dentre estes processos, o uso de fertilizantes sintéticos (fixação industrial) - é sem dúvida a prática mais empregada para reposição do N aos solos. De acordo com a IFA (*International Fertilizer Industry Association*) o consumo global de fertilizantes nitrogenados sintéticos entre 1960 e 2010 aumentou de 13 para 102 Mt de N, com uma estimativa de chegar a 112 Mt de N em 2015 (HEFFER, 2011).

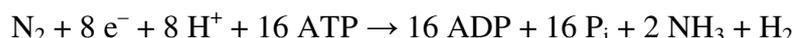
Nos países de clima tropical, as plantas são mais dependentes do emprego destes fertilizantes, devido à grande quantidade de chuvas e à rápida decomposição da matéria orgânica pelas elevadas temperaturas. Este fato acarreta na utilização de quantidades superiores às necessárias para suprir a demanda dos vegetais. De maneira geral, a eficiência dos fertilizantes é baixa. Alguns trabalhos mostram que cerca da metade do adubo nitrogenado aplicado anualmente nos campos é perdida por mecanismos como a lixiviação de nitrato, escoamento superficial, erosão e perdas gasosas de desnitrificação e volatilização de amônia (FOLLETT e FOLLETT, 2001; SALA et al., 2007; SAIKIA e JAIN, 2007). Com o excesso de nitrogênio nos ambientes pelo uso de fertilizantes, diversos efeitos deletérios têm sido observados como: (i) acúmulo de NO_3 nas águas de rios, lagos e aquíferos subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos aos peixes e ao homem; (ii) eutrofização de corpos d'água, consequência da elevada concentração de nutrientes; (iii) aumento de chuvas ácidas; (iv) produção de NO e N_2O pela redução do NO_3 por microrganismos do solo, que contribuem para a degradação da camada de ozônio e para o aquecimento global; entre outros (SAIKIA e JAIN, 2007). Mais recentemente, com o forte apelo ecológico para minimizar os impactos gerados pelos fertilizantes nitrogenados, novas abordagens vêm ganhando espaço nos sistemas de produção agrícola como o uso mais eficiente dos fertilizantes ou sua substituição, parcial ou total, por processos biológicos como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (GOVINDARAJAN et al., 2008).

2.4 A Fixação Biológica de Nitrogênio

A descoberta da FBN foi atribuída aos cientistas alemães Hellriegel e Wilfarth em 1886, que reportaram que as leguminosas apresentavam nódulos radiculares capazes de usar o nitrogênio molecular. Em 1888, Martinus Beijerinck comprovou que a fixação de nitrogênio observada em leguminosas estava associada a bactérias presente no interior destes tecidos. Este pesquisador isolou uma estirpe do interior dos nódulos denominado-a *Bacilo radicolica*. Posteriormente, esta estirpe foi identificada como *Rhizobium* (*rhiza* = raiz; *bios* = vida). A partir de então, considerando a importância do nitrogênio molecular, o estudo do processo de FBN recebeu grande atenção mundial. Juntamente com a decomposição da matéria orgânica, e atrás apenas da fotossíntese, a FBN é considerada um dos mais importantes processos biológicos do planeta. Estima-se que este processo seja responsável por 200-300 milhões de T de N fixado por ano. Considerando diferentes ecossistemas, a quantidade de N fixado é em

média, 90-130 T N por ano para ecossistemas terrestres, e 100-200 T N por ano para ecossistemas marinhos (HUREK e REINHOLD-HUREK, 2011).

Este processo é realizado por microrganismos procariotos denominados fixadores de nitrogênio (diazotróficos). Estes organismos, através do complexo protéico da nitrogenase, são capazes de reduzir o nitrogênio molecular ($N\equiv N$) à amônia (NH_3) em condições normais de temperatura e pressão. Esta reação, embora termodinamicamente favorável, não ocorre espontaneamente, visto que os dois átomos de nitrogênio encontram-se unidos por uma tripla ligação altamente estável. Do ponto de vista energético, esse processo é bastante dispendioso para os microrganismos que o realizam. De acordo com Simpson e Burris (1984), em condições ótimas, a estequiometria global da reação é:



A reação de incorporação do nitrogênio pelas bactérias diazotróficas é catalisada pelo complexo enzimático da nitrogenase (SUR et al., 2010). A forma mais comum desta enzima, denominada nitrogenase de molibdênio ou nitrogenase convencional (FeMo), consiste de uma ferro-proteína (Fe-proteína) e de uma molibdênio-ferro-proteína (MoFe-proteína) (SUR et al., 2010). Contrariando as considerações históricas sobre a importância essencial do molibdênio para o funcionamento das nitrogenases (EADY et al., 1987), ainda na década de 80 descobriu-se que algumas bactérias eram capazes de fixar nitrogênio em condições de deficiência de molibdênio, utilizando sistemas enzimáticos alternativos, como as nitrogenases de vanádio-ferro (nitrogenase V-Fe) (BISHOP et al., 1980; REHDER, 1992), ou a que contém apenas ferro como metal de transição (nitrogenase Fe) (TEIXEIRA et al., 1998). No entanto, estas nitrogenases alternativas são expressas somente quando as concentrações de Mo são limitantes no ambiente. A nitrogenase convencional (FeMo) é mais específica na ligação do N_2 ao sítio ativo e mais eficiente na redução deste elemento a amônia, quando comparada as demais nitrogenases alternativas ($Nif > Vnf > Anf$) (JOERGER e BISHOP 1988; LOVELESS et al., 1999). Um quarto tipo de nitrogenase foi descrito para a bactéria *Streptomyces thermoautotrophicus*, cuja propriedade mais notável é a dependência de oxigênio e do radical superóxido - ambos nocivos para a maioria das nitrogenases (NUNES et al., 2003).

Por ser um processo fisiológico que requer grande quantidade de energia, sua regulação é controlada, em diversos momentos, ao nível transcricional (REIS et al., 2007). A genética da FBN foi inicialmente elucidada na bactéria diazotrófica de vida livre *Klebsiella pneumoniae* (estirpe M5a1), sendo identificados 20 genes organizados em 8 operons: *nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ* (TEIXEIRA et al., 1998). Os três genes estruturais que codificam para a nitrogenase de molibdênio (convencional) são *nifH*, *nifD* e *nifK*. O gene *nifH* codifica para as Fe-proteínas, enquanto o gene *nifD* codifica para a MoFe-proteína, que é um tetrâmero com peso molecular médio de 220 kDa, correspondente às 4 subunidades ($\alpha_2\beta_2$) organizadas de forma heterodiméricas. A subunidade β destas moléculas é codificada pelo gene *nifK* (EADY et al., 1987). Além dos genes estruturais, outros genes *nif* estão envolvidos com a síntese e processamento do cofator de FeMo (FeMo-co), geração de energia para a nitrogenase, processamento e maturação pós-traducional da nitrogenase e regulação da expressão ao nível de transcrição (TEIXEIRA et al., 1998).

2.5 Microrganismos Diazotróficos

O processo de FBN é realizado por alguns grupos de bactérias (incluindo as cianobactérias) e *Archaea* (ZEHR, 2011). Por muitos anos, um número limitado de microrganismos foi identificado como fixadores de nitrogênio, mas nas últimas décadas, com o avanço das técnicas de biologia molecular, novos representantes dos domínios *Archaea* e *Bacteria* têm sido descobertos (RAYMOND et al., 2004). As bactérias diazotróficas são

encontradas em uma variedade de grupos filogenéticos, podendo ser subdivididas em quatro grupos principais:

- **Cianobactérias:** anteriormente classificadas como algas verde-azuladas; ocorrem como espécies de vida livre e em associação com plantas pteridófitas (*Azolla*), gimnosperma (cicádias), angiosperma (*Gunnera*), briófitas (*Anthosceros*, *Blasia*, *Cavicularia* e *Sphagnum*), sendo que a maior parte das associações é de espécies dos gêneros *Nostoc* e *Anabaena*. Além destas, fungos e algas formadores dos líquens constituem outros exemplos desta simbiose (*Collema*, *Peltigera*, *Leptogium*) (SPRENT e SPRENT, 1990; EVANS et al., 1992; BERGMAN e OSBORNE, 2002). Em cianobactérias filamentosas, a FBN é restrita a algumas células especializadas, os heterocistos, que são separadas das demais células, e mostram redução da atividade fotossintética sem produção de oxigênio pela ausência do fotossistema II (KNEIP et al., 2007). Em cianobactérias unicelulares existe a combinação entre a fotossíntese e a fixação de nitrogênio na mesma célula. Neste caso, existe uma separação temporal destes dois processos, sendo a FBN restrita ao período de escuro, quando os níveis de oxigênio são baixos (BERMAN-FRANK et al., 2003). Em adição a esta proteção, a concentração de oxigênio pode ser diminuída por vias bioquímicas como a reação de Mehler ou por moléculas carreadoras de oxigênio como as cianohemoglobinas (HILL et al., 1996). Geralmente é considerado o maior grupo de microrganismos fixadores de nitrogênio presente nos sistemas aquáticos, incluindo oceanos e lagos (ZEHR, 2011);
- **Actinobactérias:** formam associações simbióticas com representantes de 200 espécies distribuídas em 24 gêneros e oito famílias de angiosperma, e, além disso, são capazes de fixar nitrogênio como bactérias de vida livre (GAUTHIER et al., 1981; VESSEY et al., 2004). Plantas actinorrízicas, como os gêneros *Alnus*, *Comptonia*, *Myrica*, *Coriaria* e *Datisca*, *Gymnostoma*, entre outros são mais numerosas e possuem maior diversidade em regiões temperadas, onde são frequentemente encontradas em solos pobres em nitrogênio (BAKER e MULLIN, 1992). Por um longo tempo, assumiu-se que a fixação de nitrogênio em actinobactérias era limitada ao gênero *Frankia*. Entretanto, estudos moleculares tem aumentado o número de gêneros pertencentes ao grupo de actinobactérias contendo genes relacionados a com a FBN, *nifH* (TRUJILLO et al. 2005; NOUIOUI et al., 2011). O gênero *Frankia* tem a capacidade de estabelecer relações simbióticas com diversas plantas hospedeiras, as quais são denominadas plantas actinorrízica (PERRINE-WALKER et al., 2011). Nesta associação, existe a formação de nódulos radiculares, semelhantes aos encontrados em rizóbio, no entanto, ao contrário dos nódulos de leguminosas, que são limitados por oxigênio, nódulos actinorrízicos mostram máxima velocidade de fixação de nitrogênio em níveis atmosféricos de oxigênio (GAUTHIER et al., 1981).
- **Rizóbio-Leguminosa:** associação entre bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Alorhizobium* e *Azorhizobium*, entre outros, com membros da família *Fabaceae* (antiga *Leguminosae*). Estas bactérias são capazes de nodular espécies arbóreas, forrageiras e graníferas. Nesta associação, as células bacterianas são capazes de infectar as células radiculares de plantas de zonas temperadas e tropicais, formando estruturas especializadas, denominadas nódulos radiculares e caulinares, onde ocorre a fixação de nitrogênio. Nesta simbiose, a concentração de oxigênio é diminuída por moléculas carreadoras de oxigênio tipo leghemoglobinas (APPLEBY e OLDFIELD, 1983; MASSON-BOIVIN et al., 2009).
- **Associativas:** (i) de vida livre: classificadas como bactérias que podem viver e fixar N₂ independentemente de outros organismos. Apresentam elevada população na rizosfera e

rizoplano assumindo importante papel na interação com raízes de plantas e ciclagem de nutrientes (BALDANI et al., 1997). Estas bactérias estão presentes na maioria dos solos e, em determinados ambientes terrestres, podendo atuar como uma fonte dominante de nitrogênio. É um grupo bastante diverso, mas as proteobactérias do gênero *Azospirillum* são as mais bem estudadas (BALDANI e BALDANI, 2005); (ii) endofíticas: nesta interação os microrganismos colonizam os tecidos internos da planta - como apoplasto, vasos condutores e, ocasionalmente no meio intracelular (JAMES e OLIVARES, 1998) - sem causar danos aparentes ao hospedeiro e sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO, 2000). Entre as bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio podemos citar *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*. Em geral, grande parte das bactérias associativas limitam a concentração de oxigênio intracelular, através de elevada taxa de metabolismo respiratório em combinação com a produção de polissacarídeos extracelulares (DALTON e POSTATE, 1969, citado por KNEIP et al., 2007).

A fixação biológica de nitrogênio foi inicialmente descrita em bactérias diazotróficas associativas da rizosfera e do rizoplano de uma grande variedade de plantas não-leguminosas (DÖBEREINER, 1992). Mas, posteriormente as interações simbióticas entre organismos fixadores de nitrogênio e plantas leguminosas foram o foco dos trabalhos de pesquisadores que estudam este processo. De fato, os resultados mostram que as maiores contribuições de nitrogênio via FBN têm sido detectadas em plantas leguminosas. No entanto, evidências significativas de FBN em *Poaceae* (antiga *Gramineae*) de importância econômica, como cana-de-açúcar, arroz, milho, trigo, sorgo, *Brachiaria* sp, entre outras despertaram grandes interesses nos estudos de fixação de nitrogênio em plantas não-leguminosas (BALDANI e BALDANI, 2005; REIS et al., 2006).

Desde então, um grande número de gêneros/espécies de bactérias capazes de contribuir significativamente com N para seus hospedeiros têm sido identificadas incluindo *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derrxia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Sphingomonas*, *Xanthobacter*, entre outros (BARRIUSO et al., 2008; ROY et al., 2010; SAHARAN e NEHRA, 2011).

CAPÍTULO I

OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS ÀS PLANTAS DE CAPIM-ELEFANTE¹

¹ Capítulo publicado na revista *Plant and Soil* (2011)_DOI 10.1007/s11104-011-1082-6

RESUMO

Alguns genótipos de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) são capazes de produzir grande quantidades de biomassa e acumular N derivado da FBN quando cultivados em solos com baixos níveis de N. Entretanto, informações sobre bactérias diazotróficas colonizando esta planta C₄ são ainda muito escassas. O objetivo deste estudo foi quantificar e identificar uma fração da população de bactérias diazotróficas cultivável colonizando os genótipos CNPGL91F06-3 e Cameroon, bem como suas características para auxiliar na promoção de crescimento vegetal. Usando cinco meios de cultivo semi-sólidos livres de N, um total de 204 isolados foram obtidos de folhas, colmo e raízes. Estes foram analisados por BOX-PCR, e sequências dos genes 16S rRNA e *nifH* de isolados representativos foram obtidas. A habilidade funcional dos isolados para reduzir acetileno, produzir compostos indólicos e solubilizar fosfato também foram determinadas. A população de bactérias diazotróficas variou de 10² a 10⁶ células g⁻¹ de matéria fresca em ambos os genótipos. As análises de BOX-PCR sugeriram variabilidade na diversidade genética entre os 204 diazotróficos colonizando os diferentes genótipos e tecidos. O sequenciamento de fragmentos do gene 16S rRNA confirmaram a presença de *Azospirillum brasilense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* e revelaram pela primeira vez a ocorrência de *G. liquefaciens*, *G. sacchari*, *Burkholderia silvatlantica*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter cloacae* e *E. oryzae* em capim-elefante. Interessantemente, muitas sequências do gene *nifH* de isolados identificados como *G. liquefaciens* e *G. sacchari* mostraram homologia com sequências de *nifH* de espécies de *Enterobacter*. A identificação baseada em tipos de colônia e pigmentação nos respectivos meios de isolamento indicaram baixa similaridade com colônias de estirpes tipo de diazotróficas usadas para comparação. Nas condições testadas, a atividade da nitrogenase foi detectada em 74,5% das bactérias; 97% produziu compostos indólicos e 22% solubilizaram fosfato. Os resultados mostraram a ocorrência de novas espécies de bactérias colonizando diferentes tecidos de ambos os genótipos de capim-elefante. Adicionalmente, este estudo revelou a presença de muitas bactérias com características para promoção de crescimento vegetal, com potencial para serem exploradas como biofertilizantes.

ABSTRACT

Some elephant grass (*Pennisetum purpureum*) genotypes are able to produce large amounts of biomass and accumulate N derived from BNF when growing in soil with low N levels. However, information about the diazotrophic bacteria colonizing this C₄ plant is still very scarce. The objective of the present study was enumerated and identified a fraction of the N₂-fixing bacterial species colonizing the genotypes CNPGL91F06-3 and Cameroon, as well as characterize their plant growth promoting traits. A total of 204 isolates were obtained from surface sterilized leaves, stems and roots after culturing on five different N-free semisolid media. These isolates were then analyzed by BOX-PCR, and the 16S rRNA and *nifH* sequences of representative isolates were obtained. The functional ability of the isolates to reduce acetylene, produce indoles and solubilize phosphate was also determined. The diazotrophic bacterial population varied from 10² up to 10⁶ bacteria g⁻¹ fresh tissues of both genotypes. The BOX-PCR analysis suggested a trend in the genetic diversity among the 204 diazotrophic strains colonizing the different genotypes and plant tissues. Sequencing of 16S rRNA fragments confirmed the presence of *Azospirillum brasilense* and *Gluconacetobacter diazotrophicus* and revealed for the first time the occurrence of *G. liquefaciens*, *G. sacchari*, *Burkholderia silvatlantica*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter cloacae* and *E. oryzae* in elephant grass. Interestingly, several *nifH* sequences from isolates identified as *G. liquefaciens* and *G. sacchari* showed homologies with *nifH* sequences of *Enterobacter* species. Identification based on the colony types and pigmentation on the respective isolation medium indicated low level os similarity with the type-strains colony used for comparison. The majority of the isolates showed nitrogenase activity (75.5%), 97% produced indole compounds, 22% solubilized phosphate and 6.4% possessed both characteristics. The results showed the occurrence of novel diazotrophic bacterial species colonizing different tissues of both genotypes of elephant grass. In addition, the study revealed the presence of several bacteria with growth promoting traits, and highlighted their potential to be exploited as biofertilizers.

1 INTRODUÇÃO

A presença de bactérias promotoras de crescimento vegetal e a possibilidade de contribuição significativa no desenvolvimento e na produção de seus hospedeiros têm sido discutidas por muitas décadas. Isto porque, muitas bactérias estão envolvidas direta ou indiretamente em processos que afetam o ciclo de vida das plantas, como a fixação de nitrogênio atmosférico, modulação de fitoreguladores, biocontrole de fitopatógenos, entre outros mecanismos (COMPANT et al., 2010). Para culturas de interesse econômico, uma das interações planta-bactéria mais bem conhecida é a fixação biológica de nitrogênio (FBN). A FBN é um processo bioquímico altamente especializado - realizado por microrganismos fixadores de nitrogênio (diazotróficos) - pelo qual bactérias associadas à planta utilizam parte da energia derivada da fotossíntese de seus hospedeiros para transformar o N₂ do ar em amônia, tornando-o disponível para utilização pelas plantas.

Várias culturas agroenergéticas do Brasil, entre elas a cana-de-açúcar e o capim-elefante, têm mostrado grande potencial de associação com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), entre elas as bactérias diazotróficas. De acordo com Boddey et al., (1995), a cana-de-açúcar é a única cultura não-leguminosa capaz de obter até 80% do N total da planta através da FBN em condições ótimas, ou seja, condições favoráveis de umidade, disponibilidade de molibdênio, entre outros fatores. Estes resultados se justificam pelo grande número de bactérias diazotróficas que colonizam esta cultura, bem como pela alta eficiência da interação planta-bactéria, visto que somente a presença das bactérias não significa necessariamente que as mesmas sejam eficientes na fixação do N e que as plantas poderão obter contribuições significativas do N fixado biologicamente (KIRCHHOF et al., 1997a). Por muitos anos, uma série de estudos de isolamento, identificação e seleção de bactérias diazotróficas vem sendo realizados a fim de obter estirpes cada vez mais eficientes na promoção de crescimento desta cultura (DÖBEREINER et al., 1972; OLIVEIRA et al., 2002). Gêneros de bactérias fixadoras de N₂ como *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Burkholderia*, *Pantoea*, entre outros, têm sido identificados em grande número na rizosfera e no interior dos tecidos vegetais de cana-de-açúcar (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988; OLIVARES, 1997; REIS et al., 2004; PERIN, et al., 2006).

Para o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), os resultados também são promissores e indicam que as contribuições de N derivado da FBN variam entre 30 e 45%, representando cerca de 50 a 130 kg N ha⁻¹ (QUESADA, 2005; MORAIS et al., 2009, 2011). Considerando que programas bioenergéticos somente apresentam viabilidade técnica e ambiental se o balanço energético for expressivamente positivo, e que os fertilizantes nitrogenados afetam negativamente este balanço – pela demanda de grandes quantidades de energia fóssil e/ou emissão de gases de efeito estufa no seu processo produtivo (BODDEY et al., 2008) – o desenvolvimento de práticas agrícolas alternativas para suprir a nutrição nitrogenada e promoção de crescimento de plantas agroenergéticas torna-se um assunto de grande importância.

Embora as contribuições de N derivado da FBN sejam significativas e estejam bem documentadas na literatura, estudos de ocorrência, identificação e seleção de bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal associadas à cultura do capim-elefante são escassos. Os primeiros resultados de isolamento e caracterização taxonômica de bactérias diazotróficas em *Pennisetum purpureum*, e outras culturas energéticas similares, mostraram que a população de bactérias variou de 10⁵ a 10⁶ células por grama de tecido fresco de raízes e 10⁴ a 10⁵ células por grama de tecido fresco de parte aérea (SILVA et al., 1995; KIRCHHOF

et al., 1997a). Posteriormente, os isolados provenientes destas plantas foram identificados como pertencentes aos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, com maior similaridade com *A. lipoferum* e *H. frisingense* (KIRCHHOF et al., 1997a,b). Estudos conduzidos por Reis et al., (2000, 2001), usando métodos imunológicos e cultivo em meio semi-sólido livre de nitrogênio, também identificaram que raízes e parte aérea de 14 genótipos de capim-elefante eram colonizados por bactérias fixadoras de N₂ dos gêneros *Herbaspirillum* e *Azospirillum*, e que a população das mesmas variou em função do tecido testado. Estes autores, utilizando métodos baseados em ¹⁵N, confirmaram pela primeira vez que diferentes genótipos de capim-elefante recebiam contribuições significativas de N derivado da FBN.

Em estudos subsequentes, uma análise genética de estirpes originadas de plantas de *Pennisetum* e *Miscanthus* cultivadas no Brasil e na Alemanha mostrou baixa diversidade entre os isolados (KIRCHHOF et al., 2001; ECKERT et al., 2001). Esses autores sugeriram que as condições seletivas intrínsecas a espécie de poáceas foi o maior fator que regulou a população de bactérias diazotróficas endofíticas. Além disso, o uso de meios de cultivo semi-seletivos (NFb, JNFb e LGI) para o isolamento também pode estar relacionado a baixa diversidade da população. É sabido que esses meios de cultivo semi-sólidos livres de nitrogênio permitem a avaliação de uma fração da população de bactérias diazotróficas cultiváveis que colonizam espécies de gramíneas, como o capim-elefante. Embora a utilização destes meios de cultivo seja limitada para a identificação da real população de bactérias diazotróficas associada às gramíneas, estes são procedimentos mais fáceis e práticos para o isolamento e seleção de estirpes diazotróficas com potencial para futuras aplicações como biofertilizantes (DÖBEREINER, 1988).

Considerando a contribuição significativa da fixação biológica de nitrogênio para diferentes genótipos de capim-elefante, bem como a existência de bactérias diazotróficas em associação com raízes e parte aérea desta planta, o presente capítulo tem como objetivos (i) ampliar o conhecimento sobre a comunidade de bactérias diazotróficas cultiváveis associada a dois genótipos de capim-elefante com elevada contribuição da FBN; (ii) identificar estirpes promissoras que possam contribuir com quantidades significativas de N via FBN e auxiliar na promoção de crescimento vegetal através de outros mecanismos como a produção de fitoreguladores e solubilização de fosfato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições Experimentais

O experimento foi implantado por Morais (2008) no Campo Experimental da Embrapa Agrobiologia, localizado no Município de Seropédica, RJ (coordenadas geográficas 22° 46' de latitude Sul e 43° 41' de longitude Oeste), em um solo classificado como Argissolo vermelho-amarelo contendo pH (H₂O) 6,0, 5 mg kg⁻¹ de P, 34 mg kg⁻¹ de K, 0,95 g kg⁻¹ de N, 0 cmol_c dm⁻³ de Al trocável, 3 cmol_c dm⁻³ de Ca trocável, 1,6 cmol_c dm⁻³ de T trocável, segundo metodologia descrita em EMBRAPA-SNLCS. De acordo com a análise de solo, realizou-se uma adubação de plantio contendo 100 kg ha⁻¹ de P₂O₅, 150 kg ha⁻¹ de K₂O e 60 kg ha⁻¹ de micronutrientes (FTE BR 12) (MORAIS, 2008).

As plantas de capim-elefante (*P. purpureum* Schum.) foram coletadas em Março de 2009 - com aproximadamente 3 meses após a rebrota - e divididas em 5 partes: folha (F), raiz (R), colmo basal (0-40 cm) (CB), colmo mediano (40-80 cm) (CM) e colmo apical (80-120 cm) (CA) (Figura 1). Três replicatas de cada genótipo - Cameroon e CNPGL91F06-3 - foram utilizadas neste estudo.

2.2 Quantificação e Isolamento de Bactérias Diazotróficas

Microrganismos diazotróficos foram quantificados e isolados usando a técnica de diluição seriada pela utilização de cinco meios de cultivo semi-sólido livre de nitrogênio. Os meios são utilizados para o isolamento de algumas espécies de bactérias diazotróficas como *Azospirillum lipoferum* e/ou *A. brasilense*; *Herbaspirillum* spp; *Burkholderia* spp; *A. amazonense* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

As amostras de raiz foram lavadas em água corrente para remover o excesso de solo e em seguida submetidas a três lavagens sucessivas com água destilada; amostras de folha e colmo foram lavadas com água destilada e, posteriormente, desinfestadas superficialmente com álcool 70%, em seguida as amostras de colmo foram descascados. Dez gramas de material vegetal foram misturadas com 90 mL de solução salina e maceradas com auxílio de um liquidificador. Alíquotas de 100 µL de cada diluição (até 10⁻⁸) foram inoculadas em frascos contendo 5 mL dos meios de cultura semi-sólido NFb, LGI, JNFb, LGI e LGI-P (DÖBEREINER et al., 1995), sendo os mesmos incubados sob temperatura de 30 °C por sete dias. O método utilizado para a contagem de bactérias diazotróficas foi o Número Mais Provável (NMP), conforme descrito por Döbereiner et al. (1995). Foram utilizados três frascos por diluição, e o resultado foi avaliado pela presença ou ausência de película característica das bactérias diazotróficas nos meios de cultivo. Utilizou-se a tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995) – como método estatístico - para determinar o NMP de bactérias diazotróficas por grama de amostra. Posteriormente os dados foram transformados para log (NMP+1) e a análise de variância foi realizada utilizando-se o programa Sisvar. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

As películas característica de diazotróficos presente nos frascos de maior diluição foram repicadas para novos frascos com meios semi-sólidos (NFb, LGI, JNFb, LGI e LGI-P) e após confirmação de crescimento, uma alíquota das novas películas foi estriada em placas contendo meio sólido correspondente contendo 20 mg de extrato de levedura. Este procedimento foi realizado a fim de purificar e selecionar, baseado em características fenotípicas das colônias, estirpes de bactérias diazotróficas. Colônias bacterianas purificadas

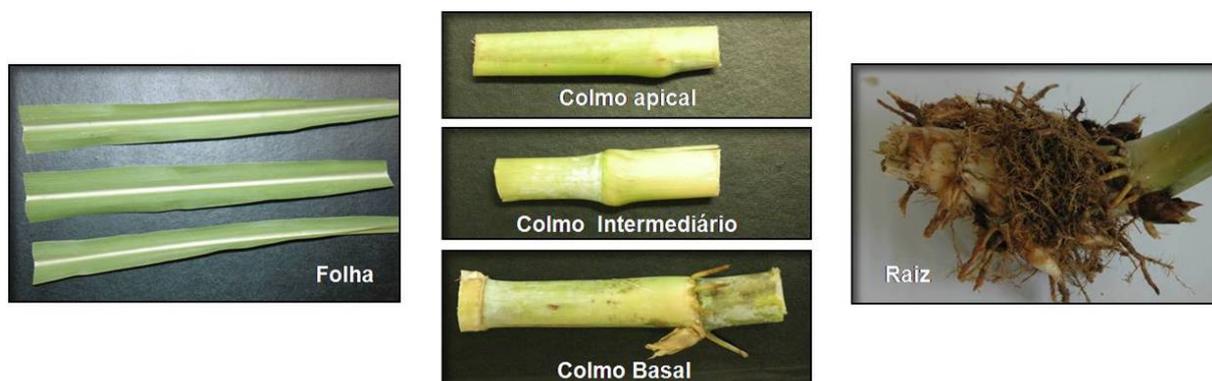


Figura 1 Tecidos de capim-elefante utilizados para a quantificação e isolamento da população de bactérias diazotróficas.

foram novamente testadas quanto à capacidade de crescimento em meios semi-sólidos, e em seguida mantidas em glicerol 50% e armazenadas em *freezer* a -20°C para análises futuras.

2.3 Estirpes-Referência

Além dos isolados bacterianos originados dos tecidos vegetais, as seguintes estirpes-referência foram usadas para comparação nas análises fenotípicas e moleculares: *Burkholderia tropica* (Ppe8), *B. vietnamiensis* (TVV75), *B. silvatlantica* (SRMrh-20), *B. kururiensis* (KP23), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), *H. frisingense* (GSF30), *H. rubrisubalbicans* (HCC103), *Azospirillum brasilense* (Sp245), *A. lipoferum* (Sp59), *A. amazonense* (CBAmC), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) e *Azotobacter chroococcum* (AC1), sendo esta somente para as análises de solubilização de fosfato.

2.4 Caracterização Molecular

Para as extrações de DNA genômico total, os isolados purificados foram cultivados em meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) (em g L^{-1} : glucose, 2,0; peptona, 1,5; extrato de levedura, 2,0; K_2HPO_4 , 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; e ácido glutâmico, 1,5, pH 6,0) por 24 horas sob temperatura de 30°C . Um mililitro de suspensão bacteriana foi centrifugado na rotação máxima e a extração foi realizada com o *Wizard genomic DNA purification kit* (Promega, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e quantidade do DNA genômico total foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose 1% e em espectrofotômetro Nanodrop® 3300 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA).

2.4.1 Análise de BOX-PCR

A diversidade genotípica das bactérias isoladas foi determinada com a análise de BOX-PCR. As reações de PCR foram realizadas com 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 foi realizada em um volume final de 25 μL , contendo 25 ng de DNA genômico; tampão 1X; Tween 20 0,05%; 3 mM de MgCl_2 ; 0,3 mM de cada dNTP; 1 U de *Taq* DNA polimerase e 2 μM do iniciador BOX A1R. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado para realizar uma desnaturação inicial de 94°C por 7 min.; seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min.; a 53°C por 1 min.; a 65°C por 8 min.; e uma extensão final a 65°C por 16 min. Após o término da reação, 12 μL de produto de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5 % a uma voltagem de 65 volts ($\sim 3,5 \text{ V cm}^{-1}$

¹) por 6 horas em tampão TAE 1X. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador KODAK Gel Logic Cabinet 100 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA). As imagens foram capturadas, arquivadas como documentos do tipo TIFF e processadas pelo programa GelCompar II versão 2.0 para Windows (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). As matrizes de similaridade foram calculadas pelo coeficiente de Jaccard e o agrupamento de matrizes de similaridade utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*).

Com base nos resultados obtidos pela técnica de BOX-PCR, isolados representativos de cada grupo foram selecionados para a identificação taxonômica através do sequenciamento do gene 16S rDNA e *nifH*.

2.4.2 Amplificação do gene 16S rDNA

Para a amplificação do fragmento do gene 16S rDNA foi utilizada a combinação dos iniciadores 27f (5'-AGA GTT TA TCC TG CTC AG -3') (FURUSHITA et al., 2003) e Amp2 (5'-AAG GAG GT ATC CAR CCG CA-3') (WANG et al., 1996) como descrito por Videira et al. (2009). Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 μL , contendo 25 ng DNA genômico; tampão 1X; Tween 20 0,05 %; 1,5 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 U de *Taq* DNA polimerase e 0,2 μM de cada iniciador. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado para realizar uma desnaturação inicial de 94°C por 3 min.; seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min; 60 °C por 1 min; e a 72 °C por 1 min e 30 seg; e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Após o término da reação, 5 μL de produto de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5 % a uma voltagem de 100 volts ($\sim 5 \text{ V cm}^{-1}$) por 2 horas em tampão TAE 1X. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador KODAK Gel Logic Cabinet 100 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA).

2.4.3 Amplificação do gene *nifH*

Para a amplificação de fragmentos do gene *nifH* foi utilizada a combinação dos iniciadores PolF (5'-TC GAY CCS AAR GCB GAC TC-3') e PolR (5'- ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA-3') (POLY et al., 2001). Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 50 μL , contendo 25 ng DNA genômico; tampão 1X; 3 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM de cada dNTP; DMSO 5%; 1,5 U de *Taq* DNA polimerase e 0,5 μM de cada iniciador. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado para realizar uma desnaturação inicial de 94°C por 3 min.; seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min; 56 °C por 45 seg; e 72 °C por 45 seg; e uma extensão final a 72 °C por 5 min. Após o término da reação, 5 μL de produto de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5 % a uma voltagem de 100 volts ($\sim 5 \text{ V cm}^{-1}$) por 1,5 horas em tampão TAE 1X. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador KODAK Gel Logic Cabinet 100 (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA).

2.4.4 Sequenciamento e análise de similaridade

Os produtos de PCR foram purificados com Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega, Madison, USA) e sequenciados usando um ABI 3500xL Genetic Analyzers (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido). As amplificações para sequenciamento dos fragmentos dos genes 16S rRNA e *nifH* foram realizadas em microplacas

de 96 poços (code 128) usando os mesmos iniciadores descritos anteriormente. Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 10 µL, contendo 2 µL de Big Dye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido); 0,5 µM do iniciador; 10-20 ng do produto de PCR; e 2 µL de tampão (400 mM Tris-HCl, pH 9; 10 mM de MgCl₂). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado para realizar uma desnaturação inicial de 96°C por 1 min.; seguido de 25 ciclos a 96°C por 10 sec; 50 °C por 5 sec; e 60 °C por 4 min. Para cada 10 µL dos produtos da PCR de sequenciamento adicionou-se 125 mM de EDTA, 1 µL de acetato de amônio 3 M e 25 µL de etanol absoluto. As placas foram seladas, misturadas por inversão, incubadas a temperatura ambiente por 15 min e centrifugadas a 2000 x g por 45 minutos. Em seguida, as placas foram invertidas e submetidas a um spin de até 185 x g. Foram adicionados 35 µL de etanol 70% e a microplaca foi submetida à centrifugação de 185 x g a 4°C por 15 minutos. Procedeu-se uma nova centrifugação a 185 x g por 15 minutos, e as amostras permaneceram sob temperatura ambiente até completa secagem. As amostras foram resuspendidas em 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) e desnaturadas a 95°C por 5 min antes de submetidas ao ABI 3500xL Genetic Analyzers (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido).

As sequências obtidas foram analisadas e submetidas ao programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1997), para comparação com sequências similares depositadas no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). A árvore filogenética foi construída com base nos fragmentos do gene 16S rDNA (~1400 pb) e *nifH* (~360 pb). As sequências selecionadas foram processadas pelo programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011) e a árvore consenso construída pelo método Neighbor-Joining, considerando um *bootstrap* de 1.000 repetições.

2.5 Caracterização Fenotípica

Após sete dias de cultivo em meio de cultura sólido - correspondente ao meio de isolamento - as colônias bacterianas foram avaliadas quanto: (i) tamanho: menor que um mm, puntiforme e maior que um mm; (ii) dimensão; (iii) cor; (iv) forma da colônia, em circular ou irregular; (v) elevação: plana, lente, convexa, pulvinada, umbonada ou umbilicada; (vi) borda: ondulada, lobada, denteada, filamentosa ou inteira; e (vii) superfície: lisa, rugosa ou papilada; (viii) consistência: seca ou gomosa (YANO et al., 1993).

2.6 Caracterização Funcional

2.6.1 Atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase dos isolados foi avaliada pelo método de redução de acetileno (ARA) conforme descrito por Boddey et al. (1987), utilizando frascos de vidro, com volume de 10 mL, contendo 5 mL de meio semi-sólido livre de N. Estes frascos foram inoculados com 20 µL de suspensões bacterianas previamente cultivadas em meio DYGS líquido por 24 h. Após a formação da película característica os frascos foram vedados com rolhas de borracha perfurável do tipo *sub-seal* e 10% da capacidade do frasco foi injetada com acetileno (1 mL). Estes frascos foram incubados por meia hora sob temperatura de 30°C. Em seguida, 0,5 mL da fase gasosa do frasco foram introduzidos no cromatógrafo de gás com detecção por ionização de chama, Perkin Elmer Autosystem, utilizando uma coluna Poropak N de 1 m a 70°C, com vazão de 56 mL mm⁻¹.

Para normalizar os valores de atividade de redução de acetileno, o conteúdo de proteínas foi determinado pelo método descrito por Bradford (1976). Após leitura de ARA, os frascos foram submetidos a agitação até a completa homogeneização da película e o meio de

cultura e, em seguida, alíquotas de 100 µL desta suspensão foram transferidas para um tubo contendo 100 µL de NaOH 1M. A mistura foi incubada por 30 min a temperatura ambiente para lisar as células. Em um tubo de ensaio, 100 µL da solução anterior foi adicionado a 900 µL de solução de Bradford (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, EUA) e incubada sob temperatura de 37°C por 30 min. As leituras foram feitas em leitor de microplaca Thermo iems reader MF (Labsystem, Helsinki, Finlândia) com um comprimento de onda de 600 nm. A concentração de proteína foi estimada utilizando uma curva padrão com quantidades conhecidas de albumina de soro bovino (10 a 200 µg de BSA). Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o resultado foi decorrente de uma média das 3 leituras.

2.6.2 Produção de compostos indólicos

Os isolados foram analisados quanto à produção de compostos indólicos através do método de microplaca descrito por Sarwar e Kremer (1995). As bactérias foram cultivadas em meio DYGS líquido por 24 horas sob temperatura de 30°C. Em seguida, uma alíquota de 10 µl de cultura bacteriana foi inoculada em frascos contendo 5 mL de meio DYGS suplementado com L-triptofano na concentração final de 100 µg mL⁻¹. Os tubos permaneceram no escuro sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C. Alíquotas de 1 mL foram retiradas após 48 e 72 horas de cultivo e centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos. Em microplacas de 96 poços, 150 µl do sobrenadante foram misturados a 100 µl do reagente de Salkowski (1 mL de 0,5 M FeCl₃ em 49 mL de ácido perclórico 35 %) previamente preparado. As amostras permaneceram no escuro por 30 minutos sob temperatura ambiente e a leitura de absorbância foi feita em um leitor de microplaca Thermo iems reader MF (Labsystem, Helsinki, Finlândia) com um comprimento de onda de 540 nm. A concentração dos compostos indólicos foi estimada utilizando uma curva padrão previamente preparada com quantidades conhecidas de ácido 3-indol-acético (25 a 300 µg mL⁻¹). Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o resultado foi decorrente de uma média das 3 leituras. As células centrifugadas durante o procedimento para determinação de compostos indólicos foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultivo DYGS e alíquotas de 100 µL desta suspensão foram usadas para determinação do conteúdo de proteínas, afim de normalizar os valores de compostos indólicos produzidos. Os procedimentos foram realizados conforme descrito no item 2.6.1.

2.6.3 Solubilização de fosfato de cálcio

A capacidade de solubilização de fosfato inorgânico (FI) foi testada em meio de cultura NBRIP sólido (*National Botanical Research Institute's Phosphate*). Este meio foi desenvolvido por Nautiyal et al. (1999) contendo 10 g de glicose; 5 g de Ca₃(PO₄)₂; 5 g de MgCl₂.6H₂O; 0,25 g de MgSO₄.7H₂O; 0,2 g de KCl; 0,1 g de (NH₄)₂SO₄; 15 g de ágar; pH 7,0 e volume final de 1 litro. As bactérias foram cultivadas em meio DYGS líquido por 24 horas sob temperatura de 30°C. Em seguida, usando o método do plaqueamento em gota, uma alíquota de 20 µl foi inoculada na superfície da placa de Petri contendo o meio de cultivo solidificado. O diâmetro do halo de solubilização, percebido como uma área translúcida ao redor da colônia, foi determinado após 8 e 15 dias de incubação. Foram utilizadas 4 alíquotas por placa e 3 repetições de cada placa.

3 RESULTADOS

3.1 Quantificação e Isolamento de Bactérias Diazotróficas

A presença de bactérias diazotróficas colonizando folha, colmo e raiz de ambos os genótipos de capim-elefante foi demonstrada pela formação de película característica em todos os cinco meios semi-sólidos livres de nitrogênio (NFb, JNFb, JMV, LGI e LGI-P). O tamanho da população de bactérias diazotróficas viáveis colonizando estas plantas variou de 10^2 a 10^6 bactérias por grama de tecido fresco. Diferenças significativas ($p > 0,05$) foram observadas no número total de bactérias diazotróficas em função dos genótipos, tecidos e meios de cultivo testados (Tabela 1). De maneira geral, o genótipo CNPGL91F06-3 apresentou população de bactérias maior quando comparado com o genótipo Cameroon. Um total de 204 isolados de bactérias diazotróficas foram obtidos de diferentes tecidos de ambos os genótipos de capim-elefante. Deste total, 40 (19,6%) foram originados das raízes, 40 (19,6%) das folhas e 124 (60,8%) foram isolados de 3 partes do colmos (Tabela 1).

Vale a pena ressaltar que o número de isolados originados do colmo não diferiu entre as subdivisões analisados, sendo 42 isolados do colmo apical, 37 do mediano e 45 do basal, indicando que o procedimento usado para isolar estas bactérias não favoreceu nenhuma parte da planta. Um total de 103 isolados foram obtidos do genótipo CNPGL91F06-3 (CN) e 101 do genótipo Cameroon (CA). As análises também mostraram que 68 isolados foram obtidos usando o meio JNFb (JN), 25 com LGI (LG), 43 com LGI-P (LP) e 63 com JMV (JM) (Tabela 1). Durante o processo de estocagem, a maioria das estirpes originárias do meio NFb foram perdidas, restando somente 6 viáveis. Considerando que estas foram isoladas de um meio de composição semelhante ao meio JNFb, estas estirpes, identificadas com o código NF, foram analisadas juntamente com os isolados provenientes do meio JNFb.

3.2 Caracterizações Moleculares

Todos os 204 isolados foram agrupados com base nos perfis de BOX-PCR, gerados em função do meio de cultivo usado para o isolamento das bactérias diazotróficas (Figuras 2-5). Foi possível observar um grande e diverso número (2 a 20) de fragmentos entre os perfis de BOX-PCR o que possibilitou discriminar, com cerca de 70% de similaridade, a maioria das bactérias. Os isolados que mostraram alta similaridade entre os perfis foram considerados com alto nível de similaridade genética. Esta estratégia permitiu a seleção de isolados representativos dentro de cada grupo para as análises taxonômicas usando sequências parciais do gene 16S rRNA (600-900 pb) (isolados indicados com “*” nas Figuras 2-5).

As análises das sequências parciais do gene 16S rRNA permitiram a identificação taxonômica de 45 isolados em nível de gênero, embora em alguns casos inferiu-se sobre as espécies com base no tamanho do fragmento sequenciado (Tabela 2). A análise dos dados revelou que sequências de bactérias diazotróficas que predominantemente colonizam os tecidos dos genótipos Cameroon e CNPGL91F06-3 no momento da coleta eram similares ao gênero *Gluconacetobacter*, seguido por *Azospirillum* e *Enterobacter*. Considerando os perfis de BOX-PCR e a classificação taxonômica dos isolados, não foi observado efeito de genótipo (CNPGL91F06-3 e Cameroon) e tecido (raiz, colmo e folha) na composição de bactérias diazotróficas. Os isolados provenientes de cada genótipo e parte da planta foram distribuídos randomicamente entre os gêneros bacterianos identificados. Fragmentos de ~1.450 pb do gene 16S rDNA de estirpes representativas de cada gênero foram comparados com sequências de bactérias depositadas no banco de dados NCBI, e estes confirmaram resultados na Tabela 2.

Tabela 1. Quantificação da população de bactérias diazotróficas cultiváveis (log do número de células por grama de tecido fresco) colonizando dois genótipos de capim-elefante usando 5 meios de cultivo semi-sólidos livres de nitrogênio.

Meio de cultivo/ Genótipo	Tecido vegetal					Média	Total de Isolados
	Folha	Colmo			Raiz		
		apical	mediano	basal			
Meio NFb							
CNPGL91F06-3	3,78* bB	5,36 aA	5,60 aA	5,67 aA	5,49 aA	5,18 a	1
Cameroon	4,60 aB	4,67 bB	4,76 bB	4,90 bAB	5,59 aA	4,90 b	5
Meio JNFb							
CNPGL91F06-3	3,53 bC	5,09 aAB	5,04 aAB	4,57 aB	5,32 aA	4,71 a	39
Cameroon	4,40 aB	4,41 bB	4,59 aB	4,48 aB	5,40 aA	4,66 a	29
Meio LGI							
CNPGL91F06-3	3,18 aC	4,15 aAB	5,47 aA	4,27 aAB	5,06 aA	4,42 a	19
Cameroon	3,34 aBC	2,51 bC	4,57 aAB	4,78 aA	4,31 aAB	3,90 b	6
Meio LGI-P							
CNPGL91F06-3	4,34 aC	5,32 aAB	5,81 aA	4,48 aBC	5,73 aA	5,14 a	10
Cameroon	4,48 aA	4,57 bA	4,82 bA	4,52 aA	4,57 bA	4,59 b	33
Meio JMV							
CNPGL91F06-3	3,71 aB	5,03 aA	4,81 aAB	4,59 aAB	4,78 aAB	4,58 a	34
Cameroon	4,16 aA	4,01 bA	3,74 bA	4,45 aA	4,87 aA	4,25 a	28
Média	3,96C	4,51B	4,92AB	4,67B	5,11A	-	
Total de isolados	40	42	37	45	40	-	204

* Valores referentes a média de 3 repetições. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey ($P > 0,05$). Médias seguidas por letras minúsculas separam genótipos dentro de cada meio de cultivo e parte da planta (coluna). Médias seguidas por letras maiúsculas separam parte da planta dentro de cada genótipo (linha). O coeficiente de variação para os meios semi-sólidos NFb, JNFb, LGI and LGI-P, JMV foram 6,60%, 5,88%, 13,09%, 7,99% e 10,60%, respectivamente.

As análises filogenéticas indicam a presença de *G. diazotrophicus* (LP343), *G. liquefaciens* (LP520, JM444 e LG214) e *G. sacchari* (JM60 e LP433) em plantas de capim-elefante (Figura 6). Além destas espécies, sequências similares a espécie *A. brasilense* (JN73 e JN246) e *Burkholderia silvatlantica* (JM2441) foram também identificadas colonizando os tecidos analisados (Figura 6).

Outras bactérias filogeneticamente similares às espécies *E. cloacae* (LG222 e LP161) e *E. oryzae* (JM180 e JM489) também foram detectadas entre as diazotróficas isoladas (Figura 6). Embora todos os isolados tenham sido obtidos de meios semi-sólidos livres de N, para confirmação de que estes são organismos diazotróficos, todos os 204 isolados foram submetidos a amplificação do gene *nifH* usando iniciadores degenerados descritos por Poly et al., (2001). A reação de PCR mostrou que todos os isolados, exceto JN128, amplificaram um produto de tamanho esperado (~360 pb) visualizados em eletroforese em gel de agarose. As sequências do gene *nifH* dos 13 isolados identificados anteriormente com base no gene 16S rDNA mostraram que as estirpes JN73 e JN246 tiveram 99% de homologia com sequências do gene *nifH* de *A. brasilense*, enquanto JM241 mostrou >99% de homologia com gene *nifH* de *B. silvatlantica* e LP343 apresentou maior similaridade com *nifH* de *G. diazotrophicus* (Figura 7). As demais estirpes, incluindo espécies identificadas como *Gluconacetobacter* com base no 16S rDNA, mostraram alta homologia com gene *nifH* de espécies de *E. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* e Bacterium QZ25S, uma estirpe isolada de tecidos de cana-de-açúcar (Figura 7).

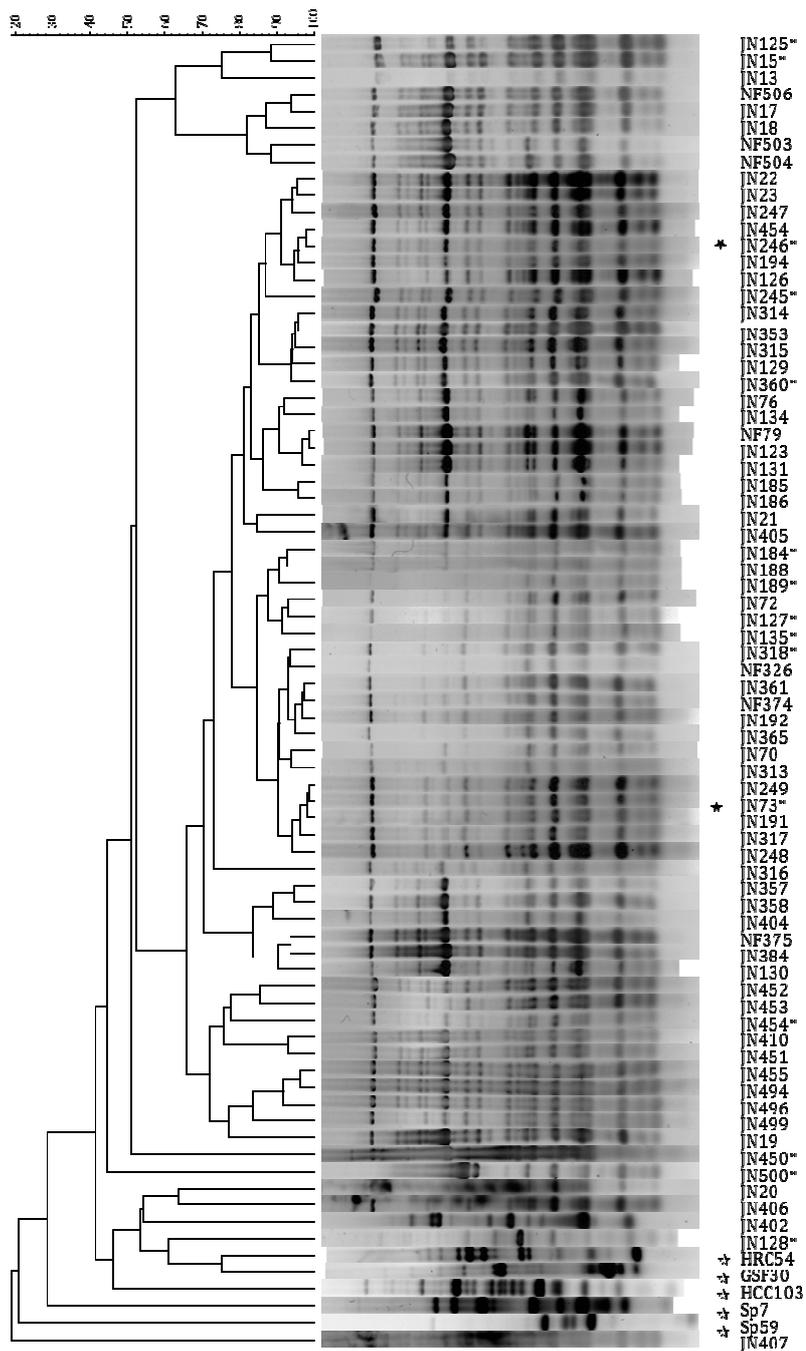


Figura 2 Dendrograma obtido pela análise de grupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados obtidos dos meios JNfb e NFb. As similaridades foram calculadas usando coeficiente de Jaccard e os grupamentos usando UPGMA. Isolados indicados com o símbolo “*” foram usados para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA enquanto aqueles identificados com “☆” foram usados para sequenciamento total do gene 16S rRNA. Estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), *H. rubrisubalbicans* (HCC103), *H. frisingense* (GSF30), *Azospirillum brasilense* (Sp7) e *A. lipoferum* (Sp59) foram incluídas na análise (☆).

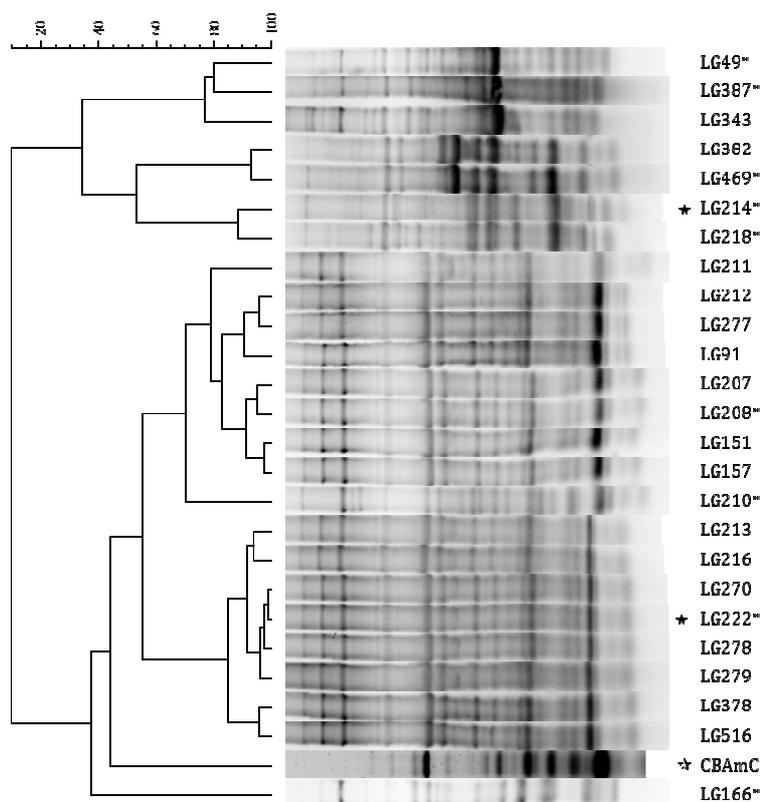


Figura 3 Dendrograma obtido pela análise de grupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados obtidos do meio LGI. As similaridades foram calculadas usando coeficiente de Jaccard e os grupamentos usando UPGMA. Isolados indicados com o símbolo “*” foram usados para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA enquanto aqueles identificados com “☆” foram usados para sequenciamento total do gene 16S rRNA. A estirpe CBAmC de *Azospirillum amazonense* foi incluída na análise (☆).

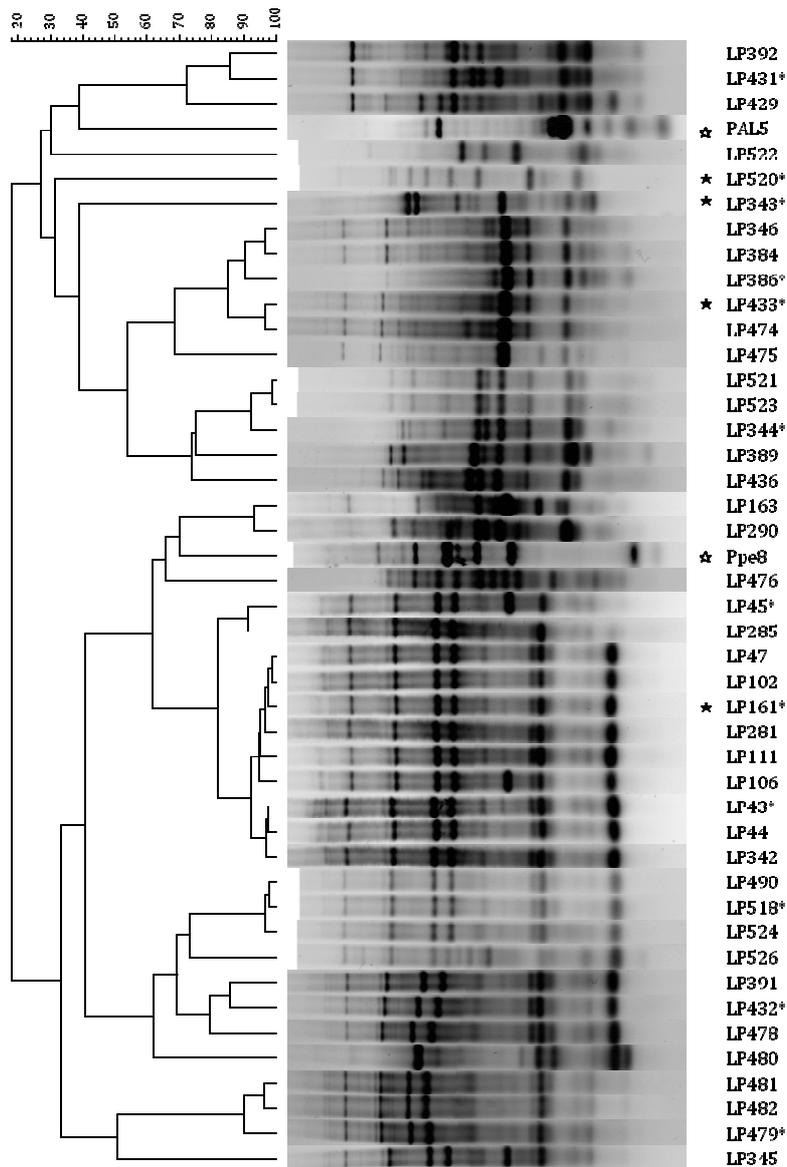


Figura 4 Dendrograma obtido pela análise de agrupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados obtidos do meio LGI-P. As similaridades foram calculadas usando coeficiente de Jaccard e os agrupamentos usando UPGMA. Isolados indicados com o símbolo “*” foram usados para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA enquanto aqueles identificados com “★” foram usados para sequenciamento total do gene 16S rRNA. Estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5) e *Burkholderia tropica* (Ppe8) foram incluídas na análise (☆).

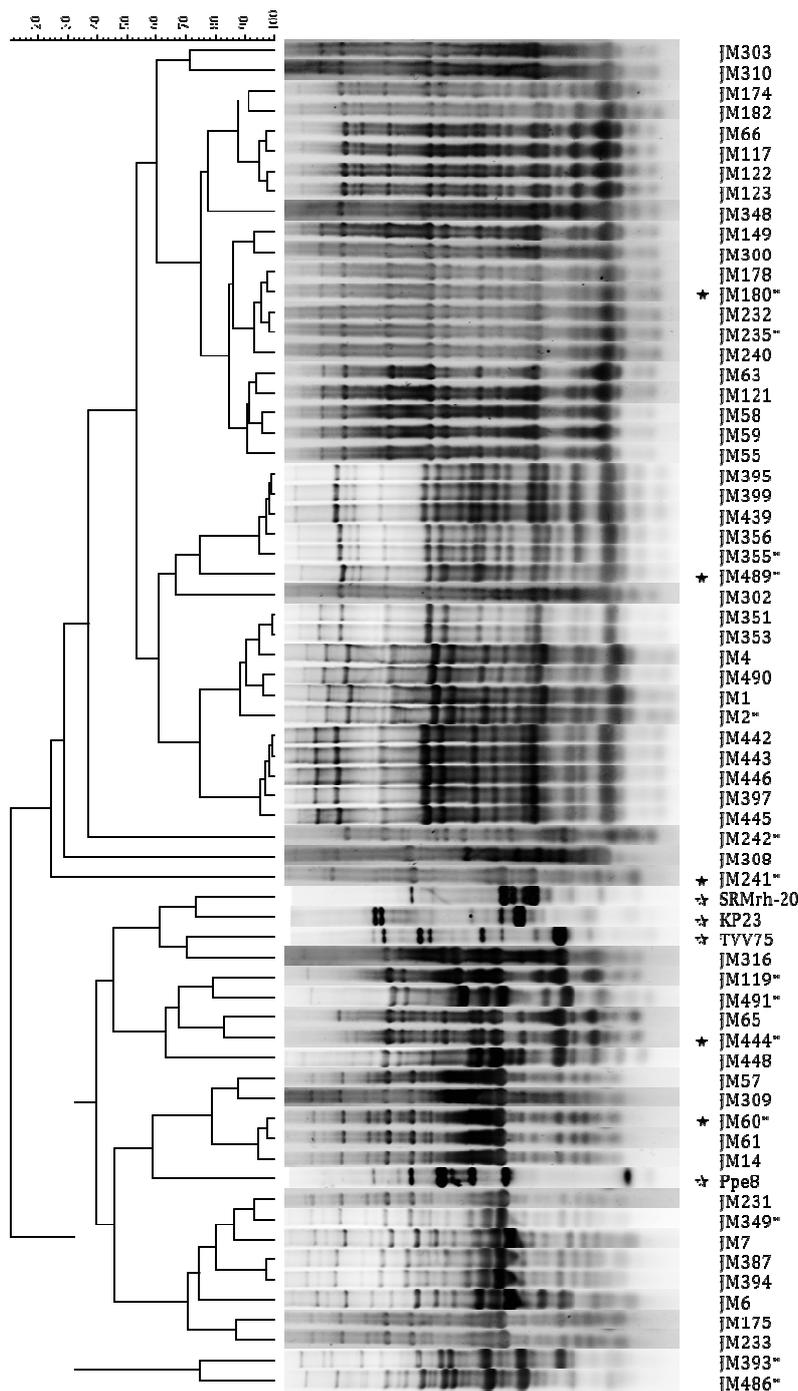


Figura 5 Dendrograma obtido pela análise de grupamento dos perfis de BOX-PCR para isolados obtidos do meio JMV. As similaridades foram calculadas usando coeficiente de Jaccard e os grupamentos usando UPGMA. Isolados indicados com o símbolo “*” foram usados para sequenciamento parcial do gene 16S rRNA enquanto aqueles identificados com “☆” foram usados para sequenciamento total do gene 16S rRNA. Estirpes de *Burkholderia silvatlantica* (SRMrh-20), *B. kururiensis* (KP23), *B. vietnamiensis* (TVV75) e *B. tropica* (Ppe8) foram incluídas na análise (☆☆).

Tabela 2 Análise de similaridade de isolados representativos baseado no sequenciamento parcial do gene 16S rDNA.

Isolado	Genótipo	Tecido	16S rDNA (maior sim. %)	nº de acesso	% sim
JN125	Cameroon	C. médio	<i>Azospirillum brasilense</i>	GU256444.1	97
JN135	Cameroon	C. médio	<i>Azospirillum brasilense</i>	GU256444.1	96
JN15	Cameroon	Folha	<i>Azospirillum brasilense</i>	FR667913.1	93
JN246	Cameroon	Raiz	<i>Azospirillum brasilense</i>	GU256444.1	97
JN184	Cameroon	C. basal	<i>Azospirillum brasilense</i>	GU256444.1	96
JN318	CNPGL	Folha	<i>Azospirillum brasilense</i>	GU256444.1	97
JN360	CNPGL	C. apical	<i>Azospirillum brasilense</i>	GU256444.1	97
JN450	CNPGL	C. basal	<i>Azospirillum brasilense</i>	GU256444.1	95
JN454	CNPGL	C. basal	<i>Azospirillum brasilense</i>	FR745918.1	93
JN73	Cameroon	C. apical	<i>Azospirillum brasilense</i>	GU256444.1	95
JN127	Cameroon	C. médio	<i>Azospirillum</i> sp DA10-2	AY118225.1	96
JN189	Cameroon	C. basal	<i>Azospirillum</i> sp ptl3	GQ284588.2	94
JN245	Cameroon	Raiz	<i>Azospirillum</i> sp DA10-2	AY118225.1	97
JN500	CNPGL	Raiz	<i>Azospirillum</i> sp DA10-2	AY118225.1	93
JN128	Cameroon	C. médio	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ264094.1	98
LG166	Cameroon	C. médio	<i>Azospirillum brasilense</i>	GU256444.1	97
LG208	Cameroon	C. basal	<i>Enterobacter cloacae</i>	FJ532062.1	95
LG222	Cameroon	C. basal	<i>Enterobacter cloacae</i>	FJ532062.1	97
LG210	Cameroon	C. basal	<i>Enterobacter oryzae</i>	EF488760.1	87
LG214	Cameroon	C. basal	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	AB626659.1	95
LG218	Cameroon	C. basal	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	GU372344.1	95
LG469	CNPGL	C. basal	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	GU372344.1	97
LG49	Cameroon	Folha	<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	AF127412.1	98
LG387	CNPGL	C. apical	<i>Klebsiella oxytoca</i>	GU459204.1	90
LP161	Cameroon	C. médio	<i>Enterobacter cloacae</i>	FJ532062.1	99
LP518	CNPGL	Raiz	<i>Enterobacter cloacae</i>	FJ532062.1	99
LP432	CNPGL	C. médio	<i>Enterobacter oryzae</i>	EF488760.1	99
LP343	CNPGL	Folha	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	AM889285.1	96
LP431	CNPGL	C. médio	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	AB626659.1	96
LP386	CNPGL	C. apical	<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	AF127412.1	92
LP433	CNPGL	C. médio	<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	AF127412.1	94
LP479	CNPGL	C. basal	<i>Gluconacetobacter</i> sp	AF127400.1	93
LP45	Cameroon	Folha	<i>Gluconacetobacter</i> sp	AF127400.1	95
JM241	Cameroon	Raiz	<i>Burkholderia silvatlantica</i>	AY965242.1	94
JM242	Cameroon	Raiz	<i>Burkholderia</i> sp	JF772523.1	86
JM235	Cameroon	Raiz	<i>Enterobacter cloacae</i>	FJ532062.1	96
JM180	Cameroon	C. basal	<i>Enterobacter oryzae</i>	EF488760.1	99
JM2	Cameroon	Folha	<i>Enterobacter oryzae</i>	EF488760.1	99
JM489	CNPGL	Raiz	<i>Enterobacter oryzae</i>	HQ706110.1	99
JM119	Cameroon	C. médio	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	AB626659.1	92
JM393	CNPGL	C. médio	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	AB626659.1	98
JM444	CNPGL	C. basal	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	AB117967.1	93
JM486	CNPGL	Raiz	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	AB626659.1	96
JM491	CNPGL	Raiz	<i>Gluconacetobacter liquefaciens</i>	GU372344.1	94
JM349	CNPGL	C. apical	<i>Gluconacetobacter sacchari</i>	AF127412.1	94
JM60	Cameroon	C. apical	<i>Gluconacetobacter</i> sp	EF493039.1	91
JM355	CNPGL	C. apical	<i>Klebsiella oxytoca</i>	EU931550.1	97

As abreviações representam: sim.: similaridade; JN: meio JNFb; LG:meio LGI; LP: meio LGI-P; JM: meio JMV; C.: colmo

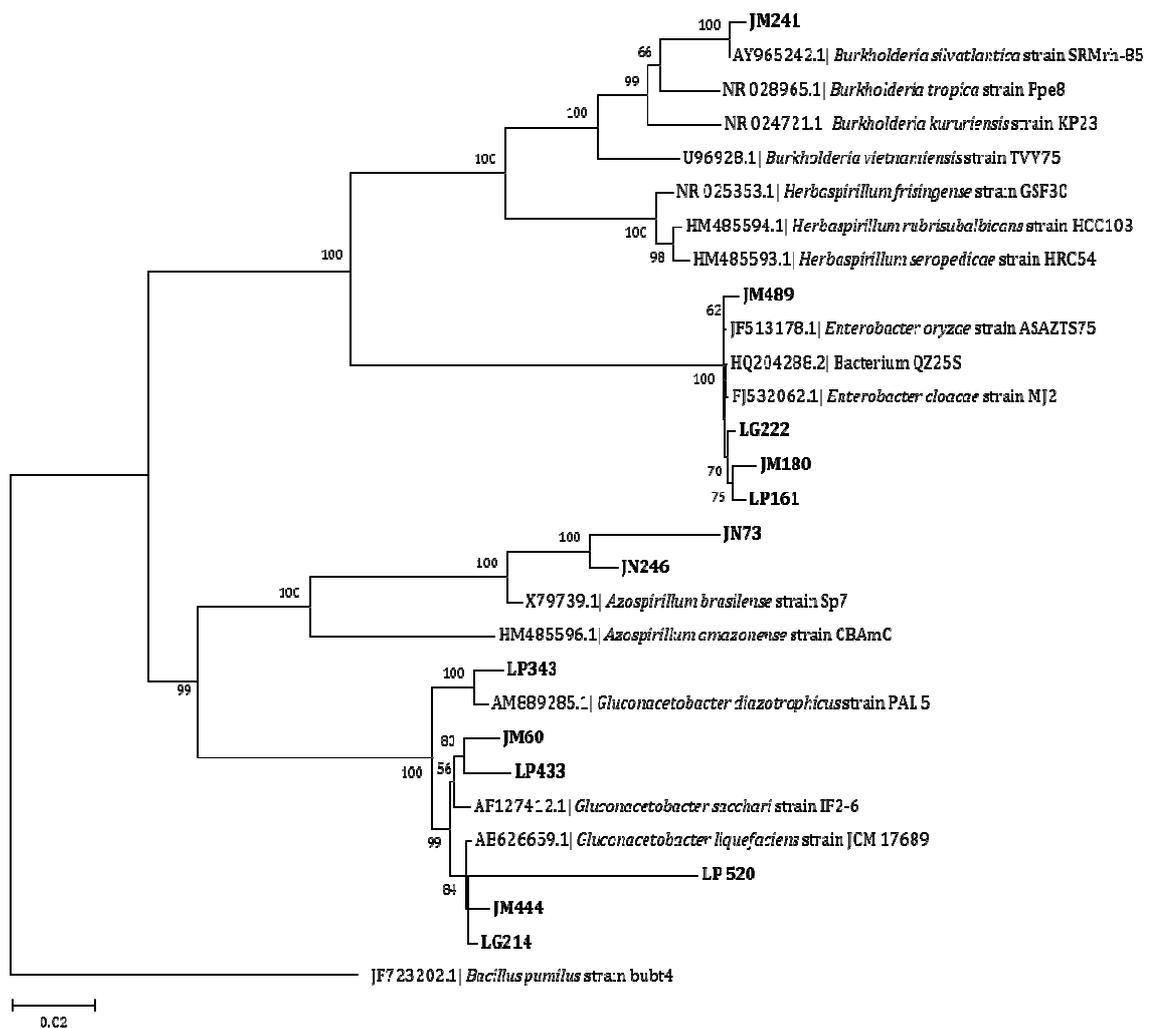


Figura 6 Árvore filogenética baseada em sequências do gene 16S rRNA (~ 1.450 bp), incluindo isolados representativos e estirpes de bactérias diazotróficas depositadas no banco de dados NCBI. Sequências de isolados representativos estão identificadas em negrito. A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e a árvore consenso gerada pelo programa MEGA5. Números localizados nos ramos da árvore indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (*bootstrap*). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene 16S rRNA de *Bacillus pumilus* foi utilizada como grupo externo.

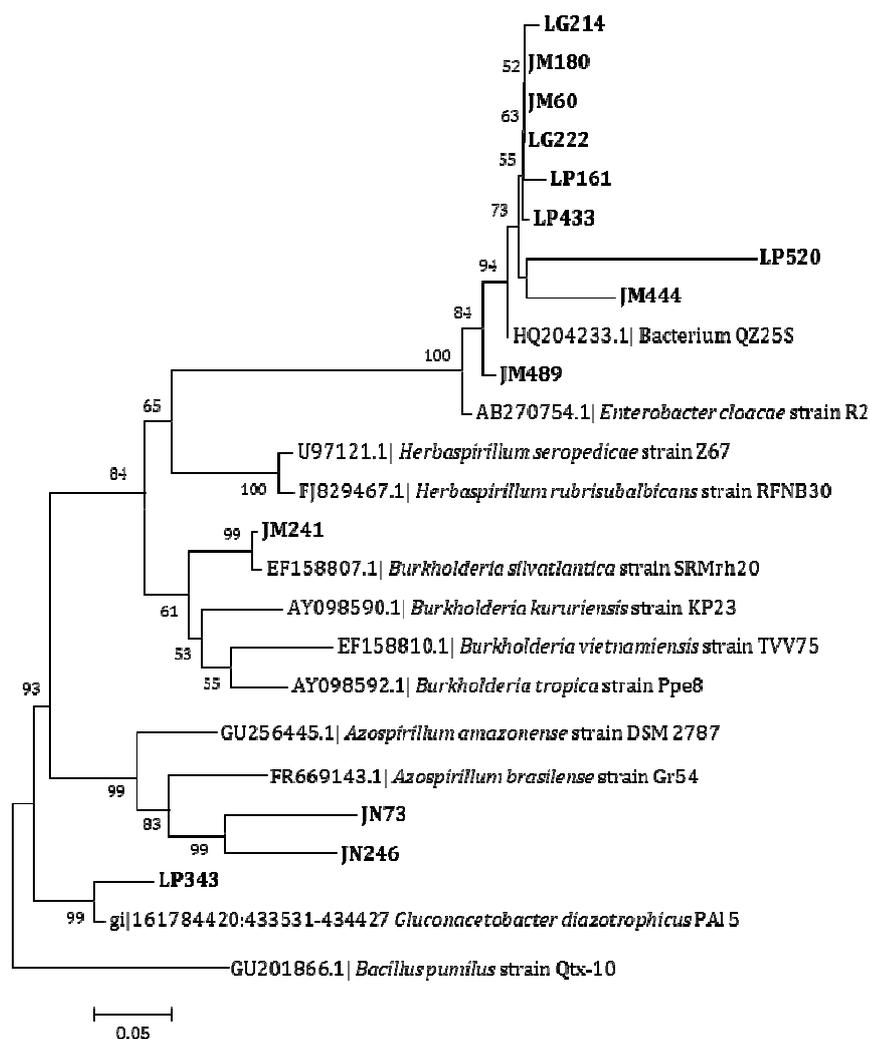


Figura 7 Árvore filogenética baseada em sequências do gene *nifH* (~ 350 bp), incluindo isolados representativos e estirpes de bactérias diazotróficas depositadas no banco de dados NCBI. Sequências de isolados representativos estão identificadas em negrito. A filogenia foi baseada no agrupamento das sequências de acordo com o algoritmo Neighbor-joining e a árvore consenso gerada pelo programa MEGA5. Números localizados nos ramos da árvore indicam a porcentagem de 1.000 subamostragens (*bootstrap*). A escala representa o número de mutações por posição dos nucleotídeos. A sequência do gene *nifH* de *Bacillus pumilus* foi utilizada como grupo externo.

3.3 Caracterização Fenotípica

Análises comparativas de morfologia de colônia revelaram características distintas entre isolados obtidos dos meios de cultivo JNFb e NFb e estirpes-tipo do gênero *Herbaspirillum* e *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*, comumente cultivadas nestes meios (Figura 8). A maioria dos isolados apresentou colônias do tipo circular com ~2 mm de diâmetro, coloração levemente rosada, com aspecto rugoso, principal característica que diferiu da morfologia das colônias de espécies de *Herbaspirillum* e *Azospirillum* descritas por Baldani et al. (2005b). Todos os isolados provenientes do meio LGI, usado para isolamento

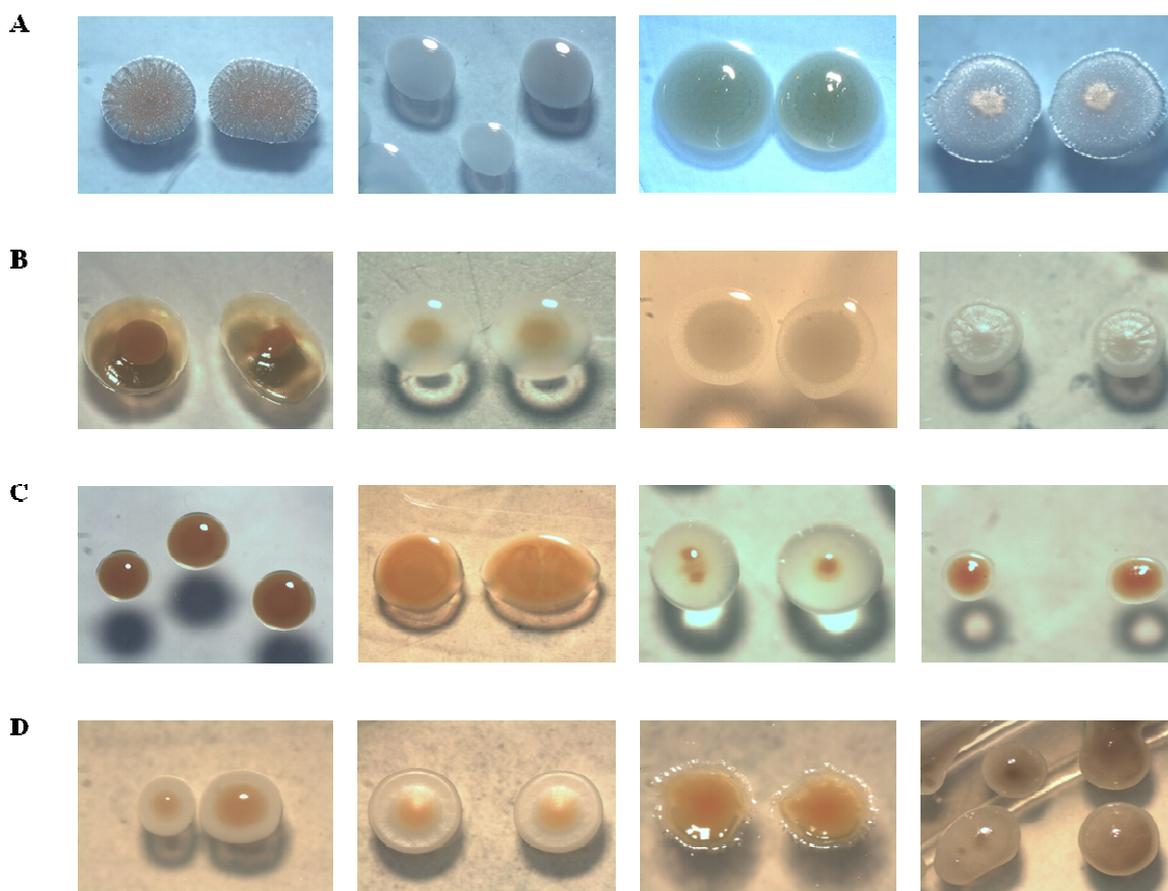


Figura 8 Colônias dos principais grupos fenotípicos de bactérias diazotróficas obtidas de plantas de Capim-elefante. A figura representam isolados representativos cultivados em meio sólido NFb 3X (A), LGI (B), LGI-P (C) e JMV (D). Fotos: Itamar G. Ignácio

de *Azospirillum amazonense*, apresentaram características morfológicas distintas da estirpe CBAmC, utilizada para comparação. Embora a grande maioria dos isolados provenientes do meio de cultivo LGI-P tenham apresentado características de colônia distintas da espécie cultivada neste meio (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) foi possível identificar dois isolados (LP343 e LP490) com colônias pequenas de coloração laranja, semelhantes a estirpe PAL5 de *G. diazotrophicus*. Em meio JMV sólido, somente os isolados JM241 e JM242 revelaram características fenotípicas similares a estirpe SRMrh-20 de *Burkholderia silvatlantica*. A Figura 8 (A-D) mostra detalhes das colônias de isolados representativos cultivados em meio sólido NFb 3X, LGI, LGI-P e JMV, respectivamente.

3.4 Caracterização Funcional

A habilidade dos isolados para fixar nitrogênio, mensurada pela técnica de atividade de redução de acetileno (ARA), mostrou variações significativas nas taxas de atividade da nitrogenase entre os isolados, e que esta característica foi influenciada pelo tipo de meio semi-sólido livre de N usado nas análises (Tabela 3). É importante mencionar que a habilidade de fixação de nitrogênio foi mensurada no mesmo meio usado para o isolamento das bactérias.

Tabela 3 Propriedades benéficas das bactérias diazotróficas isoladas de folha, colmo e raiz de capim-elefante

Isolado	Nase ¹	Comp. Indol ²	Solub PO ₄ ⁻	Isolado	Nase	Comp. Indol	Solub PO ₄ ⁻
JN314	+++	+	-	JN21	+++	+	-
JN315	+++	+	-	JN22	nd	++	-
JN316	+++	+	-	JN23	+++	+	-
JN317	++	+	-	JN245	+++	+	-
JN318	+++	+	-	JN246	+	++	-
JN353	+	+	-	JN247	+++	++	-
JN357	++	+	-	JN249	+++	+	-
JN358	+++	++	-	JN254	+++	++	-
JN360	+++	+++	-	JN313	+++	+	-
JN361	++	+	-	JN70	+	+	-
JN365	+++	+	-	JN72	+++	+	-
JN375	+	+	-	JN73	+++	+	-
JN384	+	+	-	JN76	+++	+	-
JN402	++	+	-	NF326	+	+	-
JN404	+++	+	-	NF374	+++	+	-
JN405	+++	+	-	NF503	++	+++	-
JN406	+++	+	-	NF504	++	+++	-
JN407	++	+	-	NF506	+++	nd	-
JN410	+++	+++	-	NF79	+++	++	-
JN450	++	+++	-	LP342	+	+++	-
JN451	+++	+	-	LP343	+++	++	+
JN452	+++	+	-	LP344	++	+	-
JN453	+++	+	-	LP345	+	+++	+
JN454	++	+	-	LP346	nd	+++	-
JN455	++	+++	-	LP384	nd	+++	-
JN494	+	+	-	LP386	+	+++	+
JN496	+++	+	-	LP389	nd	nd	-
JN499	++	+	-	LP391	+	++	-
JN500	+++	+	-	LP392	nd	+++	+
JN123	nd ³	++	-	LP429	nd	+++	+
JN125	+++	+	-	LP431	+	+++	+
JN126	+++	+	-	LP432	+++	+++	-
JN127	+++	+	-	LP433	nd	+++	+
JN128	nd	+	-	LP436	nd	nd	+
JN129	+	+	-	LP474	nd	nd	+
JN13	+++	++	-	LP475	+	+	-
JN130	+	+	-	LP476	nd	+	-
JN131	+++	nd	-	LP478	+	+	+
JN134	++	+	-	LP479	++	+	+
JN135	++	+	-	LP480	nd	+	-
JN15	++	++	-	LP481	+	++	-
JN17	+++	+	-	LP482	+	+	+
JN18	+	+	-	LP490	+	+++	-
JN184	+++	+++	-	LP518	++	+	+
JN185	++	+	-	LP520	nd	+	+
JN186	++	+	-	LP521	nd	+	-
JN188	++	+	-	LP522	+	+	-
JN189	+++	+	-	LP523	nd	+	-
JN19	++	+	-	LP524	+	+++	-
JN191	+++	+	-	LP526	+	+++	-
JN192	+++	+	-	LP111	++	+++	-
JN194	nd	+	-	LP161	++	+++	-
JN20	+	+++	-	LP163	nd	+	-

Tabela 3. Continuação

Isolado	Nase	Comp. Indol	Solub PO ₄ ⁻	Isolado	Nase	Comp. Indol	Solub PO ₄ ⁻
LP281	+	++	+	JM231	nd	+	-
LP285	++	+++	+	JM232	+	+++	-
LP290	nd	++	-	JM241	nd	++	-
LP44	++	+++	-	JM242	+	++	-
LP45	++	++	-	JM248	nd	++	-
LP47	+	+++	-	JM4	+	+++	+
LP43	++	+++	-	JM444	+	++	-
JM300	+	+	-	JM55	+	++	-
JM302	+	++	-	JM57	+	+	-
JM303	nd	++	-	JM58	++	++	+
JM308	nd	++	-	JM59	+	+++	+
JM309	nd	++	-	JM6	+	+++	-
JM310	+	++	+	JM60	+	++	+
JM316	+	-	-	JM61	nd	++	-
JM348	nd	+++	-	JM63	+	++	-
JM349	nd	+	+	JM65	+	+	-
JM351	+	+	+	JM66	nd	+	-
JM353	+	+++	-	JM7	nd	+	-
JM355	+	+++	-	LG343	+	++	+
JM356	+	+++	-	LG378	++	+	-
JM387	++	+	-	LG382	+	+	+
JM393	+	+	-	LG387	nd	++	+
JM394	+	+	-	LG469	nd	++	+
JM395	nd	+++	-	LG516	++	+	-
JM397	++	+	-	LG102	++	++	-
JM399	+	+	-	LG106	+	+	-
JM439	nd	+	-	LG151	+	+	-
JM442	+	+	-	LG157	nd	+	-
JM443	nd	++	-	LG166	nd	+	-
JM445	+	++	-	LG207	++	+	+
JM446	nd	++	-	LG208	+	++	+
JM448	nd	++	-	LG210	++	+++	+
JM486	+	++	+	LG211	++	+	-
JM489	+	++	+	LG212	+	+	-
JM490	nd	+++	+	LG213	++	++	-
JM491	nd	++	-	LG214	+	++	+
JM1	nd	+	-	LG216	nd	+	-
JM117	++	+	-	LG218	nd	+++	+
JM119	nd	+	+	LG222	++	+	+
JM121	nd	++	-	LG270	nd	+	-
JM122	nd	+++	-	LG277	nd	++	-
JM123	+	+	-	LG278	nd	+	-
JM14	nd	++	-	LG279	+	+	+
JM149	+	++	-	LG49	+	++	+
JM174	nd	+	-	LG91	++	++	+
JM175	nd	++	-				
JM178	+	++	+				
JM180	++	++	+				
JM182	+	+	+				
JM240	nd	+	-				
JM2	+	+	+				

1 Atividade da nitrogenase: + <100 nmol etileno h⁻¹ mg proteína⁻¹; ++ ≥100; +++ ≥ 300; 2 Produção de compostos indólicos: + 0,1 – 3 µg comp. indólicos mg proteína⁻¹; ++ 3 – 10; +++ ≥ 10; 3 nd não detectado

Os isolados obtidos do meio JNFb, identificados como *Azospirillum*, mostraram maiores taxas de atividade da nitrogenase quando comparados com os demais isolados. Na média, a atividade, expressa em nmol etileno h⁻¹ mg proteína⁻¹, variou de 10,2 a 1.254 quando testada em meio JNFb, 6 a 98,8 em meio LGI, 0,8 a 318 em meio LGI-P e 1,4 a 267 para o meio JMV. Todas as estirpes-tipo testadas mostraram valores de ARA acima de 100 nmol etileno h⁻¹ mg proteína⁻¹ (Tabela 3).

A avaliação dos isolados quanto à habilidade de produzir fitoreguladores indicou que 97% do total de isolados foram capazes de produzir compostos indólicos (Tabela 3), mas sua habilidade intrínseca de produzir essas substâncias na presença de triptofano variou grandemente entre os isolados. A produção, expressa em µg de compostos indólicos mg de proteína⁻¹, variou de 0,3 a 19,02; e valores médios de 1,4 foram detectados para os isolados provenientes do meio JNFb, 2,63 do meio LGI, 6,66 de LGI-P e 2,56 para os isolados de JMV.

Por outro lado, a solubilização de fosfato de cálcio não foi um fenômeno generalizado entre as bactérias diazotróficas; somente 45 isolados (22%) produziram um halo translúcido ao redor das colônias cultivadas em meio sólido NBRIP, indicando a solubilização de fosfato *in vitro* (Tabela 3). Os índices de solubilização variaram entre 0,6 a 3,2 após doze dias de incubação. A característica de solubilização de fosfato foi mais freqüente entre os isolados provenientes do meio LGI-P (38%), seguido de JMV (33%) e LGI (29%); e não foi observada entre os isolados obtidos nos meios JNFb e NFb. Resultados similares foram observados para estirpes dos gêneros *Herbaspirillum* (HCC103, HRC54 e GSF30) e Sp7 de *Azospirillum brasilense*, que também são cultivadas nos JNFb e NFb, bem como para *A. amazonense* (CBAmC). Nas condições testadas, resultados positivos de solubilização de fosfato foram detectados para as estirpes de *A. lipoferum* (Sp59), *Azotobacter chroococcum* (AC1), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (PAL5), *Burkholderia vietnamiensis* (TVV75), *B. silvatlantica* (SRMrh-20), *B. kururiensis* (KP23) e *B. tropica* (Ppe8).

4 DISCUSSÃO

4.1 Bactérias Diazotróficas Cultiváveis e Sua Diversidade Genética

Neste estudo, análises dependentes de cultivo foram usadas para contar e isolar uma fração da comunidade de bactérias diazotróficas presente em raiz, colmo e folha de *Pennisetum purpureum* crescido em condições de campo. O método NMP de contagem de bactérias usando meio semi-sólido livre de nitrogênio (DÖBEREINER et al., 1995) tem sido aplicado com sucesso para quantificar a população de diazotróficas cultiváveis presente nos tecidos de muitas espécies de plantas, mas mais particularmente para gramíneas de importância econômica (BALDANI e BALDANI, 2005). Além disso, a película formada nestes meios semi-sólidos permitem o isolamento direto de uma fração predominante de bactérias diazotróficas cultivadas nos mesmos. Os resultados mostraram que a população de diazotróficas associadas a dois genótipos de capim-elefante – CNPGL91F06-3 e Cameroon – variou de 10^2 a 10^6 bactérias por grama de tecido fresco, sendo de maneira geral, menor na parte aérea quando comparada com àquela detectada na raiz.

Através da utilização de meios de cultivo semi-sólidos para quantificar a população de bactérias diazotróficas, resultados similares foram observados por Silva et al. (1995), Kirchof et al. (1997a) e Reis et al. (2001) analisando colmos e raízes de 14 genótipos de Capim-elefante plantados no Brasil. Assim como os resultados descritos neste trabalho, estes autores detectaram menor população na parte aérea quando comparada com a raiz. Estudos anteriores também mostraram esse efeito em outras poáceas como milho (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*) e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) (ROESCH et al., 2006; ISLAM et al. 2009; PARIONA-LLANOS et al., 2010). Vale ressaltar que, neste estudo, as folhas foram desinfestadas superficialmente e os colmos descascados, eliminando portanto grande parte das bactérias presente na superfície destes tecidos. Convencionalmente, as amostras de raiz não foram submetidas à desinfestação superficial, e como estas em contato mais próximo com o solo e sua microflora constituem a principal porta de entrada para colonização bacteriana nas plantas (PARIONA-LLANOS et al., 2010), um maior número de bactéria era esperado nesta parte da planta.

A análise de BOX-PCR foi aplicada com o objetivo de agrupar geneticamente os 204 isolados de bactérias diazotróficas obtidos dos genótipos de capim-elefante. Esta técnica tem sido usada por muitos autores para avaliar a diversidade genética de estirpes bacterianas e comunidades associadas com plantas (HUREK et al., 1997; ALBINO et al., 2006; COUILLEROT et al., 2010). Além disso, esta metodologia tem sido sugerida com uma boa estratégia para discriminar entre estirpes/isolados dentro de espécies (LERNER et al., 2010; NAYAK et al., 2011). As análises de BOX-PCR dos 204 isolados revelou que o meio de cultivo influenciou a população de bactérias fixadoras de nitrogênio com maior diversidade genética observada no meio JMV seguido de LGI-P. A análise dos dendrogramas, gerados a partir dos perfis de BOX-PCR, mostraram que a maioria dos isolados não apresentou homologia com as estirpes-tipo de bactérias diazotróficas comumente encontradas em associação com estas plantas, indicando portanto a possível ocorrência de diversidade intra-específica. Os grupos formados nas análises de BOX-PCR não indicaram efeito dos tecidos da planta ou dos genótipos testados na diversidade de isolados bacterianos. Os isolados de ambos genótipos (CNPGL91F06-3 e Cameroon) e tecidos foram distribuídos randomicamente nos dendrogramas.

Esta técnica indicou que a maioria dos isolados de JNFb e NFb apresentaram perfis muito similares entre si, mas distintos das estirpes de *Herbaspirillum* e *Azospirillum* usadas para fim de comparação. Entretanto, as análises baseadas em sequências dos genes 16S e *nifH*

confirmaram a presença da espécie *A. brasilense*. Como a técnica de BOX-PCR tem o poder de discriminar taxonomicamente estirpes dentro de uma espécie, é possível inferir que os isolados obtidos de JNFb e NFB pertencem a espécie *A. brasilense*, mas representam estirpes diferentes de Sp7. A ocorrência do gênero *Azospirillum* colonizando plantas de capim-elefante já havia sido reportada anteriormente (REIS et al, 2001; ECKERT et al., 2001). De fato, espécies de *Azospirillum* têm sido constantemente isoladas da superfície e interior de raízes e parte aérea de trigo, cana-de-açúcar, arroz e forrageiras como *Miscanthus* e *P. purpureum* (HARTMANN e BASHAN, 2009; BASHAN e BASHAN, 2010). Surpreendentemente, as análises não detectaram a presença de bactérias pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* entre os isolados provenientes do meio JNFb. Bactérias deste gênero já haviam sido isoladas de plantas de capim-elefante cultivadas no Brasil e de *Miscanthus*, cultivada na Alemanha (REIS et al., 2001; KIRCHHOF et al., 1997a) o que culminou na descrição das espécies *H. frisingense* e *A. doebereineriae* (KIRCHHOF et al., 2001b; ECKERT et al., 2001). Como o gênero *Herbaspirillum* está predominantemente no interior das plantas é possível que a população de *Azospirillum* sp. tenha tido uma vantagem competitiva, estando presente tanto endofiticamente como no rizoplano. Este fenômeno já havia sido observado previamente por outros autores, mas em outras plantas (BALDANI et al., 2005a). Embora o meio JNFb seja propício ao isolamento e cultivo do gênero *Herbaspirillum*, a falta de especificidade deste meio foi considerada anteriormente por Baldani et al. (1999); este meio permite o crescimento de outras bactérias diazotróficas, principalmente aquelas capazes de tolerar a maior acidez inicial deste meio e utilizar malato como fonte de carbono, como bactérias do gênero *Azospirillum* (BALDANI et al., 2005a). Outra espécie comumente encontrada em poáceas, especialmente em forrageiras – *A. amazonense* – também não foi identificada colonizando os tecidos de capim-elefante neste estudo. Silva et al. (1995) e Reis et al. (2001) também obtiveram populações elevadas utilizando o meio de cultivo LGI, no entanto, os resultados de isolamento e identificação taxonômica dos isolados originados deste meio não foram reportados por estes autores.

Embora a ocorrência da espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* colonizando diferentes tecidos de *P. purpureum* tenha sido observada anteriormente (KIRCHHOF et al., 1997), as espécies *G. liquefaciens* e *G. sacchari*, previamente descritas como não fixadoras de nitrogênio (YAMADA et al., 1997), neste estudo foram identificadas pela primeira vez como bactérias diazotróficas. *G. diazotrophicus* é uma bactéria fixadora de nitrogênio conhecida por contribuir com altas taxas de N derivado da FBN e promover o crescimento de plantas pela produção de fitoreguladores vegetais (RODRIGUES, 2008). Esta espécie tem sido identificada em plantas que possuem propagação vegetativa como cana-de-açúcar, batata-doce, abacaxi e capim-elefante (BALDANI e BALDANI 2005), bem como naquelas originadas de sementes como milho e arroz selvagem (LOGANATHAN et al., 1999; MUTHUKUMARASAMY et al., 2005). *G. liquefaciens* foi recentemente encontrada como uma das bactérias diazotróficas colonizando a rizosfera de plantas de arroz cultivadas em solos alagados na Índia (ROY et al., 2010), mas estirpes de *G. sacchari* com atividade da nitrogenase e gene *nifH* estão sendo pela primeira vez reportadas como fixadoras de nitrogênio. Interessantemente, *G. sacchari* é uma espécie muito próxima, geneticamente, de *G. diazotrophicus* (FRANKE-WHITTLE et al., 1999), e tem sido detectada colonizando endofiticamente plantas de cana-de-açúcar (FRANKE-WHITTLE et al., 2005). No entanto, nas análises filogenéticas baseadas em sequências do gene *nifH* os isolados representativos identificados como *G. liquefaciens* e *G. sacchari* foram agrupados com sequências de *nifH* de *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Bacterium QZ25S*. Este resultado indica que o gene *nifH* não deve ser considerado o único marcador filogenético usado na identificação filogenética de bactérias diazotróficas, visto que existe a possibilidade de transferência horizontal de genes (THG) (RAYMOND et al., 2004; FISHER et al., 2011). Contudo, maiores informações baseadas no

gene *nifH* e outras sequências de genes constitutivos de *G. liquefaciens* e *G. sacchari* serão necessárias para confirmar esta hipótese.

A detecção de espécies de *Burkholderia* colonizando *P. purpureum* não havia sido reportada anteriormente, embora este gênero seja encontrado em associação com outras poáceas como cana-de-açúcar, milho e arroz (REIS et al., 2004; PERIN et al., 2006). Análises filogenéticas baseadas no gene 16S rDNA e sequências do gene *nifH* agruparam o isolado JM241 com à espécie *B. silvatlantica*, sugerindo a ocorrência desta espécie em genótipos de Capim-elefante. Resultados similares foram observados para o gênero bacteriano *Enterobacter* neste estudo. O sequenciamento dos genes 16S rDNA e *nifH* de estirpes pertencentes a este gênero confirmaram a presença de *E. cloacae* e *E. oryzae* (sugerido pelo sequenciamento parcial do gene 16S rDNA). Entretanto, as análises dos fragmentos do gene *nifH* mostraram que alguns destes isolados apresentaram alta similaridade com sequências de *nifH* de Bacterium QZ25S, a qual foi originalmente isolada de tecidos de cana-de-açúcar (FRANKE-WHITTLE et al., 2005). A ocorrência de *Enterobacter* como diazotrófico endofítico em Capim-elefante não havia sido reportada anteriormente, entretanto espécies diazotróficas como *E. oryzae* e *E. cloacae* tem sido identificadas em plantas de arroz e cana-de-açúcar (PENG et al., 2009; HARDOIM et al., 2011; MAGNANI et al., 2010). Recentemente, Hardoim et al., (2011) propuseram a descrição de duas novas espécies - *E. aryziphilus* e *E. oryzendophyticus* – isoladas de endosfera de arroz cultivado nas Filipinas. A função destas espécies em capim-elefante ainda é desconhecida, entretanto tem sido mostrado que as mesmas têm habilidade de produzir sideróforos, hormônios de crescimento vegetal e compostos antimicrobianos (TAGHAVI et al., 2009), assim como solubilizar fosfato inorgânico (AHEMAD et al., 2008; PARK et al., 2011).

4.2 Características de Promoção de Crescimento de Plantas

De acordo com Döbereiner (1988), as bactérias podem ser consideradas fixadoras de nitrogênio quando (i) são capazes de crescer em meio semi-sólido com quase (ou preferencialmente, completamente) livres de nitrogênio depois de repetidas transferências nestes meios de cultivo e (ii) apresentarem atividade da nitrogenase de pelo menos 50 nmol etileno h⁻¹ por cultura. Do total de 204 isolados, 20,6% mostraram alta atividade da nitrogenase (≥ 300 nmol etileno h⁻¹ mg proteína⁻¹), 20,6% atividade média (entre 100 - 299 nmol etileno h⁻¹ mg proteína⁻¹) e 32,4% exibiram baixa atividade da nitrogenase (< 99 nmol etileno h⁻¹ mg proteína⁻¹). Nas condições testadas, cerca de 26,5% dos isolados não formaram película característica de bactérias diazotróficas e a atividade da nitrogenase sob condições microrraerofílicas não foi detectada, embora o gene *nifH* tenha sido amplificado por reação de PCR e sequenciamento com iniciadores específicos para o gene. Islam et al. (2009) mostraram que em determinadas condições não existe correlação direta entre a presença do gene *nifH* e a atividade de redução de acetileno em algumas estirpes bacterianas. Esta técnica determina indiretamente a quantidade de N que o organismo estaria fixando, entretanto, muitos fatores interferem nos resultados desta análise incluindo condições de cultivo, fonte de carbono inapropriada, luminosidade, quantidade de oxigênio, concentração de acetileno, difusão de gás nos períodos de incubação, limite de detecção do cromatógrafo utilizado, entre outros (FAY, 1992; ZUCKERMANN et al., 1997; STAAL et al., 2001), bem como o estado fisiológico dos organismos fixadores de nitrogênio.

Outra característica importante na promoção de crescimento de plantas investigada entre os 204 isolados foi a habilidade de sintetizar compostos indólicos. A maioria dos isolados (97%) deste estudo, bem como as estirpes-tipo de bactérias diazotróficas testadas, produziram entre 0,31 e 19,02 µg de compostos indólicos mg de proteína⁻¹. A literatura tem reportado que organismos diazotróficos produzem entre 0,1 a 30 µg de compostos indólicos mg de proteína⁻¹ na presença de 100 µg mL⁻¹ L-triptofano (RODRIGUES, 2008; TAGHAVI

et al., 2009). Embora Bashan e Bashan (2010) tenham reportado elevada capacidade de *A. brasilense* em produzir AIA (93- 379 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por cultura), os menores valores de compostos indólicos produzidos foram detectados em bactérias isoladas do meio JNFb, identificadas como *A. brasilense*. Bactérias isoladas de LGI, LGI-P e JMV - identificadas como *Gluconacetobacter* e *Enterobacter* - apresentaram elevada produção de compostos indólicos. A produção destes compostos, principalmente AIA, na presença do precursor triptofano tem sido relatada para muitas BPCV incluindo os gêneros *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Burkholderia* e *Gluconacetobacter* (DASTAGER et al., 2010). Entretanto, assim como para ARA, tem sido demonstrado que a quantidade de compostos indólicos produzidos *in vitro* por estes microrganismos depende da espécie e/ou estirpe bacteriana e, principalmente, das condições de cultivo como a presença de precursores das vias de biossíntese (triptofano), oxigenação, pH e fase de crescimento que as bactérias se encontram no momento da avaliação (CROZIER et al. 2000; RADWAN et al., 2002). Bashan e Holguin (2004) relataram que os fitoreguladores, principalmente o ácido indol-acético (AIA), excretado por bactérias que se associam com plantas, desempenham papel essencial na promoção do crescimento vegetal. Aparentemente, a produção de compostos indólicos não funciona como um hormônio para células bacterianas, mas pode ter evoluído devido a sua importância na relação bactéria-planta (PATTEN e GLICK, 2002). Recentemente tem sido comprovado que a biossíntese de compostos indólicos, entre outros reguladores de crescimento, por bactérias diazotróficas pode explicar o aumento no desenvolvimento radicular das plantas e consequentemente melhorar a absorção de nutrientes e água pelas raízes (DOBBELAERE e OKON, 2007; SPAEPEN et al., 2009).

A habilidade dos isolados de capim-elefante em solubilizar fosfato de cálcio *in vitro* também foi analisada, e bactérias identificadas como pertencentes aos gêneros *Gluconacetobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* apresentaram esta capacidade. A habilidade destes gêneros para promover a solubilização de fosfato *in vitro* tem sido demonstrada por muitos autores (AHEMAD et al., 2008; SASHIDHAR e PODILE, 2010; PARK et al., 2011). Embora o gênero *Burkholderia* seja conhecido por sua capacidade em solubilizar fosfatos, e todas as estirpes-tipo testadas neste estudo tenham apresentado resultado positivo, o isolado identificado como *B. silvatlantica* (JM241) não formou halo de solubilização de fosfato nas placas contendo meio NBRIP. Perin et al. (2006) testando diferentes estirpes de *B. silvatlantica* quanto a capacidade de solubilizar fosfato em meio sólido GL verificou que algumas estirpes não formaram em torno de si um halo facilmente visível de solubilização de fosfato *in vitro*. Os isolados provenientes dos meios JNFb e NFB não formaram halo de solubilização de fosfato nas placas contendo meio NBRIP. Para o gênero *Azospirillum*, a solubilização de fosfato *in vitro* tem sido documentada somente para as algumas estirpes de *A. halopraeferans*, *A. brasilense* (Cd) e *A. lipoferum* (JA4) (SESHADRI et al., 2000; DEUBEL et al., 2000; RODRIGUEZ et al., 2006). O fósforo (P), depois do nitrogênio, é um dos nutrientes mais limitantes ao desenvolvimento de raízes e consequentemente do crescimento vegetal, particularmente em solos tropicais. Contudo, a eficiência de absorver e usar o P proveniente dos fertilizantes fosfatados aplicados ao solo é baixa, principalmente pela formação de complexos insolúveis (VASSILEV e VASSILEVA, 2003). Desta forma, a procura por bactérias solubilizadoras de fosfato que podem aumentar a eficiência agrônômica dos fertilizantes contendo P orgânico e/ou solubilizar P inorgânico sem afetar a produtividade das culturas é uma estratégia alternativa que tem sido proposta por microbiologistas agrícolas (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999; KHAN et al., 2009). Além disso, é interessante ressaltar que as bactérias diazotróficas com capacidade de solubilizar fosfato ganham importância durante o processo de colonização, pois podem inicialmente colonizar superficialmente o hospedeiro e, consequentemente, provê-lo deste mineral essencial para o desenvolvimento vegetal.

O conhecimento da diversidade e fisiologia das bactérias naturalmente associadas as plantas de capim-elefante, especialmente as estirpes cultiváveis, é um pré-requisito para estudos futuros de maximização do potencial da comunidade bacteriana para favorecer o crescimento de seus hospedeiros. Estratégias similares têm sido amplamente explorada pela pesquisa mundial com plantas de interesse agrícola como arroz, milho, trigo e cana-de-açúcar (GUIMARÃES, et al., 2010; HUNGRIA, 2011; SALA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2002). Neste estudo, as análises de identificação de características relacionadas com a promoção de crescimento vegetal indicaram que a comunidade de bactérias diazotróficas cultiváveis apresenta candidatos potenciais para aplicação biotecnológica como biofertilizante em plantas de capim-elefante, e que provavelmente irão assistir o desenvolvimento das plantas através de mecanismos sustentáveis em solos com baixa disponibilidade de nitrogênio e fósforo.

CAPÍTULO II

INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM PLANTAS DE CAPIM-ELEFANTE

RESUMO

Para culturas bioenergéticas, como o capim-elefante, a utilização de práticas agrícolas que minimizem o uso de fertilizantes químicos e/ou promovam o crescimento das plantas é um assunto de grande relevância tanto do ponto de vista econômico como ambiental, já que contribui positivamente para o balanço energético da cultura e na redução da emissão de gases de efeito estufa. De maneira geral, os estudos de inoculação de culturas agrícolas com bactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal têm mostrado resultados positivos e com contribuições significativas para produção das plantas hospedeiras. Desta forma, o objetivo deste capítulo foi avaliar, sob condições de vaso, a resposta dos genótipos Cameroon e Roxo à inoculação com estirpes dos gêneros *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Gluconacetobacter*, previamente caracterizadas e selecionadas quanto suas habilidades de fixar nitrogênio, produzir compostos indólicos e solubilizar fosfato *in vitro*. As plantas foram coletadas aos 60 dias após o plantio, e avaliadas quanto a população de bactérias diazotólicas, produção de massa fresca de parte aérea, massa seca de parte aérea e raiz, acúmulo de N, P e K e teor de proteína bruta na parte aérea. Os tecidos de raiz e parte aérea de ambos os genótipos foram colonizados por diferentes grupos de bactérias diazotróficas, sendo o maior NMP detectado no meio JNFb, utilizado para quantificar as estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*. O genótipo Cameroon foi significativamente o mais produtivo e apresentou maior acúmulo de nutrientes em todos os parâmetros analisados, com exceção do teor de proteína bruta. Não foram observados efeitos significativos dos tratamentos de inoculação no rendimento de biomassa, acúmulo de nutrientes e teor de proteína. No entanto, incrementos de até 50% na massa seca de raiz, 30% no N-total e 18% no P-total foram observados no genótipo Cameroon devido a inoculação. Como os resultados obtidos neste experimento foram provenientes de uma amostragem pontual, e a variação das respostas de inoculações de bactérias diazotróficas têm sido constantemente detectadas em outras poáceas em função do estágio de desenvolvimento, genótipo, ambiente e componentes da microflora natural; novos experimentos serão necessários para avaliar o estabelecimento das bactérias e os mecanismos de promoção de crescimento durante todo o ciclo de desenvolvimento das plantas.

ABSTRACT

For bioenergy crops such as elephant grass, the use of farming practices that minimize the use of chemical fertilizers and/or promote the plant growth is very important economic and environmental issue, as it can positively contribute to the culture energy balance and to reduce the greenhouse gases emission. In general, studies of crops inoculation with diazotrophic plant growth-promoting bacteria have shown positive results and significant contributions to the production of the host plants. Thus, the purpose of this chapter was to evaluate, under vessel experiment conditions, the response of Cameroon and Roxo genotypes to inoculation with *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter* and *Gluconacetobacter* strains, previously characterized and selected based on their ability to fix nitrogen, to produce indole compounds and to solubilize phosphate in vitro. Plants were harvested at 60 days after planting, and evaluated for diazotrophic bacterial population, fresh mass and dry weight of shoot and root, accumulation of N, P and K and “crude protein” content. The roots and shoots tissues of both genotypes were colonized by different groups of diazotrophs, the highest value was found in JNFb medium, used to quantify *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense* strains. The Cameroon genotype was significantly more productive and accumulated greater amounts of N, P and K than Roxo. The results showed that inoculation had no significant effects in increasing yield components and nutrient contents. Although, increases in root dry weight (up to 50%), 30% of nitrogen content and 18% on phosphorus accumulation were observed on Cameroon genotype due to inoculation. It is important to note that the results obtained in this experiment were from one and pontual sample, and could be changed according to the development of the plants. Therefore, further tests and experiments are required to test the establishment of the bacteria and the mechanisms involved in plant growth promotion by diazotrophic bacteria.

1 INTRODUÇÃO

Sistemas de produção de energia sustentáveis são aqueles que maximizam a produção de fotoassimilados e minimizam o requerimento de insumos químicos e água. Além disso, culturas bioenergéticas devem ser agronomicamente conduzidas de forma a contribuir, entre outros fatores, para a minimização das emissões de gases do efeito estufa (BYRT et al., 2011), decorrentes em grande parte da produção e aplicação de fertilizantes sintéticos, principalmente os nitrogenados (ELSAYED et al., 2003; KIM e DALE, 2008). De acordo com o IPCC (2006), uma vez que não existem dados disponíveis sobre o processo no Brasil, 1% do N adicionado ao solo como fertilizante é emitido como N₂O. Quanto às emissões de CO₂ na fabricação dos fertilizantes, de acordo com Kongshaug (1998), a produção de 1 kg de uréia, 1 kg de superfosfato simples e 1 kg de cloreto de potássio emitem para a atmosfera, 0,61, 0,17 e 0,34 kg CO₂eq, respectivamente. Frente a esta problemática, a aplicação de práticas agrícolas alternativas que possam suprir total ou parcialmente a nutrição mineral e favorecer a promoção de crescimento de plantas agroenergéticas torna-se um assunto de grande interesse econômico e ambiental, e aqui destaca-se os processos microbiológicos que poderiam reduzir significativamente a demanda de N- e P-fertilizantes e/ou otimizar a captação dos mesmos pelas culturas agroenergéticas.

Dentre as culturas com grande potencial bioenergético, o capim-elefante têm se destacado como uma cultura promissora, principalmente pelo seu alto potencial produtivo (MORAIS et al., 2011). Assim como a grande maioria das plantas cultivadas, o capim-elefante tem mostrado respostas às doses crescentes de nitrogênio, fósforo e potássio, entretanto, o nível de adubação econômica deve ser determinado para cada sistema de produção (JACQUES, 1994). Para uso energético, contrariamente às características para a alimentação de bovinos, a planta ideal deve ser rica em fibras e lignina, apresentar alta eficiência no uso de N foliar e elevada relação C:N na biomassa (MORAIS, 2008; BYRT et al., 2011). Em geral, teores menores que 0,6% de N na biomassa têm sido identificados como ótimo para essas culturas (KAUTER et al., 2003). Tem-se ainda que considerar que os cortes periódicos para produção da biomassa são responsáveis pela retirada de grandes quantidades de nutrientes do solo. Desta forma, torna-se essencial que se proceda uma adubação de manutenção ou a utilização de práticas agrícolas alternativas - como a otimização de processos biológicos - de modo a manter o equilíbrio dos elementos no solo e possibilitar um bom desenvolvimento da rebrota.

Desde o descobrimento da interação entre bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento vegetal com plantas de interesse econômicos diversos grupos de pesquisa têm explorado a diversidade destes organismos e sua aplicabilidade como substitutos de agroquímicos, que em geral aumentam os custos de produção e geram impactos ambientais altamente negativos (SALAMONE et al., 2010). De acordo com Olivares (2009), ao longo dos anos, duas estratégias foram identificadas para a intensificação do uso de microrganismos a favor da produção vegetal, sendo uma baseada na ativação de comunidades microbianas nativas pelo manejo do solo e do ambiente, e a segunda - a qual tem sido amplamente explorada pela pesquisa mundial - que se fundamenta no isolamento e reinoculação de microrganismos alvos em ensaios experimentais de seleção de estirpes.

A grande maioria de estudos do uso de microrganismos a favor da produção vegetal tem sido relacionado com o processo de fixação biológica de nitrogênio, e a estratégia de reinoculação destes organismos em plantas da família *Poaceae* têm mostrado resultados bastante promissores. Na cultura do arroz, Baldani et al. (2000) observaram aumentos de 42-64% no crescimento de plantas inoculadas com *Burkholderia brasilensis* e *B. vietnamiensis*.

Govindarajan et al., (2007), inoculando *B. vietnamiensis* e *Azospirillum lipoferum*, separadamente, mostraram aumentos significativos na parte aérea e no volume de raízes de arroz. Ferreira (2008) observou em cultivos de arroz sob condições de campo, contribuição da fixação de nitrogênio entre 30 a 50 kg N ha⁻¹ ano⁻¹. Na cultura do milho resultados mostram que a contribuição da fixação de nitrogênio pode variar de 20 a 50 Kg N ha⁻¹ ano⁻¹ (RIGGS et al., 2001; ALVES, 2007). No trigo, respostas positivas da inoculação de bactérias diazotróficas têm sido relatados por diversos autores (ROESCH et al., 2006; SALA et al., 2007). Recentemente, estudos desenvolvidos pela Embrapa Soja e a UFPR com inoculação de *Azospirillum* spp revelaram incrementos médios de 25% a 30% no rendimento do milho e de 8% a 11% no trigo (HUNGRIA, 2011). Em pastagens, evidências da contribuição da FBN foram obtidas pela primeira vez por De-polli et al. (1977), que demonstraram a incorporação de N₂ marcado com ¹⁵N nas raízes de *Paspalum notatum* cv. Batatais e *Digitaria decumbens* cv. Transvala. Subseqüentemente, resultados obtidos por Boddey et al., (1983) e Boddey e Victorina (1986) usando a técnica de diluição isotópica de ¹⁵N, sugeriram que a contribuição da FBN para a nutrição de *Paspalum notatum*, *Brachairia decumbens* e *B. humidicola* era aproximadamente 20 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ nas condições estudadas. Para grama *Kallar Grass*, foi demonstrado que o endófito *Azoarcus* sp. (BH72) contribuiu significativamente com N proveniente da FBN (Hurek et al., 2002). Além dos resultados citados, estas contribuições têm sido detectadas em aveia, sorgo, canola, batata, tomate, entre outras culturas (SOARES et al., 2006; BERGAMASCHI et al., 2007; CABALLERO-MELLADO et al., 2007).

Ao contrário das plantas de interesse agrícola, pouco é conhecido sobre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e outros mecanismos na promoção de crescimento vegetal de espécies de plantas não-leguminosas usadas em programas bioenergéticos como *Echinochloa polystachya*, milheto (*Setaria italica*), miscanthus (*Miscanthus giganteus*), switchgrass (*Panicum virgatum*) e capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) (TAYLOR et al., 2010). A cana-de-açúcar (*Saccharum officinalis*) é a única cultura bioenergética, na qual a contribuição de processos biológicos como a FBN tem sido extensivamente estudada. Resultados promissores da contribuição de diferentes gêneros e/ou espécies de bactérias em experimentos de inoculação em cana-de-açúcar têm sido evidenciados por diversos autores (OLIVARES, 1997; OLIVEIRA et al., 2002; MUTHUKUMARASAMY et al., 2006; REIS et al., 2009). Em decorrência de inúmeros trabalhos com resultados significativos, Reis et al. (2009) lançaram um inoculante composto por um consórcio de 5 estirpes de bactérias diazotróficas incluindo *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense* e *Burkholderia tropica*. De acordo com os autores, o inoculante substituiu 100% do N-fertilizante na variedade comercial RB867515 no primeiro ano, sem perda de produtividade. Para as demais culturas supracitadas com potencial bioenergético, os relatos da literatura evidenciam a ocorrência de bactérias diazotróficas em algumas plantas como *Miscanthus sinensis* cv. 'Giganteus' (ECKERT et al., 2001; MIYAMOTO et al., 2004), *Miscanthus sacchariflorus* e *Pennisetum purpureum* (KIRCHHOF et al., 2001; REIS et al., 2001; Videira et al., 2011). Outros autores, usando a técnica de ¹⁵N, demonstraram que existe baixa contribuição de N via FBN para plantas de *Echinochloa polystachya* (MARTINELLI et al., 1992) e rizosfera de switchgrass (DOMMARGUES, et al., 1973). Para *Pennisetum purpureum*, os estudos de FBN são mais recentes, e os resultados são bastante promissores. Quesada (2005) e Morais et al., (2011) mostraram contribuições de N derivado da FBN variando entre 30 e 45%, o que representam cerca de 50 a 130 kg N ha⁻¹.

Mais recentemente, tem sido relatado que os processos microrbianos com ação favorável ao desenvolvimento de seus hospedeiros não se restringe apenas à fixação biológica de N₂, incluindo também outros processos biofertilizantes, bioestimulantes e de biocontrole (VESSEY, 2003; DOBBELAERE e OKON, 2007; SPAEPEN et al., 2009; CASSÁN et al.,

2011). Em relação aos efeitos bioestimulantes podemos citar a produção de substâncias promotoras como dos fitoreguladores ácido 3-indol-acético (BACA e ELMERICH, 2007), citocininas (TAKEI et al., 2001) e giberilinas (CASSÁN et al., 2001), além da inibição da síntese de etileno, através da enzima ACC-deaminase (GLICK et al., 2007). A contribuição de processos bioestimulantes para a promoção do crescimento vegetal já foi demonstrada para diversos gêneros de bactérias incluindo *Azospirillum* spp, *Alcaligenes* spp, *Bradyrhizobium* spp, *Burkholderia* spp, *Enterobacter* spp, *Rhizobium* spp (PATTEN e GLICK, 2002; VESSEY, 2003). Além da indução de mudanças na morfologia ou fisiologia das raízes através da produção de substâncias promotoras do crescimento vegetal pelas bactérias, algumas bactérias podem melhorar a nutrição vegetal fornecendo nutrientes específicos para as plantas, como o fósforo, através da solubilização e mineralização de formas pouco disponíveis de fósforo inorgânico e orgânico (PODILE e KISHORE, 2006). Vários gêneros bacterianos estão envolvidos nesses processos, mas os principais incluem *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, *Aereobacter* e *Flavobacterium* (RODRÍGUEZ e FRAGA, 1999; VESSEY, 2003). O efeito deste processo bacteriano já foi comprovado em plantas de trigo (KUMAR e NARULA, 1999) tomate (KIM et al. 1998), soja (CATTELAN et al. 1999), milho (YAZDANI et al., 2009), cana-de-açúcar (SUNDARA et al., 2002) e arroz (BONILLA, 2011).

Considerando que o uso de microrganismos que favorecem a produção vegetal tem sido fundamentado no isolamento e seleção de estirpes em experimentos de inoculação, o objetivo deste capítulo foi avaliar, sob condições de vaso, a contribuição de bactérias promotoras de crescimento vegetal em 2 genótipos de capim-elefante.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Estirpes e Genótipos

Para avaliar a contribuição de bactérias diazotróficas na promoção de crescimento de plantas de Capim-elefante foram utilizadas nove estirpes selecionadas e identificadas no Capítulo I (Tabela 1). Além das inoculações individuais, as plantas foram inoculadas com uma mistura de quatro isolados. As estirpes selecionadas foram inoculadas em dois genótipos contrastantes de capim-elefante, Roxo e Cameroon.

De acordo com dados de Xavier et al. (1998) e Moraes et al. (2009), o genótipo Roxo, quando cultivado em solos de baixa fertilidade, apresenta menor produção de biomassa e acúmulo de N-total nos tecidos quando comparado com o Cameroon.

2.2 Preparo e Aplicação do Inoculante

As estirpes utilizadas como inoculante foram multiplicadas em 5 mL de meio DYGS durante 24 horas sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C. Posteriormente, uma alíquota de 100 µL de cada cultura com uma densidade ótica ($D.O_{600}=1$) foi adicionada a erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meio DYGS e os inóculos foram cultivados durante 24 horas sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30°C. O número de células viáveis foi determinado pelo método da diluição seriada em placas contendo meio sólido DYGS.

Posteriormente, um volume de 15 mL de suspensão bacteriana, contendo aproximadamente 10^9 células mL^{-1} , foi inoculado com auxílio de uma seringa esterilizada em sacos de polipropileno contendo 35 gramas de turfa (moída, neutralizada e esterilizada). Após a inoculação, a turfa contendo as bactérias foi mantida sob temperatura de 30°C por 48 horas e posteriormente armazenado sob temperatura de 4°C antes do uso. No ato da inoculação, o número de células viáveis foi novamente determinado pelo método da diluição seriada em placas contendo meio sólido DYGS, e os valores variaram entre 10^7 - 10^8 células por g turfa.

Os colmos dos genótipos de capim-elefante, Roxo e Cameroon, foram cortados e toletes do terço mediano contendo uma gema foram selecionados e mantidos sob temperatura ambiente por um período de 24 horas. Um total de dez gramas de inoculante (cultura bacteriana + turfa) foi dissolvido em 1 litro de água destilada e esterelizada. Cerca de 30 toletes foram imersos nesta solução por aproximadamente 2 horas. Decorrido este tempo os toletes foram extraídos da solução e plantados em seguida. Um grama de inoculante foi submetido a diluição seriada em solução salina, e o número de células viáveis variou entre 10^6 - 10^7 células mL^{-1} .

2.3 Implantação do Experimento

O experimento foi implantado em Dezembro de 2010 e conduzido em vasos contendo terra de um Nitossolo (Terra Roxa Estruturada), coletado na área experimental da ESALQ em Piracicaba-SP, com baixa marcação de ^{15}N mas de alta estabilidade. A partir da análise química, realizada em blocos (Tabela 2), foi feita a adubação química da terra utilizada. Cada 14 kg de terra foi adubado com 4 g de de superfosfato simples (100 kg ha^{-1} de P_2O_5); 3,5 g de sulfato de potássio (250 kg ha^{-1} de K_2O) e 0,7 g de FTE BR12 (100 kg ha^{-1}). O material propagativo de capim-elefante foi obtido no campo experimental da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. Foram utilizados cinco toletes por vaso e após a germinação (20 dias após plantio) foram mantidas 3 plantas por vaso até o final do experimento. O experimento foi conduzido ao ar livre com delineamento em blocos ao acaso, com três

Tabela 1 Estirpes de bactérias diazotróficas utilizadas como inoculante em plantas de capim-elefante, selecionadas de acordo com a capacidade de reduzir acetileno, produzir fitoregulador e solubilizar fosfato e que constituíram os tratamentos do experimento.

Estirpes	ID_16S rRNA	Origem (Tecido/Genótipo)	Nase♣	AIA♣	PO ₄ ♦
JN125	<i>A. brasilense</i>	C. médio/ Cameroon	+++	+	-
JN360	<i>A. brasilense</i>	C. apical/ CNPGL	+++	+++	-
JN245	<i>Azospirillum</i> sp DA10-2	Raiz/ Cameroon	+++	+	-
JM355	<i>Klebsiella oxytoca</i>	C. apical /CNPGL	+	+++	-
JM2	<i>Enterobacter oryzae</i>	Folha/Cameroon	+	+	+
LG49	<i>G. sacchari</i>	Folha/Cameroon	+	++	+
LG469	<i>G. liquefaciens</i>	C. basal/ CNPGL	<i>nd</i>	++	+
LP479	<i>Gluconacetobacter</i> sp	C. basal/ CNPGL	++	+	+
LP343	<i>G. diazotrophicus</i>	Folha/CNPGL	+++	++	+
Mix (JN360, LG469, LP479 e JM2)					
Não Inoculado					

♣ Atividade da nitrogenase: + <100 nmol etileno h⁻¹ T proteína⁻¹; ++ ≥100; +++ ≥ 300; ♣ Produção de compostos indólicos.: + 0,1 – 3 µg comp. indólicos T proteína⁻¹; ++ 3 – 10; +++ ≥ 10; ♦ Solubilização de fosfato; *nd.* não detectado

Tabela 2 Análise química das amostras de terra utilizadas para plantio dos genótipos de Capim-elefante no experimento de vasos.

Bloco	pH em H ₂ O	Al	Ca+T	Ca	T	P	K	C	MO	N	¹⁵ N
		-----cmolc/dm ³ -----						-----%-----			% at.
1	5,3	0,0	5,5	4,6	0,8	23,6	92,0	0,70	1,21	0,085	0,1071
2	5,3	0,0	5,8	4,8	1,0	22,0	84,0	0,72	1,23	0,103	0,1084
3	5,1	0,0	5,1	4,3	0,8	15,4	92,0	0,74	1,27	0,077	0,1069

repetições, em arranjo fatorial 11x2, sendo onze tratamentos de inoculação (estirpes de bactérias diazotróficas) e dois genótipos de capim-elefante.

2.4 Colheita e Análises

A colheita foi feita em março de 2011, 60 dias após o plantio. Cada amostra foi constituída das 3 plantas de cada parcela, sendo as mesmas divididas em parte aérea e raiz. As amostras de raiz foram lavadas em água corrente para remover o excesso de solo; amostras de parte aérea (folhas+colmo) também foram submetidas a rápida lavagem com água corrente. Em seguida, ambas as amostras foram acondicionadas, separadamente, em sacos de papel e levadas para o laboratório.

2.4.1 Quantificação da população de bactérias diazotróficas

A técnica do número mais provável (NMP) foi utilizada de acordo com a metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995) para a contagem do número de bactérias presente nas raízes e parte aérea dos dois genótipos de capim-elefante. Um grama de material vegetal (raiz e parte aérea) foi suspenso em 9 mL de solução salina e maceradas com auxílio de um liquidificador. Alíquotas de 100 µL de cada diluição (até 10⁻⁸) foram inoculadas em frascos contendo 5 mL de meio de cultura semi-sólido, específico para a estirpe utilizada em cada tratamento (Tabela 2). Os frascos foram incubados sob temperatura de 30°C por sete dias. Foram utilizados três frascos por diluição, e o resultado foi avaliado pela presença ou ausência

de película característica das bactérias diazotróficas nos meios de cultivo. Utilizou-se a tabela de McCrady (DÖBEREINER et al., 1995) - como método estatístico - para determinar o NMP de bactérias diazotróficas por grama de amostra.

2.4.2 Acúmulo de biomassa e nutrientes

As plantas foram coletadas, divididas em parte aérea e raiz, e colocadas em uma estufa de circulação forçada, a uma temperatura constante de 65°C por um período de quinze dias. A biomassa fresca da parte aérea foi determinada no momento da coleta e antes da secagem.

Após completa secagem, a parte aérea foi moída em moinho de facas do tipo Wiley e enviada para análise de N, P e K (somente em amostras parte aérea) no laboratório de análise químicas da Embrapa Agrobiologia. Duzentos miligramas de material vegetal, seco e moído, foram colocados em tubos de digestão, adicionando 1 mL de solução contendo H₂O₂ a 30 %, 1,5 mL de ácido sulfúrico concentrado e, por último 0,7 g de uma mistura catalisadora contendo 100 g de sulfato de sódio, 10 g de sulfato de cobre e 1,0 g de selênio. As amostras foram mantidas no bloco digestor até digestão total do material vegetal. Para a quantificação do nitrogênio total, foi utilizado o método de Kjeldahl conforme Alves et al. (1994). No mesmo extrato, foram determinados os teores de P e K, pelo método de absorção atômica e fotometria de chama, respectivamente. O teor de proteína bruta foi calculado pela multiplicação do percentual de nitrogênio na biomassa de parte aérea pelo fator 6,25 (100 dividido por 16% de nitrogênio em média nas proteínas). A relação C:N foi calculada através da divisão do teor de carbono, que no caso do capim-elefante é 45% (MORAIS et al., 2009) pelo teor de nitrogênio acumulado na matéria seca. Os resultados de biomassa foram apresentados em g por vaso (3 plantas) e o acúmulo de nutrientes para mg por kg de massa seca de parte aérea.

2.4.3 Análises estatísticas

Os dados de NMP foram transformados para log (NMP+1) antes de serem processados. Os dados foram analisados no programa SAEG 8.0 quanto a sua normalidade (teste de Lilliefors) e homogeneidade de variância (teste de Cockran e Bartlet). Em seguida, foram feitas análises de variância e teste de Scott-knott (5%) para comparação das médias, utilizando-se o programa SISVAR 5.0.

3 RESULTADOS

3.1 Quantificação da População de Bactérias Diazotróficas

A quantificação das bactérias diazotróficas (NMP) ficou em torno de 10^4 - 10^6 células de bactérias por grama de tecido fresco para ambos os genótipos de capim-elefante. Os dados foram transformados em log na base 10 e avaliados com base na análise de variância (Teste F) e no teste de comparação de médias (Scott-Knott em nível de 5%) (Tabelas 3 e 4). A análise de variância, usando a combinação de todos os dados, revelou que não existe diferença significativa quanto ao número de bactérias diazotróficas entre os dois genótipos testados, Cameroon e Roxo ($P>0,05$). Por outro lado, diferenças significativas no número de bactérias foram observadas para tecidos da parte aérea e raiz ($P<0,05$), entre os tratamentos de inoculação e na interação ($P<0,01$) (Tabela 3). Em geral, as raízes apresentaram números mais elevados de bactérias diazotróficas quando comparado a parte aérea.

Analisando o conjunto de dados, de maneira geral, o número de bactérias provenientes do meio JNFb foi maior quando comparado com os demais, tanto para os tratamentos inoculados (JN1125, JN360 e Mix_JNFb) quanto para a testemunha não inoculada (NI_JNFb) (Tabela 3 e 4). Significativamente, os valores encontrados para JNFb foram similares aos tratamentos contendo as estirpes JM2, LG49 e LG469, identificadas respectivamente como *Enterobacter oryzae*, *Gluconacetobacter liquefaciens* e *G. sacchari*. Por outro lado, as estirpes JM355, LP479 e LP343, identificadas respectivamente como *Klebsiella oxytoca*, *Gluonacetobacter* sp e *G. diazotrophicus* apresentaram valores de NMP significativamente inferiores dos demais. Vale ressaltar que estas estirpes foram originalmente isoladas do genótipo CNPGL91F06-3 de capim-elefante, e desta forma, novas análises devem ser realizadas para avaliar o possível efeito do genótipo no estabelecimento das mesmas.

Analisando o tratamento contendo a mistura de 4 estirpes (JN360+ JM2+LG469+ LP479), o meio JNFb apresentou número de bactérias superior aos demais. Considerando que o meio JNFb foi utilizado para quantificar a estirpe de *Azospirillum brasilense*, podemos concluir que a população desta espécie destacou-se em relação as demais. Resultado semelhante foi observado para o tratamento não inoculado, no qual o meio JNFb mostrou número de bactérias mais elevado. Desta forma, não é possível afirmar se no tratamento inoculado com a mistura a estirpe de *Azospirillum brasilense* se estabeleceu preferencialmente, suprimindo a população das demais bactérias inoculadas, ou se a população nativa prevaleceu.

3.2 Acúmulo de Biomassa e Nutrientes

De acordo com a análise de variância, houve diferença significativa entre os genótipos para todos os parâmetros analisados, sendo Cameroon o mais produtivo na média dos tratamentos inoculados e não inoculados (Tabela 5). Não se observou diferença significativa entre os tratamentos inoculados e o não inoculado na média dos tratamentos e no desdobramento entre genótipo e inoculação para massa fresca de parte aérea (MFPA), massa seca de parte aérea (MSPA) e raiz (MSRA), acúmulo de N, P e K, teor de proteína bruta e relação C:N (Tabelas 5, 6 e 7). No entanto, incrementos de até 50% na massa seca de raiz e 30% no teor de N da parte aérea foram observados no genótipo Cameroon, porém, não diferindo estatisticamente.

Tabela 3 Número de bactérias diazotróficas (Log do número de células g⁻¹ de matéria fresca) na parte aérea e raiz de dois genótipos de capim-elefante submetido a diferentes tratamentos e colhidos aos 60 dias .

Variáveis (Estirpes)	Meio de Cultivo	Log do número de células g ⁻¹ de matéria fresca				
		Tratamento	Genótipo		Tecido	
			Cameroon	Roxo	Parte aérea	Raiz
JN125	JNFb	5,09 a	5,30	4,87	5,04	5,13
JN360	JNFb	5,28 a	5,34	5,23	4,90	5,68
JN245	JNFb	4,23 a	3,28	5,18	3,98	4,48
JM355	JMV	4,51 b	3,45	3,64	3,05	4,05
JM2	JMV	3,55 a	4,92	4,10	4,23	4,80
LG49	LGI	4,12 a	4,26	3,98	4,25	4,00
LG469	LGI	4,58 a	4,57	4,57	4,35	4,80
LP479	LGI-P	2,33 c	2,65	2,00	2,00	2,65
LP343	LGI-P	3,73 b	2,71	4,75	3,39	4,08
Mix (JN360+ JM2+LG469+ LP479)	JNFb	4,82 a	4,90	4,73	5,05	4,58
	JMV	3,26 b	3,36	3,15	2,98	3,53
	LGI	3,49 b	2,99	3,98	2,49	4,48
Não Inoculado	LGI-P	2,15 c	1,42	2,89	2,57	1,74
	JNFb	5,60 a	5,98	5,21	5,26	5,94
	JMV	5,03 a	5,45	4,61	4,75	5,32
	LGI	3,38 b	4,12	2,65	2,69	4,08
	LGI-P	4,21 a	4,63	3,79	4,15	4,27
Média		-	4,08	4,08	3,83 B	4,33 A
Teste F		***	ns		***	
Teste F (Trat.xGen.)		ns				
Teste F (Trat.xTec.)		ns				
Teste F (Trat.xTec.xGen.)		***				
CV (%)		39,73				

Valores médios de três repetições. Valores seguidos da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade (**) e 1% (***).

A média de produção de MFPA para as plantas de capim-elefante cultivadas durante 60 dias foi de 223,2 g por vaso (3 plantas) para Cameroon e 153,2 g por vaso para o Roxo. Para o genótipo Cameroon, incrementos de 5% foram detectados na inoculação com a estirpe JN125 de *A. brasilense*, 2,5% para a mistura e menor que 1% para JM2, LG49 e LP343.

Em relação a MSPA, a média de produção foi de 36,2 g por vaso para Cameroon e 19,9 g por vaso para o Roxo. Incrementos de 10 e 6% foram observados, respectivamente, com a inoculação das estirpes LG49 (*G. sacchari*) e LP343 (*G. diazotrophicus*) no genótipo Cameroon.

No acúmulo de MSRA, a média de produção foi de 49,8 g por vaso para Cameroon e 42,5 g por vaso para o Roxo. Neste parâmetro, para o Cameroon, incrementos de 7 a 51% foram observados em 7 dos 10 tratamentos, com exceção apenas para a inoculação com as estirpes JN360, JM355 e LP479.

Tabela 4 Número de bactérias diazotróficas (Log do número de células g⁻¹ de matéria fresca) na análise de desbobrimento da parte aérea e raiz de dois genótipos de capim-elfante submetido a diferentes tratamentos e colhidos aos 60 dias .

Variáveis (Estirpes)	Meio de Cultivo	Log do número de células g ⁻¹ de matéria fresca			
		Parte aérea		Raiz	
		Cameroon	Roxo	Cameroon	Roxo
JN125	JNFb	5,55 a	4,53 a	5,05 a	5,21 a
JN360	JNFb	4,55 a	5,25 a	6,14 a	5,21 a
JN245	JNFb	3,43 b	4,53 a	3,13 b	5,83 a
JM355	JMV	2,30 b	3,79 a	4,60 a	3,50 b
JM2	JMV	4,78 a	3,67 a	5,05 a	4,54 a
LG49	LGI	4,76 a	3,74 b	4,79 a	3,20 b
LG469	LGI	4,35 a	4,36 a	4,80 a	4,79 a
LP479	LGI-P	2,16 b	4,01* a	5,30 a	nd* c
LP343	LGI-P	2,22 b	4,55 a	3,20 b	4,95 a
Mix (JN360+ JM2+LG469+ LP479)	JNFb	6,04 a	4,05 a	3,77 b	5,40 a
	JMV	3,67 b	2,69 b	3,07 b	4,00 b
	LGI	2,68 b	2,30* b	3,30 b	5,65* a
	LGI-P	2,83* b	2,62 b	nd* c	3,48 b
Não Inoculado	JNFb	5,29 a	5,23 a	6,69 a	5,19 a
	JMV	5,14 a	4,36 a	5,77 a	4,87 a
	LGI	3,16 b	2,22 b	5,07 a	3,09 b
	LGI-P	4,38 a	3,92 a	4,87 a	3,67 b
Média		3,97	3,89	4,39	4,27

Valores médios de três repetições. Valores seguidos da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.* separam as médias dentro do mesmo genótipo (linha).

Interessantemente, a estirpe LP343 (*G. diazotrophicus*) - que apresentou valores de NMP significativamente inferiores aos demais tratamentos, promoveu incrementos no genótipo Cameroon em todos os parâmetros analisados, sendo 1, 6 e 13% na MFPA, MSPA e MSRA, respectivamente. Resultado semelhante foi observado para o tratamento inoculado com LG49 (*G. sacchari*), o qual mostrou incrementos de ~1, 10 e 28% na MFPA, MSPA e MSRA, respectivamente, no genótipo Cameroon.

Com relação ao acúmulo de nutrientes nos tecidos, incrementos foram observados para N e P. Devido à inoculação das estirpes JN125 e LP343, ambos os genótipos foram favorecidos com incrementos de até 29% de N e 16% de P. Resultados positivos de incremento também foram encontrados para a estirpe JM355 no genótipo Roxo e LG49 em Cameroon. Já em relação ao potássio, somente o tratamento de inoculação com a estirpe LP343 mostrou incremento para o genótipo Cameroon.

A relação C:N foi significativamente maior no genótipo Cameroon, com uma média de 92; Enquanto para o genótipo Roxo a média geral foi de 61,6 (Tabela 7). Como era esperado, os tratamentos que apresentaram menores teores de proteína bruta, apresentaram relação C:N mais elevada. Quanto ao teor de proteína bruta (PB) nos tecidos, os tratamentos de inoculação influenciaram positivamente no genótipo Roxo, com exceção do JM355. Para o genótipo Cameroon, 6 tratamentos mostraram respostas positivas, mas os incrementos foram menos expressivos quando comparados com o Roxo.

Tabela 5 Produção de biomassa de parte aérea e raiz (g por vaso) de plantas de capim-elefante inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas durante 60 dias. Valores médios de 3 repetições

Tratamentos de Inoculação	Massa fresca da parte aérea (g vaso ⁻¹)		Massa seca da parte aérea (g vaso ⁻¹)		Massa seca da raiz (g vaso ⁻¹)	
	Cameroon	Roxo	Cameroon	Roxo	Cameroon	Roxo
JN125	244,0 A	154,2 B	38,5 A	20,0 B	54,5 A	47,5 A
JN360	189,2 A	130,7 B	27,5 A	16,5 B	40,3 A	42,5 A
JN245	213,7 A	170,7 A	35,5 A	22,5 B	46,3 A	43,7 A
JM355	217,3 A	150,7 B	35,7 A	20,0 B	43,5 A	40,2 A
JM2	235,5 A	146,2 B	56,6 A	19,0 B	54,2 A	38,8 A
LG49	256,8 A	135,8 B	42,3 A	16,8 B	55,7 A	37,7 B
LG469	200,2 A	147,8 A	31,7 A	19,3 B	65,5 A	37,5 B
LP479	191,2 A	155,3 A	33,7 A	20,8 B	42,2 A	46,0 A
LP343	235,0 A	160,7 B	40,8 A	20,3 B	49,7 A	45,3 A
Mix	239,2 A	158,8 B	37,8 A	20,8 B	53,3 A	40,2 A
Sem inoculação	233,5 A	174,0 B	38,3 A	23,0 B	43,3 A	48,0 A
Média	A	B	A	B	A	B
Teste F (Genótipo)	***		***		***	
Teste F (Tratamento)	ns		ns		ns	
Teste F (Gen.xTrat.)	ns		ns		ns	
CV (%)	18,66		20,88		23,22	

Valores médios de três repetições. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 6 Acúmulo de N, P e K na parte aérea de plantas de capim-elefante inoculadas com bactérias diazotróficas e cultivadas durante 60 dias. Valores médios de 3 repetições.

Tratamentos de Inoculação	N (g kg MS ⁻¹)		P (g kg MS ⁻¹)		K (g kg MS ⁻¹)	
	Cameroon	Roxo	Cameroon	Roxo	Cameroon	Roxo
JN125	6,37 A	8,10 A	1,95 B	2,94 A	27,00 B	35,33 A
JN360	6,43 A	7,83 A	2,16 A	2,85 A	29,00 A	36,00 A
JN245	5,47 A	6,03 A	1,79 A	1,90 A	25,67 A	33,00 A
JM355	4,83 B	7,97 A	1,76 B	2,62 A	28,67 B	38,00 A
JM2	4,46 B	7,63 A	1,70 B	2,66 A	24,00 B	37,33 A
LG49	5,83 A	7,97 A	1,80 B	3,14 A	24,67 B	38,33 B
LG469	3,90 B	7,33 A	1,77 A	2,41 A	25,67 B	36,00 A
LP479	6,10 A	8,00 A	2,04 A	2,61 A	29,33 B	40,00 A
LP343	5,70 B	7,90 A	1,88 A	2,68 A	27,00 B	38,67 A
Mix	4,73 B	7,60 A	1,39 B	2,40 A	25,33 B	36,00 A
Sem inoculação	5,23 A	6,37 A	1,94 A	2,19 A	28,33 A	35,67 A
Média	B	A	B	A	B	A
Teste F (Genótipo)	***		***		***	
Teste F (Tratamento)	ns		ns		ns	
Teste F (Gen.xTrat.)	ns		ns		ns	
CV (%)	23,10		25,42		16,30	

Valores médios de três repetições. Valores seguidos da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 7 Relação C:N e proteína bruta na biomassa produzida por dois genótipos de capim-elefante inoculados com bactérias diazotróficas e cultivados por 60 dias.

Variáveis (Estirpes)	C:N		Teor de Proteína Bruta	
	Cameroon	Roxo	Cameroon	Roxo
JN125	76,56 A	56,76 A	3,98 A	5,06 A
JN360	76,23 A	58,07 A	4,02 A	4,90 A
JN245	87,16 A	74,77 A	3,42 A	3,77 A
JM355	98,18 A	57,02 B	3,02 B	4,98 A
JM2	101,59 A	60,57 B	2,79 B	4,77 A
LG49	89,18 A	59,47 A	3,64 A	4,98 A
LG469	137,39 A	62,49 B	2,44 B	4,58 A
LP479	76,42 A	59,05 A	3,81 A	5,00 A
LP343	83,43 A	58,10 A	3,56 B	4,94 A
Mix	97,15 A	61,20 B	2,95 B	4,75 A
Sem inculação	88,30 A	70,69 A	3,27 A	3,98 A
Média	91,96 A	61,65 B	3,36 B	4,71 A
Teste F (Genótipo)	***		***	
Teste F (Tratamento)	ns		ns	
Teste F (Gen.xTrat.)	ns		ns	
CV (%)	31,53		23,10	

Valores médios de três repetições. Valores seguidos da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4 DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento das Bactérias Diazotróficas Inoculadas

Os dados obtidos mostram que o número de bactérias diazotróficas associadas aos genótipos Cameroon e Roxo de capim-elefante, quantificadas através da utilização de meios semi-sólidos livres de N, revelou a presença de bactérias diazotróficas em todos os tratamentos, inclusive no tratamento não inoculado. Estes resultados sugerem que ambos os genótipos são colonizados por bactérias diazotróficas pertencentes a diferentes grupos, já que películas características de bactérias diazotróficas foram detectadas em todos os meios de cultivo testados. Em geral, não houve diferença significativa no NMP entre os genótipos, no entanto, maior número foi observado nas amostras de raiz em relação a parte aérea (Tabela 3 e 4). Este resultado corrobora com relatos de outros autores, os quais verificaram maior ocorrência de bactérias diazotróficas em raízes quando comparado a parte aérea de *Pennisetum purpureum* e outras poáceas (SILVA et al., 1995; KIRCHHOF et al., 1997; OLIVARES, 1997; REIS JUNIOR, 2002; BRASIL et al., 2005).

Considerando que o meio JNFb, neste estudo específico, foi utilizado para quantificação de bactérias pertencentes a espécie *Azospirillum brasilense*, podemos concluir que houve predominância destas bactérias em relação as demais, tanto nos tratamentos inoculados quanto no não inoculado. Por outro lado, a contagem nos meios LGI e LGI-P, usados na quantificação de diferentes estirpes do gênero *Gluconacetobacter*, apresentou valores de NMP relativamente menores. Reis et al. (2001) estudando a população de bactérias em 14 genótipos de capim-elefante, também detectaram a predominância do gênero *Azospirillum*, sendo 17% do total pertencente a espécie *A. brasilense*. Estes autores não detectaram, em meio semi-sólido e semi-seletivo LGI-P, a presença de *Glucoacetobacter diazotrophicus*. Brasil et al. (2005), analisando a população de bactérias diazotróficas em 3 espécies de gramíneas forrageiras também detectaram maior percentual de isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Azospirillum* spp. A contagem no meio JMV nos tratamentos inoculados com as estirpes JM2 (*Klebsiella oxytoca*) e JM355 (*Enterobacter oryzae*) revelou valores de NMP menores do que os observados para o tratamento não inoculado. Considerando que este meio de cultivo é semi-seletivo para espécies de *Burkholderia* spp, e que bactérias dos gêneros *Klebsiella* e *Enterobacter* não haviam sido detectadas anteriormente em plantas de capim-elefante, é possível que bactérias do gênero *Burkholderia* presentes nos colmos utilizados tenham se estabelecido preferencialmente.

Comparando a população bacteriana presente nos tratamentos inoculados e não inoculados, pode-se perceber que o NMP no tratamento não inoculado foi relativamente similar em todos os meios de cultura testados, revelando aparentemente um equilíbrio entre os diferentes grupos bacterianos nativos presente nos tecidos vegetais de ambos os genótipos. Com a inoculação, é possível que tenha se estabelecido um desequilíbrio na população natural, causando conseqüente diminuição e modificação na funcionalidade dos microrganismos existentes nos tecidos analisados. De acordo com Didonet et al. (2000), a inoculação de bactérias só irá contribuir positivamente com seu hospedeiro se o inoculante conseguir competir satisfatoriamente com as bactérias nativas e com a microflora geral no solo e, além disso, estabelecer-se tanto na rizosfera quanto no interior das raízes. Como os resultados obtidos neste experimento foram provenientes de uma amostragem pontual, e flutuações na população de bactérias diazotróficas têm sido constantemente detectadas em outras poáceas (RODRIGUES et al., 2006; SABINO, 2007), novos experimentos serão necessários para avaliar o estabelecimento das bactérias ao longo do ciclo de desenvolvimento das plantas de capim-elefante.

4.2 Efeito da Inoculação nas Plantas de Capim-elefante

Analisando o efeito da inoculação com bactérias diazotróficas na produção de massa fresca e seca de parte aérea e na massa seca de raiz, bem como no acúmulo de nutrientes, observou-se efeito significativo somente para genótipo. O Cameroon apresentou médias superiores ao genótipo Roxo nos parâmetros analisados, com exceção do teor de proteína bruta na parte aérea. Xavier et al. (1998), Quesada (2005) e Morais et al. (2011) analisando o rendimento de biomassa de diferentes genótipos de capim-elefante cultivados sob solos de baixa fertilidade, também observaram valores de produção superiores para o genótipo Cameroon quando comparado com o Roxo. Os resultados de acúmulo de nitrogênio acompanharam o rendimento de biomassa, onde o genótipo Cameroon acumulou mais nitrogênio na parte aérea do que o Roxo.

De maneira geral, a inoculação de bactérias diazotróficas não beneficiou significativamente o rendimento de biomassa e o acúmulo de nutrientes na parte aérea, assim como o teor de proteína de plantas de capim-elefante nas condições testadas, havendo ainda, em alguns tratamentos influência negativa da inoculação. Didonet et al. (2000) e Sala et al. (2007) também observaram que na ausência de adubação nitrogenada a inoculação pode causar decréscimo na massa seca da parte aérea, em relação à testemunha. De acordo com Didonet et al. (2000), o menor acúmulo de massa seca pode ser em decorrência de um maior investimento das plantas em seu sistema radicular, em detrimento da parte aérea, provocado pela inoculação. Outra explicação seria a baixa contribuição de N₂ fixado biologicamente para algumas plantas não-leguminosas, e desta forma, na ausência de N esta associação pode representar um alto custo para a planta, uma vez que as bactérias são extremamente dependentes das fontes de carbono disponibilizadas pelas plantas (HALLMENN et al., 1997).

De fato, incrementos positivos que variaram de 7 a 50% na massa seca de raiz, em relação ao tratamento não inoculado foram observados para o genótipo Cameroon nos tratamentos inoculados com bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Enterobacter* e *Gluconacetobacter*. Dentre os tratamentos que apresentaram incrementos no sistema radicular do genótipo Cameroon, a inoculação com a estirpe JN125 de *A. brasilense*, LP343 de *G. diazotrophicus*, LG49 de *G. sacchari* mostraram incrementos de 30, 15 e 32% de N-total e 12, 9 e 18% de P-total na parte aérea, respectivamente. No genótipo Roxo, embora não tenha sido observado incrementos positivos na massa seca de raiz, incrementos menos expressivos nos teores de N-total foram detectados nos tratamentos de inoculação com as estirpes acima citadas, além de JM355 de *Klebsiella oxytoca*, LP479 de *Gluconacetobacter* sp e na mistura das 4 estirpes.

Diversos experimentos de inoculação com bactérias diazotróficas, entre elas *Azospirillum* spp, *Gluconacetobacter* spp e *Enterobacter* spp reportam o incremento na biomassa e no volume radicular, principalmente nas etapas iniciais de desenvolvimento (OKON e LABANDERA-GONZALEZ, 1994; MUÑOZ-ROJAS e CABALLERO-MELLADO, 2003; SHANKAR et al., 2011). No início dos estudos com associações entre plantas não-leguminosas e bactérias diazotróficas, acreditava-se que os benefícios obtidos eram essencialmente derivados da fixação biológica de N₂ (DOBBELAERE et al., 2003); No entanto, há estudos evidenciando que os efeitos positivos proporcionados por estes microrganismos são principalmente, derivados de alterações morfológicas e fisiológicas nas raízes das plantas inoculadas (OKON e VANDERLEYDEN, 1997). A promoção do crescimento das raízes, especialmente o aumento da densidade de pêlos radiculares nas zonas fisiologicamente ativas para absorção de nutrientes e água, poderia conduzir a uma melhor exploração do solo e também melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas (SUMAN et al., 2005; DOBBELAERE e OKON, 2007). Evidências mais recentes propõem que o aumento radicular e o conseqüente acúmulo de nutrientes por plantas inoculadas com

bactérias diazotróficas sejam devidos à produção de substâncias promotoras de crescimento pelas bactérias, como os fitoreguladores (DOBBELAERE e OKON, 2007). A habilidade de produzir fitoreguladores como ácido indol-acético (AIA), ácidos giberélicos (GAs) e citocininas tem sido detectada em aproximadamente 97% da maioria das bactérias diazotróficas associadas a plantas (BACA e ELMERICH, 2007). Vale ressaltar que o aumento excessivo na produção de biomassa total de raiz pode não ser desejável, uma vez que as raízes são importantes órgãos consumidores de assimilados (BOOGAARD et al., 1996).

Os teores de proteína (PB) foram estatisticamente superiores para o genótipo Roxo, com uma média de 4,7; enquanto o Cameroon apresentou uma média geral de 3,4. Surpreendentemente, o genótipo Cameroon foi o que acumulou mais nitrogênio, no entanto, apresentou menores teores de PB. Destes resultados podemos deduzir que a maior eficiência de utilização do N disponível, avaliada pelo teor de proteína bruta na parte aérea, não obedeceu a uma disponibilidade de N, e sim alguma característica do próprio genótipo. De acordo com Cabral et al. (2006) o teor de PB varia em função dos períodos seco e das águas, e é linearmente reduzido em função do avanço da idade de corte. Trabalhos relatam que o teor de proteína bruta do capim-elefante varia de 3,4 a 12,9, de acordo com a cultivar e a idade do corte (AVEIRO et al., 1991; GONÇALVES e COSTA, 1991; SANTOS, 1994). Normalmente, os teores máximos de proteína bruta são observados entre 30 e 45 dias após rebrota (SOARES et al., 2009). Provavelmente, os baixos teores de PB encontrados neste trabalho estão relacionados a baixa quantidade de matéria orgânica e N disponível no solo.

De maneira geral, a grande maioria dos estudos de inoculação em culturas agrícolas com bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento vegetal (BPCV) mostram que esta prática é de grande relevância tanto do ponto de vista econômico como ambiental. Entretanto, a inconsistência em trabalhos de inoculação com bactérias diazotróficas é bastante conhecida e variações no ambiente, solo ou substrato, genótipo e nos componentes da microflora naturalmente associada aos hospedeiros são consideradas como responsáveis por esta variação de respostas à inoculação entre diferentes experimentos (DOBBELAERE et al., 2003). Desta forma, considerando as contribuições da FBN encontradas entre os genótipos de Capim-elefante em diversos estudos através da análise de ^{15}N (QUESADA, 2005; MORAIS et al., 2009), novos estudos serão necessários para ajudar a elucidar os mecanismos de incremento de raízes, absorção de N e P e N fixado biologicamente devem ser realizados.

CAPÍTULO III

DIVERSIDADE MOLECULAR DE BACTÉRIAS TOTAIS E DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS ÀS PLANTAS DE CAPIM-ELEFANTE¹

¹Este capítulo foi desenvolvido no Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade de Groningen – Holanda, durante o Estágio de Doutorando no Exterior (Doutorado-sanduíche) realizado no período de maio a outubro de 2011.

RESUMO

Estudos prévios mostraram que poucas espécies bacterianas dominam a comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas com plantas de capim-elefante. Entretanto, esses resultados são baseados em métodos dependentes de cultivo; metodologia capaz de revelar informações limitadas sobre a comunidade microbiana. Neste estudo, a diversidade e estrutura das comunidades bacterianas totais e diazotróficas associadas com raiz e colmo de diferentes genótipos de capim-elefante foram investigadas. O DNA e mRNA totais foram extraídos das amostras de capim-elefante e as metodologias de DGGE e biblioteca foram usadas para analisar os genes 16S rRNA e *nifH* a fim de estudar a comunidade bacteriana total e diazotrófica, respectivamente. Em geral, as análises dos perfis de DGGE conduzidos diretamente de amostras de capim-elefante usando iniciadores para 16S rRNA e *nifH* indicaram que o tecido testado teve maior efeito na comunidade bacteriana quando comparado com o genótipo. As análises filogenéticas de clones derivados de 16S rRNA (586) e *nifH*-cDNA (186) mostraram que a diversidade dos gêneros bacterianos detectados em associação com tecidos de capim-elefante variaram em relação aos tecidos e genótipos. Baseado nas sequências de 16S rRNA ao gênero *Leptotrix* (12,8%) foi encontrado em maior número, seguido de *Burkholderia* (9%) e *Bradyrhizobium* (6,5%). Em relação aos transcritos de *nifH*, sequências pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* foi encontrado em todas as bibliotecas. Estes resultados sugerem que métodos independentes de cultivo podem fornecer novas percepções sobre a diversidade de espécies bacterianas predominantemente encontradas em associação com Capim-elefante. Além disso, podem ser de grande utilidade para estudos futuros de seleção de microrganismos que possam efetivamente contribuir com N derivado da FBN e outras características de promoção de crescimento vegetal.

ABSTRACT

Previous studies have shown that few bacterial species dominate the nitrogen-fixing community associated with elephant grass. However, these results were based on methods that require cultivation of the bacteria; an approach that introduces bias due to an incomplete assessment of microbial community structure. In this study, the diversity and the community structure of total and diazotrophic bacterial associated with root and stem of different genotypes of elephant grass were investigated. Total DNA and RNA were extracted from elephant grass samples and DGGE and clone libraries were used to analyze 16S rRNA and *nifH* in order to study the total and diazotrophic bacterial community, respectively. Overall, the patterns based on DNA- and RNA-derived DGGE-profiles differed, especially within tissue samples. The phylogenetic analyses of RNA-derived sequences of 16S rRNA (586) and *nifH* (186) clones showed that the diversity and types of organisms that comprise the microbial community varied among tissues and genotypes. Based on 16S rRNA sequences the clone libraries were dominated by members of *Leptotrix* (12.8%), followed by *Burkholderia* (9%) and *Bradyrhizobium* (6.5%). Among the active diazotrophic species present in the samples, the genus *Bradyrhizobium* appeared in all clone libraries. These results suggest that cultivation-independent methods can provide new insights into the diversity of bacterial species predominantly found in association with elephant grass. Furthermore, these results can be very useful for future studies focus on selection of potential microorganisms that can effectively contribute to N derived from BNF and other features to promote plant growth.

1 INTRODUÇÃO

O estudo da diversidade das comunidades microbianas associadas com plantas de interesse agrícola, especialmente as Poáceas, tem sido baseado em técnicas de cultivo e subsequente estudos de fisiologia, morfologia e bioquímica de organismos cultiváveis (ALBINO et al., 2006; VIDEIRA et al., 2009). No entanto, o avanço da ciência têm mostrado que o cultivo de microrganismos associados a estas plantas tem fornecido informações limitadas sobre a diversidade e a riqueza dos microrganismos presentes nestes ambientes (ANDO et al., 2005; BURBANO et al., 2011; FISHER et al., 2011), principalmente pelo fato de que grande parte dos organismos existentes pode ser recalcitrante para isolamento por meio de técnicas de cultivo convencionais (AMAN et al., 1995; PACE, 1997; HUREK et al., 2002).

Diante destes fatos, os microbiologistas chegaram ao consenso de que a chave para prever a diversidade microbiana é associar técnicas clássicas de cultivo a métodos independentes de cultivo, como as análises metagenômicas (CURTIS e SLOAN, 2005). Estas análises são baseadas em ácidos nucleicos – DNA ou RNA – diretamente extraídos do ambiente e tem sido de grande utilidade para os estudos de comunidades bacterianas complexas (CHELIUS e TRIPLETT, 2001; KEMBEL et al., 2011). Embora as análises moleculares sejam consideradas revolucionárias para o conhecimento das comunidades e da diversidade microbiana, utilizadas para complementar e suprir as limitações dos métodos dependentes de cultivo, estão sujeitas a erros que devem ser levados em consideração no momento das análises dos dados (OSBORNE et al., 2005).

A aplicação de análises genômicas de comunidades microbianas associadas às plantas tem permitido a identificação de microrganismos previamente desconhecidos, e expandido o conhecimento sobre a funcionalidade de grupos microbianos presentes nestes ambientes (ANDO et al., 2005; DEBROAS et al., 2009; BURKE et al., 2011). Normalmente, a comunidade bacteriana total é identificada pela análise de fragmentos do gene 16S rRNA através de diferentes metodologias (MUYZER et al., 1993; TRINGE e HUGENHOLTZ, 2008; ZILLI et al., 2008; KNUPP et al., 2009). Entretanto, a viabilidade (e conseqüentemente a funcionalidade) dos organismos detectados através desse gene não pode ser determinada, já que as moléculas de DNA persistem no ambiente após a morte das células como DNA extracelular (COOLEN e OVERMANN, 1998).

Em contraste, moléculas de rRNA são bastante sensíveis e o número de ribossomos tem sido correlacionado positivamente com taxas de crescimento e atividade celular bacteriana (WAGNER, 1994); desta forma, os dados obtidos a partir de amostras de rRNA podem refletir a diversidade de membros metabolicamente ativos na comunidade microbiana estudada. A grande maioria destas análises têm sido reportada para amostras de solo, rizosfera, filosfera e esponjas (LILLIS et al., 2009; MENGONI et al., 2005; NICOL et al., 2003; YANG et al., 2001; KAMKE et al., 2010); e a comparação dos resultados obtidos com as diferentes metodologias baseadas em 16S rDNA e 16S rRNA mostram variabilidade entre a composição das comunidades microbianas.

Genes ribossomais (SSU-rRNA) apesar de muito poderosos na classificação taxonômica, não são considerados bons indicadores da filogenia funcional, e por isso, a aplicação das metodologias para investigações de comunidades bacterianas metabolicamente ativas associadas a tecidos vegetais são normalmente avaliadas através de mRNA (cDNA). Geralmente, nos estudos de interação planta-bactéria, os grupos funcionais mais estudados estão relacionados a processos biológicos como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (HUREK et al., 2002; FISHER et al., 2011; BURBANO et al., 2011).

Desde o início dos estudos com plantas da família *Poaceae*, a comunidade bacteriana fixadora de nitrogênio tem sido identificada basicamente através de métodos clássicos de cultivo. Mais recentemente, a fim de gerar informações mais completas sobre a estrutura e atividade desta comunidade de bactérias *in situ*, análises independentes de cultivo baseadas em sequências do gene *nifH* têm sido amplamente exploradas (LOVELL et al., 2008; DEMBLA DIALLO et al., 2008; ORR et al., 2011; FISHER et al., 2011). Este gene – bem como seus homólogos *anfH* ou *vnfH* - é responsável pela codificação de Fe-proteínas do complexo nitrogenase, o qual cataliza a transformação do nitrogênio atmosférico em uma forma de nitrogênio disponível (NUNES et al., 2003). O gene *nifH* foi estabelecido pela comunidade científica como marcador para o monitoramento do processo de FBN nos mais diversos ambientes, inclusive em tecidos vegetais (ZEHR e McREYNOLD, 1989; UEDA et al., 1995; POLY et al., 2001; HUREK e REINHOLD-HUREK, 2011; SOARES et al., 2006; BURBANO et al., 2011).

Entretanto, enquanto a amplificação dos genes *nifH* a partir de amostras de DNA revelam simplesmente a presença de genes da nitrogenase e a diversidade das bactérias diazotróficas nos ambientes, estudos sobre a expressão de *nifH*-cDNA (RT-PCR) têm avaliado a atividade *in situ* de microrganismos predominantes e identificado aqueles que efetivamente estão contribuindo com a FBN (HUREK e REINHOLD-HUREK, 2011; LOVELL et al., 2008; DEMBLA DIALLO et al., 2008; BURBANO et al., 2011; FISHER et al., 2011).

Dentre as principais ferramentas moleculares utilizadas para as análises metagenômicas - tanto para avaliação de comunidades totais (16S rRNA) ou grupos específicos (*nifH*) - incluem a construção de bibliotecas de clones e eletroforese em gel com gradiente desnaturante/temperatura (DGGE/TGGE). A técnica de DGGE é um *fingerprint* genético que analisa a estrutura da comunidade bacteriana quantitativa e qualitativamente, e embora seja considerada uma técnica rápida, pouco onerosa e que possibilita a análise de grande número de amostras, não identifica taxonomicamente a comunidade bacteriana presente (MUYZER e SMALLA, 1998; PICENO et al., 1999; LOVELL et al., 2008).

Para obter informações mais detalhadas sobre a identidade dos principais grupos presentes nas amostras, a técnica de construção de bibliotecas vêm sendo empregada por muitos autores (SOARES et al., 2006; ZEHR et al., 2007; FISHER et al., 2011). A partir de sequências de clones individualizados contendo o gene de interesse (amplificado de DNA ou cDNA), é possível inferir sobre a taxonomia dos grupos bacterianos presentes, além disso o conjunto de dados gerados por esta técnica também permite determinar a abundância relativa dos grupos predominantes através da identificação das unidades taxômicas operacionais (UTOs) (KEMBEL et al., 2011). Embora seja uma metodologia de grande utilidade nos estudos de ecologia microbiana, é considerada relativamente trabalhosa e com elevado custo.

O emprego deste conjunto de técnicas tem sido aplicado para estudos da comunidade de bactérias totais e diazotróficas associada a diferentes espécies de poáceas como kallar grass (*Leptochloa fusca*), milho, arroz, cana-de-açúcar, vetiver (*Chrysopogon zizanioides*), entre outras (CHELIUS e TRIPLETT, 2001; HUREK et al., 2002; ROESCH et al., 2008; DEMBLA DIALLO et al., 2008; PRAKAMHANG et al., 2009; HARDOIM et al., 2011; ANDO et al., 2005; BURBANO et al., 2011; VOLLÚ et al., 2011). Os resultados destas pesquisas mostram a existência de uma grande diversidade de gêneros e/ou espécies não detectados anteriormente por métodos clássicos de cultivo como *Rhizobium* spp, *Bradyrhizobium* spp, *Enterobacter* spp, *Azorhizobium* spp associadas as poáceas.

Para plantas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*), os resultados sobre a população de bactérias diazotróficas associada a estas plantas são baseados em métodos tradicionais de cultivo e imunológicos (KIRCHHOF et al., 1997; REIS et al., 2000; 2001). Até o momento, não existem relatos na literatura da utilização destas técnicas independentes

de cultivo para análise das comunidades bacterianas totais e/ou diazotróficas, ativas ou não, associadas aos tecidos vegetais de capim-elefante.

Considerando os resultados obtidos nos capítulos anteriores, onde representantes de bactérias diazotróficas isoladas de plantas de capim-elefante não mostraram respostas significativas quando reinoculadas, acredita-se que a comunidade bacteriana predominantemente ativa nos tecidos seja diferente daquela obtida por métodos de cultivo. Desta forma, os objetivos deste capítulo foram (i) acessar a estrutura da comunidade bacteriana total e diazotrófica associada à raiz e colmo de diferentes genótipos de capim-elefante usando PCR-DGGE baseado em amostras de DNA e RNA, bem como (ii) identificar os principais grupos bacterianos metabolicamente ativos (16S rRNA e *nifH*-cDNA) nos tecidos vegetais através da construção de bibliotecas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

Para as análises da diversidade molecular das bactérias associadas às plantas de capim-elefante, foram utilizadas cinco cultivares incluindo Cameroon, Gramafante, BAG 02, Roxo e CNPGL91F06-3. Estas plantas foram selecionadas baseando-se em resultados preliminares de produção de biomassa e acúmulo de N derivado da FBN durante o cultivo em solos com baixa fertilidade e sem adição de N (MORAIS et al., 2009). As amostras foram coletadas no campo experimental da Embrapa Agrobiologia localizado em Seropédica - RJ. O solo foi fertilizado no plantio com a aplicação de 100 kg ha⁻¹ K (cloreto de potássio), 80 kg ha⁻¹ P (superfosfato simples) e 60 kg ha⁻¹ FTEBR12. Os genótipos foram plantados em outubro de 2009 e a amostragem realizada em março de 2011, três meses após o segundo corte feito em dezembro de 2010. Três plantas de cada genótipo foram coletadas e divididas em colmo (terço médio) e raiz. As amostras de raiz foram lavadas abundantemente com água corrente para remover o excesso de terra e em seguida lavadas com água destilada; o colmo foi desinfestado superficialmente com álcool 70% e descascado. Ambos os tecidos (colmo e raiz) foram congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenados sob temperatura de - 80°C. Para as extrações de ácidos nucleicos, amostras de 5 gramas de tecido de raiz e colmo, foram maceradas na presença de nitrogênio líquido, utilizando-se almofariz e pistilo, até a obtenção de pó fino. As extrações foram feitas separadamente para os 5 genótipos com três replicatas.

2.2 Extração de DNA Total

O DNA genômico total dos tecidos vegetais foi extraído utilizando-se a metodologia descrita por Chen e Ronald (1999) com tampão CTAB (2% w/v CTAB, 1,42 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl pH 8,0, 2% m/v PVP 40, 5 mM ácido ascórbico, 4,0 mM DIECA). Em um microtubo de 2 mL adicionou-se 0,25 g de tecido pulverizado e 700 µL do tampão de extração CTAB pré-aquecido a 65°C. As amostras foram misturadas por inversão suave e incubadas a 65°C por 5 min. Em seguida, 820 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) foram misturados às amostras até formar uma emulsão e os tubos centrifugados a 12.000 × g por 10 min a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo juntamente com 850 µL de isopropanol 100% (0,7 volumes da fase aquosa). As amostras foram homogeneizadas por inversão de 6 a 8 vezes, incubadas sob temperatura de - 20°C por um período de 16 horas e em seguida centrifugadas a 12.000 × g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 70% foram adicionados ao microtubo repetindo-se então a etapa de centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos mantidos a temperatura ambiente até secagem completa. Os ácidos nucleicos foram eluídos em 50 µL de água ultra-pura, incubados a 4 °C por uma hora e armazenados a - 20°C.

2.3 Extração de RNA Total e Síntese de cDNA

O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo do reagente de TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Em um microtubo de 2 mL adicionou-se 0,25 g de tecido pulverizado e, sob capela de fluxo laminar, foram adicionados 700 µL do reagente de TRIzol a 4°C. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 5 min e em seguida, foram acrescentados 140 µL de clorofórmio gelado. As amostras foram homogeneizadas em vórtex, mantidas à temperatura ambiente por 3 min e centrifugadas por 15 min a 12.000 × g a temperatura de 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 350 µL de isopropanol gelado e a mistura foi mantida a temperatura ambiente por 10 min. Após este

período as amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$ por 10 min a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado foram adicionados $700\mu\text{L}$ de etanol 75% (v/v) gelado, e em seguida os microtubos foram centrifugados em $9.800 \times g$ por 5 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos a temperatura ambiente por 15 min. Os ácidos nucleicos foram eluídos em $30\mu\text{L}$ de água ultra-pura tratada com DEPC e RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, USA). O RNA total foi tratado com PolyATtract[®] mRNA Isolation Systems (Promega, Madison, USA) a fim de enriquecer as amostras com mRNA bacteriano. Uma nova extração com fenol:chlorofórmio:álcool isolamílico (25:24:1) foi realizada nas amostras enriquecidas de mRNA bacteriano. Contaminação das amostras de RNA total com DNA co-extraído foi excluída pela reação de PCR para o gene 16S rDNA usando os iniciadores universais 799F e 1492R (CHELIUS e TRIPLETT, 2001).

Cinco microgramas de RNA total foram usadas para a reação de transcriptase reversa (RT-PCR) usando o sistema SuperScript III First Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A primeira fita do cDNA foi sintetizada, separadamente, com $0,2\mu\text{M}$ do iniciador específico para o gene *nifH* - PolR (POLY et al., 2001) e $0,2\mu\text{M}$ de iniciadores randômicos (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

A fim de manter a integridade das amostras de DNA e cDNA, as mesmas foram submetidas ao *Speed-vac* sob temperatura de 45°C até a completa secagem. O material foi transportado para o Laboratório de Ecologia Microbiana da Universidade de Groningen – Holanda, sob temperatura ambiente e ressuspenso em água ultra-pura.

2.4 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

Os produtos de amplificação por PCR dos genes 16S e *nifH* a partir de tecidos vegetais foram analisados através de um sistema de eletroforese com gradiente de concentração de agente de desnaturação. A eletroforese foi realizada no sistema PhorU-2 apparatus (Ingeny, Goes, Holanda) sob voltagem de 100 V e sob temperatura constante de 60°C em tampão TAE 0,5 X durante 16 horas. Ao final, o gel foi corado com uma solução de SYBR Gold (Molecular Probes, Holanda) durante 1 hora e visualizado ImageMaster VDS system (Amersham Biosciences). Todos os perfis de PCR-DGGE foram analisados no GELCOMP II v 4.06 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) com base no coeficiente de Dice. A intensidade e posição das bandas foram usadas para construção de uma matriz de similaridade que foi utilizada na análise com os programas Primer6 (*Plymouth Routines In Multivariate Ecological Research*) e canoco (versão 4.52, Wageningen, Holanda).

2.4.1 Gene 16S rRNA

A amplificação de fragmentos do gene 16S rRNA foi realizada utilizando-se a técnica de *nested*-PCR conforme descrito por Hardoim et al. (2011). Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de $25\mu\text{L}$ contendo 25 ng DNA e cDNA, separadamente; tampão 1X; 0,2 mM de dNTP; 2,5 mM MgCl_2 ; $0,5\text{ mg mL}^{-1}$ de BSA (*Bovine Serum Albumin*); 1 U BIOTAQ[™] DNA polimerase (Bioline, Londres, Reino Unido) e $0,25\mu\text{M}$ dos iniciadores 799F (CHELIUS e TRIPLETT, 2001) e 1492R (LANE, 1991). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Mastercycler[®] gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), programado para realizar uma desnaturação inicial de 95°C por 3 min seguido de 30 ciclos de 94°C por 20 seg., 53°C por 40 seg., 72°C por 40 seg., e uma extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram separados em eletroforese em gel de agarose 1% e o fragmento correspondente ao gene 16S rRNA bacteriano (~735 pb) foi excisado do gel e purificado com Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA). Para a segunda amplificação utilizou-se os iniciadores 968F-GC (Muyzer e Smalla, 1998) e 1401R-1b (Brons e Van Elsas, 2008) para amplificar as regiões V6–V8 do 16S rDNA bacteriano. A reação foi realizada em um volume final de $50\mu\text{L}$ contendo $0,25\mu\text{M}$

de cada iniciador, 1 μL do produto purificado da primeira reação; tampão 1X; 0,2 mM de dNTP; 2,5 mM MgCl_2 ; 0,5 mg mL^{-1} de BSA e 1 U BIOTAQ™ DNA polimerase (Bioline, Londres, reino Unido). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador programado para uma PCR tipo *TouchDown* com desnaturação inicial a 95°C por 5 min seguido de 10 ciclos de 94°C por 30 seg., 60°C (com diminuição de 0,5°C a cada ciclo) por 30 seg., 72°C por 45 seg. e 15 ciclos de 94°C por 30 seg., 55°C por 30 seg., 72°C por 45 seg com uma extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1% e cerca de 300 ng de cada amostra foram utilizados para o DGGE com um gradiente de 30 a 55% de solução desnaturante (100 % desnaturante sendo 7 M de uréia em 40 % (v/v) de formamida deionizada).

2.4.2 Gene *nifH*

A amplificação do gene *nifH* foi conduzida usando a técnica de *nested*-PCR conforme descrito por Pereira e Silva et al. (2011). Cada reação de amplificação foi feita em um volume final de 25 μL contendo 25 ng DNA e cDNA, separadamente; tampão 1X (contendo MgCl_2); 0,2 mM de dNTP; 0,04 mg mL^{-1} de BSA; 1 U Taq DNA polimerase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) e 0,5 μM dos iniciadores FGPH19 e PolR. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 1 min, 72°C por 2 min, e uma extensão final de 72°C por 30 min. A segunda reação foi realizada em um volume final de 50 μL contendo 0,5 μM dos iniciadores PolF e AQER (Poly et al., 2001a); 1 μL do produto da primeira reação; e os mesmos componentes e condições de termociclagem da reação inicial. Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 1% e cerca de 300 ng de cada amostra foram utilizados para o DGGE em um gradiente de 40 a 65 % (100 % desnaturante sendo 7M de uréia em 40 % [v/v] de formamida deionizada).

2.5 Construções das Bibliotecas Gênicas

Três genótipos foram escolhidos para a construção das bibliotecas gênicas de 16S rRNA e *nifH*-cDNA: Cameroon, CNPGL91F06-3 e Roxo. A seleção dos genótipos foi baseada nos perfis de 16S rRNA-DGGE, onde os genótipos Cameroon e CNPGL91F06-3 mostraram maior dissimilaridade entre si, e o genótipo Roxo revelou um perfil intermediário. As bibliotecas foram feitas usando RT-*nested*-PCR de amostras de raiz e colmo dos 3 genótipos. As condições de PCR para amplificação dos genes 16S rRNA e *nifH* foram as mesmas descritas para o DGGE (2.4.1 e 2.4.2, respectivamente). As reações foram feitas em triplicada para cada amostra de cDNA, e cada biblioteca foi construída com uma amostra composta das três repetições de cada amostra. Para cada biblioteca foram sequenciados 110 clones contendo o gene 16S rRNA e 32 contendo o gene *nifH*, totalizando 6 bibliotecas para cada gene (3 genótipos x 2 tecidos).

2.5.1 Clonagem, transformação e seleção

Os fragmentos dos genes 16S rRNA e *nifH* obtidos da PCR foram purificados com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) e a clonagem foi realizada utilizando-se o kit comercial pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, USA). Cada reação de ligação foi realizada em um volume final de 10 μL contendo 50 ng de vetor pGEM-T; ~150 ng de produto de PCR purificado; 3 U de T4 DNA ligase; e tampão de reação 10X (60 mM de Tris-HCl pH 7,8, 20 mM de MgCl_2 , 20 mM de DTT, 2 mM de ATP, 10% polietileno glicol). O sistema de ligação foi incubado durante a noite sob temperatura de 4°C. A eficiência da ligação foi avaliada por reação de PCR usando os iniciadores M13F (5'-GTA AAA CGA CGG CCAG-3') e M13R (5'-CAG GAA ACA GCT AT AC-3'). Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 μL contendo 1 μL da ligação; 1 μM de cada iniciador; tampão 1X; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,2 mM de dNTP e 1 U BIOTAQ™

DNA polimerase (Bioline, Londres, Reino Unido). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 50°C por 30 seg., 72°C por 45 seg., e uma extensão final de 72°C por 10 min. A eficiência da ligação foi determinada pela qualidade e quantidade dos produtos da PCR observados em gel de agarose 1%.

Os plasmídeos recombinantes foram inseridos em células competentes comerciais - *E. coli* JM109 de alta eficiência (Promega, Madison, USA). Para cada biblioteca, realizou-se o processo de transformação com 2 µL da ligação (vetor + gene de interesse) e 50 µL de células competentes. Incubaram-se as células por 20 min no gelo, 47 seg em banho-maria a 42°C e em seguida, as mesmas foram mantidas no gelo por no mínimo 2 min. As células foram transferidas, juntamente com 950 µL de meio de cultura LB, para um tubo tipo Falcon de 15 mL e incubadas por 1 hora a 37°C com agitação de 160 rpm. Em seguida, 100 µL da suspensão bacteriana foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 0,5 mM de IPT e 0,1 T/mL de X-Gal e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas.

As colônias contendo o plasmídeo com o inserto foram identificadas através da coloração branca nas placas contendo meio LB. Essas colônias foram coletadas com palitos estéreis e depositadas em microplacas de 96 poços, contendo 50 µL de água ultra-pura estéril. Para a confirmação da presença do inserto nos clones, foi feita uma reação de PCR de colônia utilizando-se os iniciadores M13F e M13R. Cada reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 1 µL da suspensão bacteriana; 1 µM de cada iniciador; tampão 1X; 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM de dNTP e 1 U BIOTAQ™ DNA polimerase (Bioline, Londres, Reino Unido). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial de 94°C por 5 min seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg., 50°C por 30 seg., 72°C por 45 seg., e uma extensão final de 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% e as amostras contendo o inserto de tamanho esperado foram enviadas para LGC Genomics GmbH (Berlim, Alemanha) e sequenciadas com o iniciador M13F usando um Applied Biosystems 3730XL.

2.5.2 Estatística e análises filogenéticas

Todas as sequências obtidas foram editadas manualmente e submetidas ao programa *Ribosomal Database Project* (RDP) e RDP FunGene Pipeline (COLE et al., 2009) para detectar possíveis quimeras e/ou sequências de baixa qualidade. As sequências de boa qualidade foram submetidas ao programa MOTHUR (SCHOLSS et al., 2009) para definir as Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs), assim como os índices de riqueza (Chao1) e diversidade de Shannon. A curva de rarefação foi produzida pela plotagem do número de UTOs, observadas contra o número de clones sequenciados. Análises no UniFrac, que levam em consideração as informações filogenéticas, foram utilizadas para comparação da composição entre as bibliotecas. Para esta análise, todas as sequências de 16S rRNA e *nifH*, separadamente, foram combinadas em uma árvore Neighbor-Joining (kimura-2 parameter) usando o programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011). O bootstrap de 1.000 repetições foi utilizado para representar a história evolucionária dos grupos analisados.

O RDP *Classifier* (WANG et al., 2007) foi usado para identificar as sequências de 16S rRNA em nível de filo e classe com níveis de confiabilidade de 90%. As relações filogenéticas da comunidade bacteriana foram determinadas pela comparação individual das sequências de 16S rRNA com o banco de dados do RDP *Sequence Match* (COLE et al., 2009). As afiliações filogenéticas da comunidade de bactérias diazotróficas – *nifH* cDNA – foram obtidas usando o NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

3 RESULTADOS

3.1 Análise de PCR-DGGE de Comunidades Bacterianas

A amplificação do gene 16S rDNA com o primeiro par de iniciadores – 799f e 1492r – gerou dois fragmentos distintos para ambas amostras de DNA e cDNA, conforme esperado. Todas as amostras, de raiz e colmo, produziram um produto de PCR e RT-PCR de tamanho esperado (~ 450 pb) usando os iniciadores – 968-GC e 1401-1b. Perfis reprodutíveis de DGGE foram gerados para 16S rDNA e rRNA de raízes e colmo dos diferentes genótipos (Figura 1). As amostras de raiz derivadas de DNA produziram entre 25 e 40 bandas detectáveis em um gradiente de 35-60% denaturante; as amostras de colmo produziram cerca de 20 fragmentos visíveis por amostra (Figura 1a). Já nos perfis de DGGE derivados de RT-PCR foram encontrados entre 15 e 25 bandas com intensidades distintas (Figura 1b). As análises multivariadas dos perfis de DGGE foram realizadas levando-se em conta a presença, ausência e a intensidade relativa das bandas. Esta análise mostrou que os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) foram suficientes para explicar 59,2% da variância entre a estrutura da comunidade de bactérias totais (Figura 2a). O primeiro eixo revelou que a separação das amostras de 16S rDNA foi fortemente influenciada pelo tecido vegetal. O segundo eixo distinguiu claramente os padrões de DGGE em relação aos ácidos nucleicos. A análise de similaridade (ANOSIM) revelou que a localização das bactérias nos tecidos da planta explicou 66,6 e 36,7% da variação da comunidade de bactérias diazotróficas nas amostras de 16S rDNA e rRNA, respectivamente (Tabela 1). O efeito de genótipo na estrutura da comunidade foi detectado somente para as amostras derivadas de RNA.

3.2 Análise de PCR-DGGE da Comunidade Diazotrófica

Produtos de tamanho esperado (~360 pb) foram obtidos de todas as amostras e a comunidade de bactérias diazotróficas associada a raízes e colmo de 5 genótipos de Capim-elefante foi acessada pela técnica de DGGE. Os perfis foram reprodutíveis somente entre repetições de amostras de *nifH*-DNA de raízes, os quais apresentaram uma média de 12 bandas visíveis de intensidade similar (Figura 3a). As amostras de *nifH*-DNA obtidas de colmo, bem como as de *nifH*-cDNA para ambos os tecidos, mostraram grande variabilidade dos perfis entre as repetições utilizadas. Estes padrões consistiram de poucas bandas com elevada intensidade e algumas bandas com menor intensidade, sugerindo comunidade menos complexa (Figura 3).

A análise multivariada mostrou que os dois primeiros componentes principais explicaram somente 37% da variância entre as comunidades de bactérias diazotróficas (Figura 2b). Em geral, a análise de componentes principais (PCA) mostrou que as maiores diferenças na estrutura da comunidade foram associadas com os ácidos nucleicos, DNA ou cDNA. Analisando separadamente cada uma destas amostras, efeitos significativos foram observados para genótipo e tecido. Mais especificamente, para a comunidade baseada no *nifH*-DNA, uma maior porcentagem da variação pode ser explicada pelo tecido (raiz e colmo, 35,8%) em relação ao genótipo. De maneira contrária, a comunidade obtida de *nifH*-cDNA foi mais influenciada pelo genótipo do que pelo tecido (36,8 e 15,7% de variação, respectivamente) (Tabela 1).

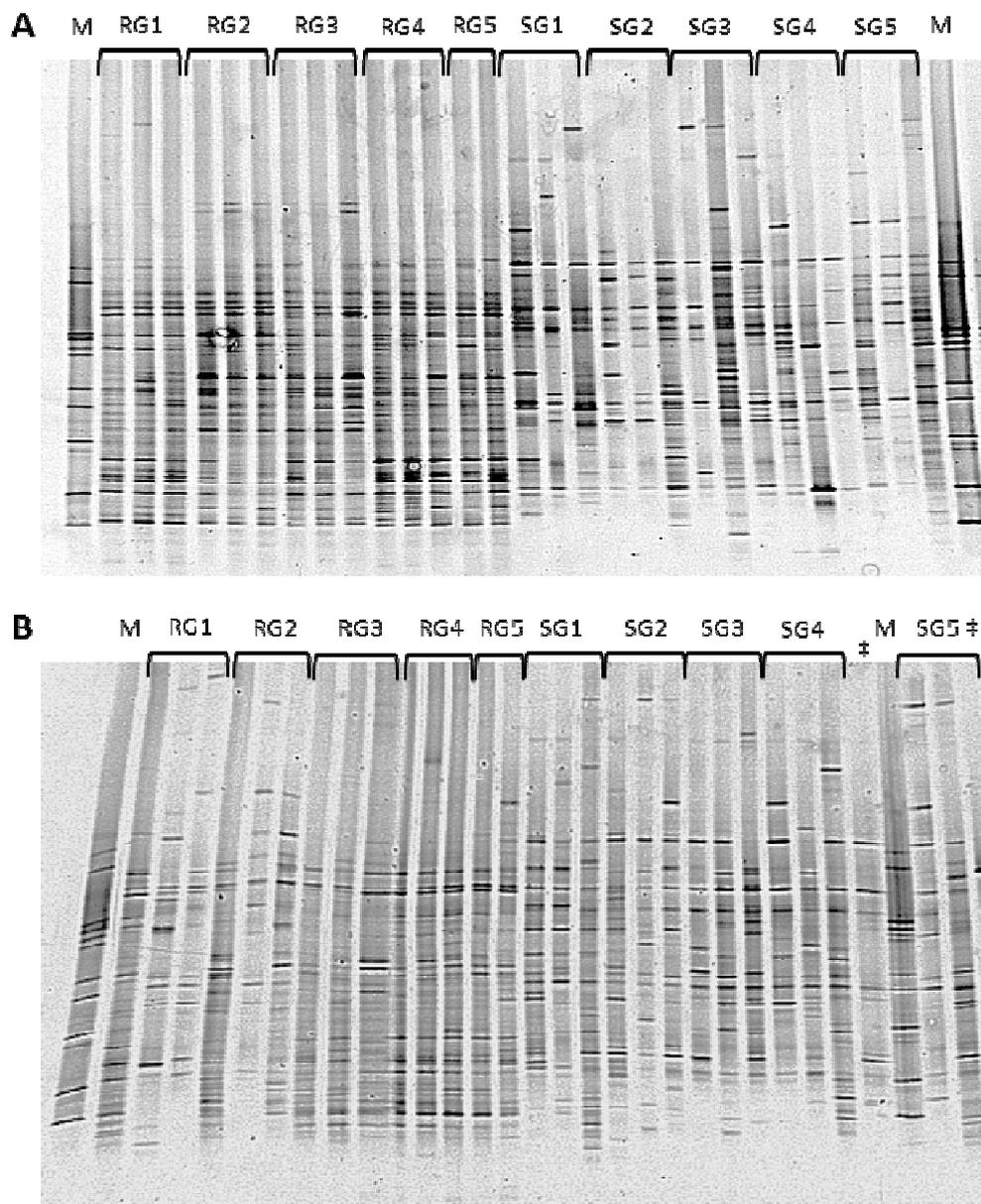


Figura 1 Eletroforese em gel de gradiente desnaturalante (DGGE) de fragmentos de 16S rDNA (A) e 16S rRNA (B) associados com raiz e caule de cinco genótipos de capim-elefante. As amostras incluídas nesta figura representam: raiz (R) e caule (S) do genótipo Cameroon (G1), Gramafante (G2); BAG02 (G3), Roxo (G4), CNPGL91F06-3 (G5); M Marcador. ‡ representa uma repetição da amostra SG5.

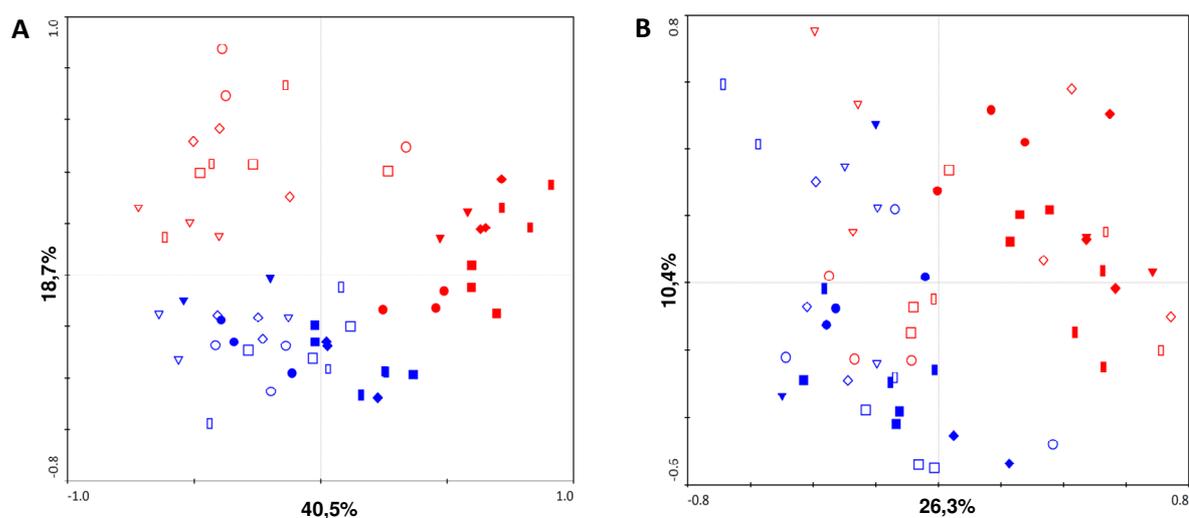


Figura 2 Análise de componentes principais (PCA) dos genes 16S rRNA (A) e *nifH* (B) associados com raízes e colmo de 5 genótipos de capim-elefante. Perfis de DGGE foram utilizados para construir uma matriz de similaridade para análise PCA. Cada amostra foi codificada de acordo com cores e formas dos símbolos: vermelho; fragmentos de DNA; azul: fragmentos de cDNA; símbolos cheios, amostras de raiz; símbolos vazios, amostras de colmo; círculos, genótipo Cameroon; quadrados, Gramafante; losango, BAG 02; retângulo, Roxo; triângulo, CNPGL91F06-3.

Tabela 1 Comparação das comunidades bacterianas acessadas por perfis de DGGE, baseada nos genes 16S rRNA e *nifH* e analisada pelo programa ANOSIM.

Amostras	16S rRNA		<i>nifH</i>	
	Genótipo	Tecido	Genótipo	Tecido
DNA	0,070 ^{§NS}	0,666***	0,216***	0,358***
cDNA	0,314***	0,367***	0,368***	0,157**

Abreviações: ANOSIM, Análise de similaridade; §, valor de R global; NS, não significativo; Nível de significância: *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

3.3 Bibliotecas Gênicas

Para as bibliotecas do gene 16 rRNA (derivado de RT-PCR) um total de 660 clones foram sequenciados, destes 71 foram removidas das análises por representarem sequências de baixa qualidade ou quimeras. Do total de 597 sequências restantes, 295 foram obtidas de raiz e 302 de colmo. Informações detalhadas da estatística das bibliotecas de raiz e colmo de capim-elefante estão resumidas na Tabela 2. De maneira geral, as análises do Mothur baseadas em 597 sequências bacterianas revelaram um total de 174 UTOs com 97% de identidade das sequências. O número de UTOs com uma única sequência foi 107. O número de UTOs observado individualmente em cada biblioteca variou de 33 a 42 (Tabela 2). Ambos os índices de Chao1 e Shannon indicaram níveis mais elevados de riqueza e diversidade, respectivamente, em amostras de raiz e colmo dos genótipos Cameroon (G1) e CNPGL91F06-3 (G5) quando comparados com o Roxo (G4) (Tabela 2). As curvas de rarefação baseadas em 16S rRNA não alcançaram a assíntota, indicando amostragem insuficiente de clones para capturar a diversidade total da comunidade bacteriana presente nos tecidos vegetais (Figura 4a).

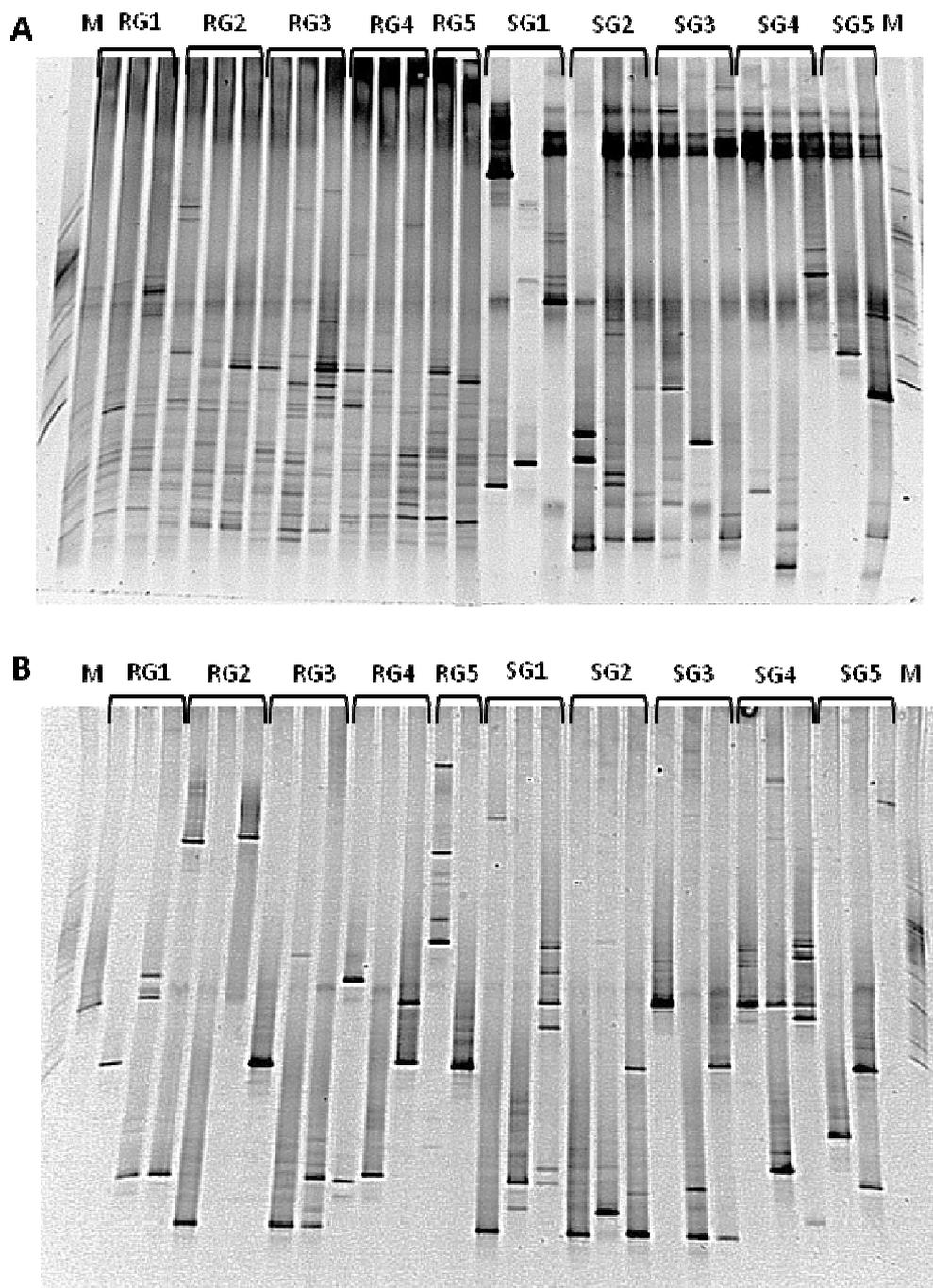


Figura 3 Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) de fragmentos do gene *nifH* derivados de DNA (A) e cDNA (B) associados com raiz e caule de cinco genótipos de capim-elefante. Três repetições foram usadas por amostra. As amostras incluídas nesta figura representam: raiz (R) e caule (S) dos genótipos Cameroon (G1), Gramafante (G2); BAG 02 (G3), Roxo (G4), CNPGL91F06-3 (G5); M, Marcador.

Tabela 2 Análise estatística das bibliotecas dos genes 16S rRNA e *nifH* baseadas em amostras de cDNA de raiz e colmo de 3 genótipos de capim-elefante.

Amostr as	16S rRNA				<i>nifH</i>			
	Num. de sequências	N. de UTOs*	Ind. Chao1	Ind. Shannon	Num. de sequências	N. de UTOs*	Ind. Chao1	Ind. Shannon
RG1	110	42	64,09	3,15	30	11	12,0	2,25
RG4	96	36	52,00	3,22	29	8	8,3	1,81
RG5	89	38	71,00	3,18	29	8	18,0	1,46
SG1	103	41	68,63	3,12	26	7	7,5	1,67
SG4	107	33	63,66	2,83	27	10	13,0	1,80
SG5	93	35	85,60	2,99	22	12	21,3	1,80
Raiz	295	93	192,00	3,88	88	25	31,0	2,70
Colmo	302	79	146,56	3,38	75	28	48,0	2,87

*UTOs definidas a 97% de identidade das sequências. ** UTOs definidas a 99% de identidade das sequências. Abreviações: UTOs, unidades taxonômicas operacionais; R, raiz; S, colmo; G1, Cameroon; G4, Roxo; G5, CNPGL

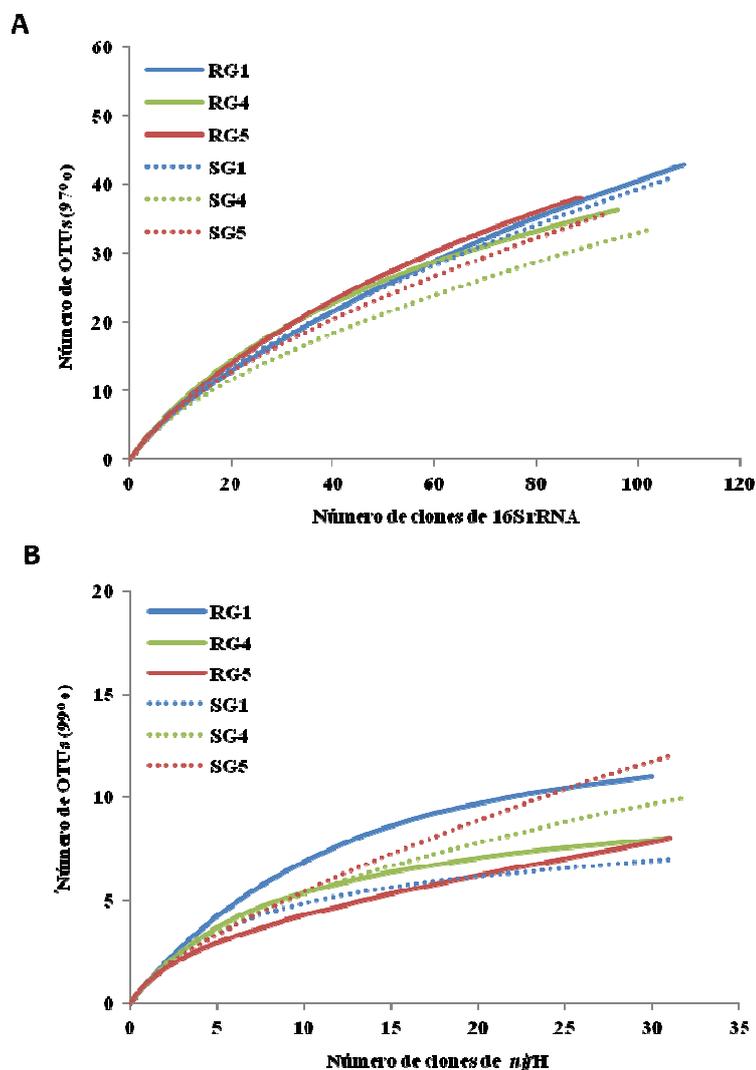


Figura 4 Curvas de rarefação das bibliotecas referentes aos genes 16S rRNA (A) e *nifH* (B) com o número de UTOs detectados vs o número de sequências amostradas em cada amostra. As abreviações na figura representam: raiz (R), colmo (S), genótipo Cameroon (G1), Roxo (G4) e CNPGL91F06-3 (G5).

Considerando todos os genótipos, a comunidade bacteriana associada com raízes foi mais diversas do que àquela obtida para o colmo (Figura 4a; Tabela 2). Diferenças qualitativas na comunidade bacteriana das diferentes amostras foram confirmadas pela análise de PCA no UniFrac (Bonferroni-corrected P -values <0.01), que leva em consideração as informações filogenéticas. Os resultados mostraram maior similaridade entre a comunidade de raízes e colmo dos genótipos Cameroon (G1) e CNPGL91F06-3 (G5) quando comparados ao Roxo (G4) (Figura 5a).

Quanto às bibliotecas de *nifH*-cDNA de tecidos de plantas de Capim-elefante, 186 sequências foram analisadas com o RDP FunGene Pipeline, e após processamento, 163 sequências foram obtidas. Um total de 25 e 28 UTOs, usando um *cutoff* de 99%, foram identificadas para raiz e colmo, respectivamente (Tabela 2). As análises de rarefação das bibliotecas de *nifH*-cDNA mostraram que enquanto as amostras RG1, RG4 e SG1 atingiram um nível considerável de saturação em números de UTOs, as curvas de RG5, SG4 e SG5 não alcançaram a assíntota (Figura 4b). Estes resultados indicam que o número de clones selecionados foi suficiente para revelar o número total de sequências presente nas bibliotecas de RG1, RG4 e SG1, mas não para as amostras RG5, SG4 e SG5 (Figura 4b). Em geral, as bibliotecas de *nifH* de todas as amostras apresentaram baixa diversidade.

A comunidade de *nifH* associada com colmo mostrou maior riqueza do que àquela associada com raízes, mas essas amostras não diferiram em termos de diversidade (Tabela 2). Os resultados de PCA no UniFrac revelaram que a composição da comunidade ativa de bactérias fixadoras de nitrogênio nos diferentes tecidos e nos genótipos de capim-elefante utilizados neste estudo é bastante variável (Figura 5b).

3.3.1 Análise das sequências baseadas no gene 16S rRNA

De acordo com a classificação do RDP as sequências de 16S rRNA obtidas puderam ser divididas em 9 filos bacterianos, 43 famílias e 85 gêneros usando a combinação das informações das 6 bibliotecas. Deste total, *Proteobacteria* (73,7%; 431 sequências) e *Actionbacteria* (16,4%; 96 sequências) foram os filos dominantes. Filos menos abundantes incluíram *Acidobacteria* (1,9%), *Firmicutes* (1,5%), *Deinococcus-Thermus* (1,4%), *Bacteriodes* (1,4%), TM7 (0,5%), *Cyanobacteria* (0,3%) e *Gematimonadetes* (0,2%). Cerca de 2,7% das sequências foram consideradas bactérias não-classificadas (Figura 6a). Dentre todos os clones analisados, 32 sequências foram encontradas apenas uma vez.

Em nível de classe, os grupos mais abundantes foram *Betaproteobacteria* (27,9%) e *Alphaproteobacteria* (23, 1%), que representaram 50% do total das sequências. O terceiro grupo mais abundante foi *Gamaproteobacteria* (12,5%), seguido por *Actinobacteridae* (10,4%), *Deltaproteobacteria* (6%) e *Rubrobacteridae* (5,1%). Vale a pena ressaltar que as sequências evidenciaram diferenças na composição bacteriana de raiz e colmo.

A maioria dos clones provenientes de amostras de raízes pertencem ao grupo *Gamaproteobacteria* (18,5%), seguido por *Alphaproteobacteria* (16,4%), *Actinobacteridae* e *Betaproteobacteria*, ambos com 16,1% (Figura 6b). Nas bibliotecas das amostras de colmo, o maior grupo encontrado foi *Betaproteobacteria* (39,1%), seguido por *Alphaproteobacteria* (29,4%) (Figura 6b). Em nível de gênero, informações detalhadas sobre as sequências obtidas, assim como sua ocorrência em cada biblioteca são apresentadas na Figura 7a. Analisando o conjunto de dados, sequências pertencentes ao gênero *Leptotrix* (12,8%) foram encontradas em maior número, seguido de *Burkholderia* (9%) e *Bradyrhizobium* (6,5%). Estes gêneros foram encontrados em todas as amostras, com exceção das amostras de raiz do genótipo Roxo (G4) (Figura 7a).

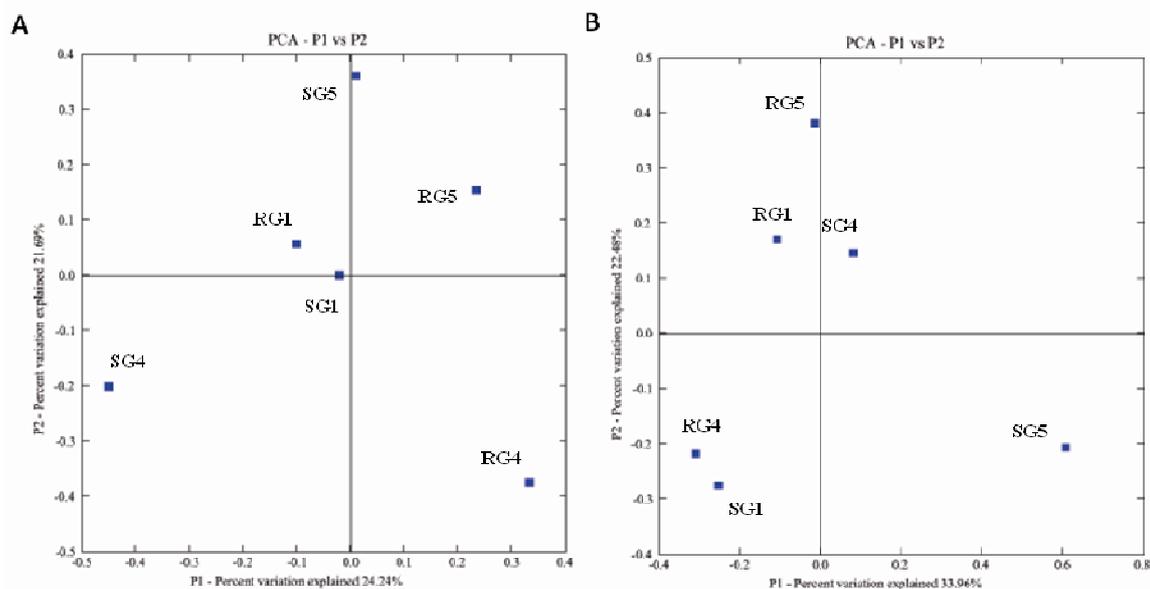


Figura 5 Análise de coordenadas principais para as bibliotecas dos genes 16S rRNA (A) e *nifH* (B). Os diagramas foram construídos usando UniFrac, levando em consideração as informações filogenéticas de cada biblioteca. As abreviações na figura representam: raiz (R), colmo (S), genótipo Cameroon (G1), Roxo (G4) e CNPGL91F06-3(G5).

Somente os gêneros *Conexibacter* (3,24%) e *Solirubrobacter* (2,2%), assim como unclassified_*Sorangineae* (5,18%), foram encontrados em todas as bibliotecas. O genótipo Cameroon (G1) apresentou maior número de gêneros bacterianos (40, raiz; 32, colmo) quando comparada com CNPGL91F06-3 (30, raiz; 26, colmo) e Roxo (26, raiz; 25, colmo). Um grande número de sequências não-classificadas dentro de diferentes famílias e classes bacterianas foi observado. O anexo 1 mostra mais detalhes sobre a distribuição de todas as sequências de 16S rRNA encontradas neste estudo.

3.3.2 Análise das sequências baseadas no gene *nifH*-cDNA

A análise de homologia baseada em sequências do gene *nifH* revelou que a população dominante associada aos tecidos de capim-elefante pertence ao grupo *Proteobacteria* (87,5%) (Figura 7b). De maneira geral, em nível de classe, a maioria das sequências encontradas mostrou similaridade com *nifH* de *Alphaproteobacteria* (47,2%), seguido por *Gamaproteobacteria* (23,3%), *Betaproteobacteria* (17,2%) e *Cyanobacteria* (1,2%). Cerca de 10% das sequências foram relacionadas com gene *nifH* de bactérias fixadoras de nitrogênio não-identificadas obtidas de rizosfera de *Spartina alterniflora* (Figura 7b). Em nível de gênero, a maioria das sequências mostraram entre 90 e 100% de homologia com sequências de *nifH* depositadas no banco de dados do NCBI. Dentre os 12 gêneros detectados, transcritos de *nifH* do gênero *Bradyrhizobium* foram encontrados amplamente distribuídos em todas as seis bibliotecas (Figura 7b). Os gêneros e/ou espécies dominantes variaram em função das amostras. O anexo 2 mostram informações detalhadas sobre a distribuição das sequências de *nifH* identificadas.

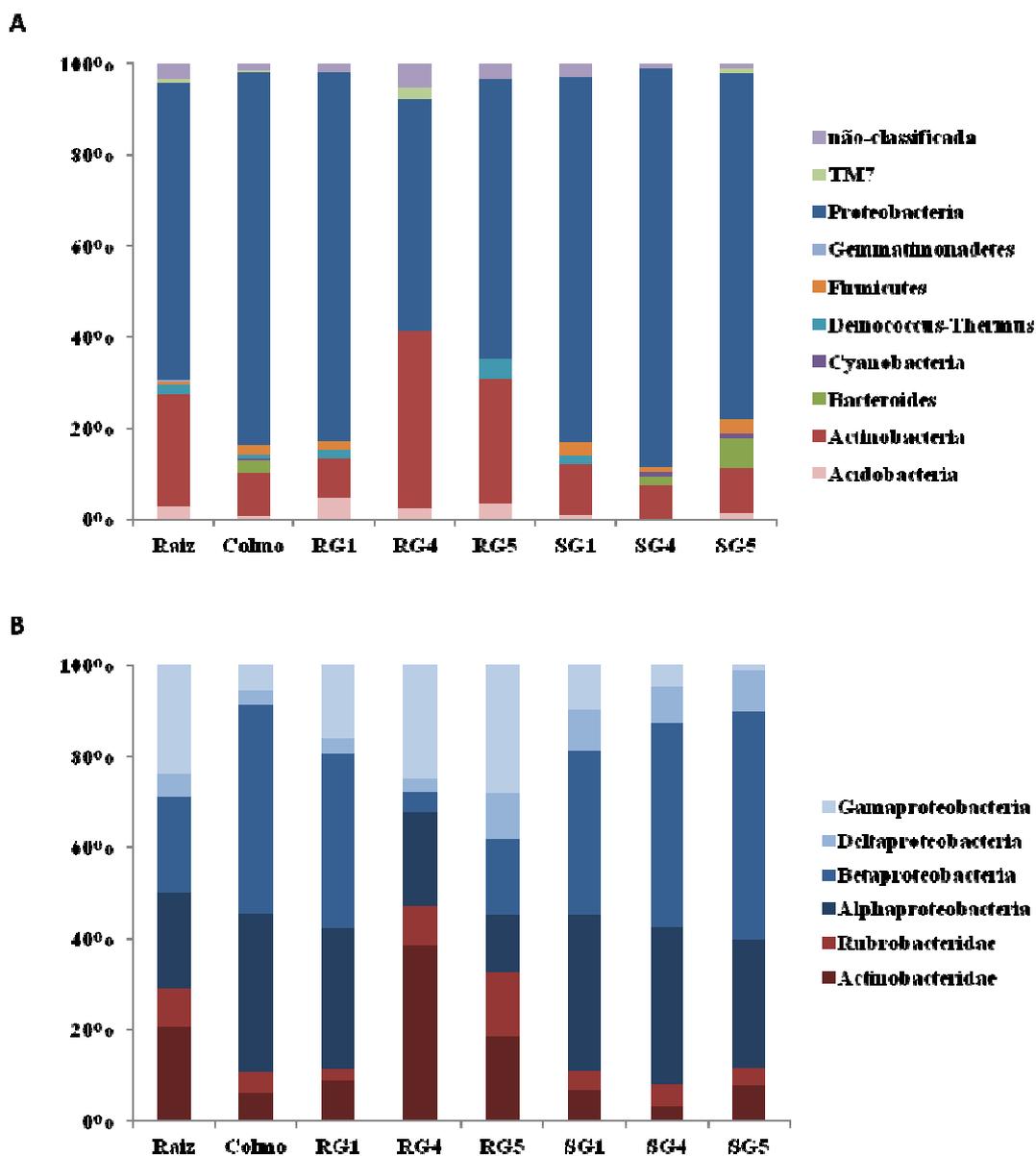


Figura 6 Abundância relativa da composição bacteriana de cada biblioteca do gene 16S rRNA ao nível de filo determinada pelo *RDP Classifier* com confiabilidade de 90% (A) e a abundância a nível de classe dos 2 filis mais dominantes, *Proteobacteria* e *Actinobacteria* (B). As abreviações na figura representam: raiz (R), colmo (S), genótipo Cameroon (G1), Roxo (G4) e CNPGL91F06-3(G5).

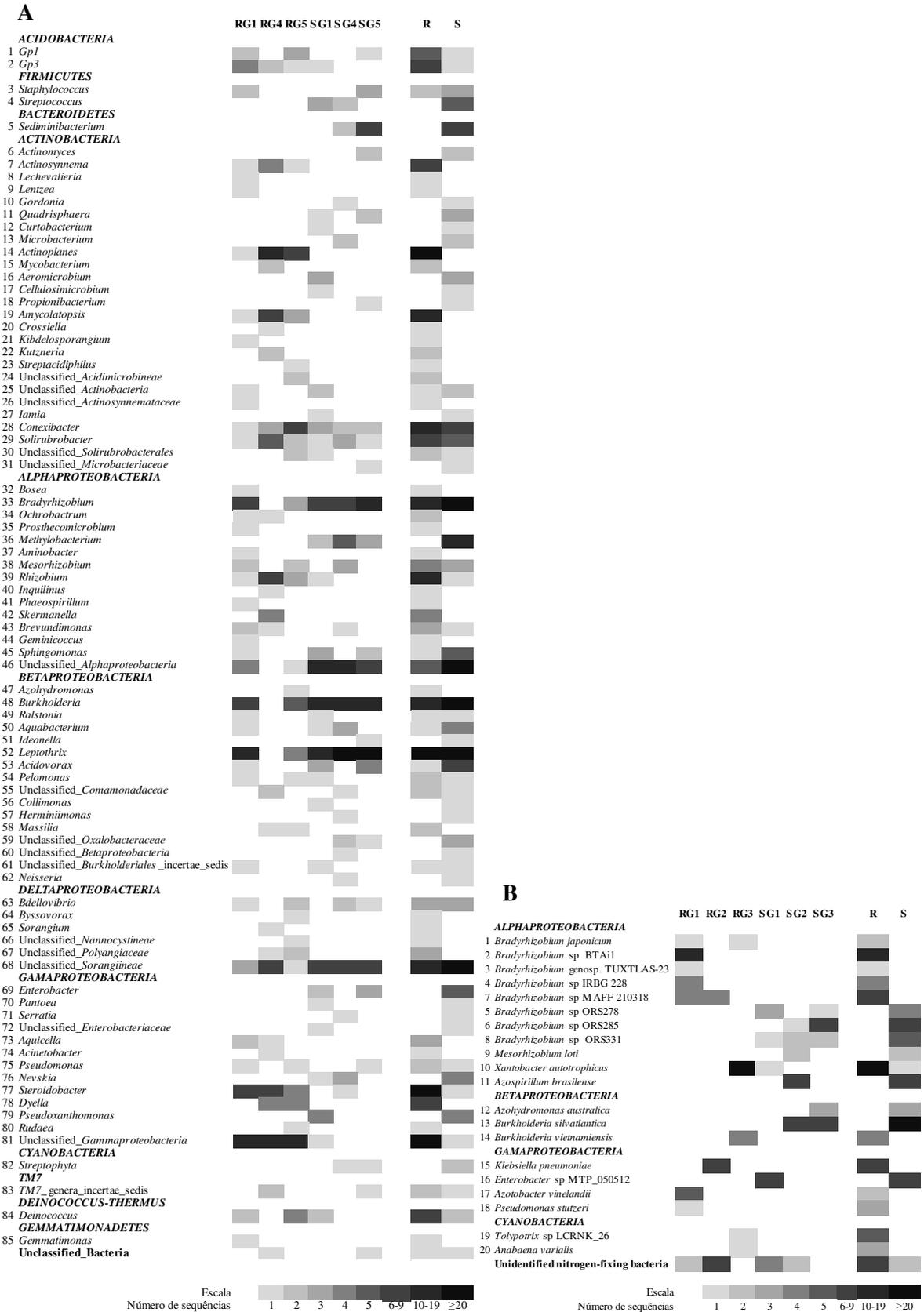


Figura 7 Frequência dos diferentes gêneros bacterianos identificados através do gene 16S rRNA (A) e *nifH* (B) em raízes e colmo de 3 genótipos de Capim-elefante. As abreviações na figura representam: raiz (R), colmo (S), genótipo Cameroon (G1), Roxo (G4) e CNPGL91F06-3(G5).

4 DISCUSSÃO

4.1 Estrutura da Comunidade Bacteriana

Os resultados de PCR-DGGE indicaram que a comunidade bacteriana associada aos tecidos de capim-elefante é bastante diversa e variável dependendo da parte da planta analisada. Quanto aos genótipos testados, efeito significativo entre a população bacteriana foi observado somente para a população metabolicamente ativa, determinada pelas amostras de cDNA. Comparando os perfis de DGGE entre os tecidos, as amostras de raiz (16S rRNA) apresentaram perfis distintos e com maior número de bandas quando comparados com o colmo; sendo essa diferença mais evidente e significativa para as amostras de DNA (Figura 1 e 2, Tabela 1). É importante mencionar que como as amostras de raiz não foram esterilizadas superficialmente, a comunidade detectada corresponde àquela contida no interior (endofíticas) e aderida à superfície das raízes (rizoplano), enquanto a comunidade do colmo representa apenas as endofíticas, já que os mesmos foram desinfestados e a casca removida. Estes resultados corroboram com estudos prévios desenvolvidos para análises de comunidades bacterianas usando técnicas dependentes e/ou independentes de cultivo como DGGE e T-RFLP (ROESCH et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006; BRASIL et al., 2005; PARIONA-LLANOS et al., 2010; HARDOIM et al., 2011). Os autores mostram que geralmente, maior diversidade e abundância de bactérias são encontradas na rizosfera e/ou rizoplano decrescendo progressivamente das raízes às folhas. Isto demonstra que em plantas de capim-elefante, assim como acontece em plantas de milho, arroz e cana-de-açúcar, as raízes apresentam uma maior população bacteriana, sendo considerada a principal “porta de entrada” destes organismos (PARIONA-LLANOS et al., 2010).

Os perfis de DGGE de comunidades bacterianas (16S rRNA) em raiz e colmo de capim-elefante mostram que os perfis gerados a partir das amostras de rRNA são menos complexos do que aqueles originados de rDNA, e que as bandas detectadas em rRNA foram essencialmente um subgrupo das bandas obtidas nas análises de rDNA. Através deste resultado é possível inferir que as bactérias metabolicamente ativas presente nos tecidos representam uma fração da diversidade bacteriana total. Considerando que a presença de bandas detectadas exclusivamente em rDNA indica que alguns dos grupos bacterianos dominantes estavam inativos no momento da coleta das amostras, a presença de bandas detectadas exclusivamente em rRNA poderia indicar a presença de bactérias ativas que foram sub-representadas nos perfis de rDNA e/ou estariam abaixo do nível de amplificação por PCR. Análise de comunidades bacterianas baseadas em RNA são mais adequadas para descrever os membros metabolicamente ativos de uma população, já que a quantidade de rRNA produzido por células se correlaciona, mais ou menos, com a atividade de crescimento das bactérias (WAGNER, 1994). No entanto, devido ao fato de que o isolamento de RNA de amostras ambientais é laborioso e que o RNA é mais propenso à degradação por nucleases do que o DNA, apenas poucos estudos têm sido baseados em RNA, e a grande maioria está relacionado com solo, rizosfera e esponjas (DUINEVELD et al., 2001; SESSITSCH et al., 2002). Análise dos perfis de DGGE de comunidades bacterianas em rizosfera de *Crysanthemum*, também mostraram que o número de fragmentos detectados nas amostras de rRNA foram menores do que os observados em rDNA (DUINEVELD et al., 2001).

Considerando a importância da fixação de N₂ para plantas de interesse agrícola, inclusive capim-elefante, o gene *nifH* foi usado como marcador molecular para estudar a estrutura da população de bactérias diazotróficas e identificar membros metabolicamente ativos associados as raízes e colmos de diferentes genótipos de capim-elefante. O gene *nifH*, que codifica a subunidade proteína Ferro (Fe) da nitrogenase, é o mais bem estudado entre os

genes do operon *nif*, com extensa coleção de sequências obtidas de microrganismos cultiváveis e não-cultiváveis de vários ambientes (DESLIPPE e EGGER, 2006) e tem sido muito usado para análises de diversidade estrutural e funcional de bactérias diazotróficas em diversos ambientes naturais e plantas de interesse agrícola como arroz, milho e cana-de-açúcar (KNAUTH et al., 2005; ROESCH et al., 2006; FISHER et al., 2011). Aplicando o método descrito por Dembla Diallo et al. (2008), genes *nifH* foram amplificados por PCR a partir de amostras de DNA e cDNA extraídos diretamente de raízes e colmo de capim elefante. Como já observado para a comunidade bacteriana total, os perfis de PCR-DGGE de *nifH* para as amostras de raiz revelaram que a população metabolicamente ativa também pode ser identificada como uma fração da diversidade total de bactérias diazotróficas; no entanto, essa diferença não foi tão evidente para as amostras de colmo, nos quais aparentemente a população presente e ativa é restrita a 2-4 filotipos com grande variação entre indivíduos (Figura 3). Outros autores, utilizando a mesma combinação de iniciadores utilizados neste trabalho (POLY et al., 2001), também identificaram perfis de *nifH*-DGGE com poucas bandas de alta intensidade em amostras de raiz de arroz (DEMBA DIALLO et al., 2008; PRAKAMHANG et al., 2009), rizosfera de sorgo (COELHO et al., 2009) e solos da Inglaterra e China (ORR et al., 2011; MARTENSSON et al., 2009). De acordo com os resultados descritos por Dembla Diallo et al. (2008), a diversidade de diazotróficos detectada com os iniciadores desenvolvidos por Poly et al. (2001) é limitada e sub-estima os filotipos dominantes na população bacteriana. Entretanto, conforme observado por outros autores (WARTIAINEN et al., 2008; MARTENSSON et al., 2009), esta combinação de iniciadores tem sido a mais específica para genes *nifH*, capaz de gerar um único produto de PCR de tamanho correto a partir de DNA e cDNA oriundos de diferentes amostras ambientais.

4.2 Composição da Comunidade Bacteriana

Grande parte dos estudos de diversidade bacteriana associada a plantas tem sido feito para amostras de rizosfera, região do solo sob influência direta das raízes, com máxima atividade microbiana; estudos de tecidos vegetais como folhas, caules e raízes têm sido particularmente prejudicados por dificuldades técnicas, pois estes tecidos contêm menor quantidade de biomassa microbiana quando comparados à rizosfera. Além disso, o DNA de cloroplastos e mitocôndrias muitas vezes concorre com o gene 16S rRNA bacteriano nas ampliações por PCR (IKEDA et al., 2009). Um procedimento alternativo para minimizar a interferência de DNA de plantas que vêm sendo empregado é a utilização de um conjunto de iniciadores específicos para 16S rRNA bacteriano. Chelius e Triplett (2001) desenvolveram um iniciador (799f) projetado para a amplificação específica de sequências do gene 16S rRNA bacteriano de DNA diretamente extraído de raiz, o qual têm sido utilizado com sucesso por muitos autores (IDRIS et al., 2004; HARDOIM et al., 2011), apesar de alguns resultados controversos na literatura (RASCHE et al., 2006; BECKER et al., 2008). Analisando as 597 sequências obtidas a partir de amostras de raiz e colmo de 3 genótipos de capim-elefante, os resultados mostram que a utilização dos iniciadores 799f e 1401r foi eficiente na minimização de interferência de DNA de cloroplasto e mitocondrial, embora duas sequências (0,33%) tenham apresentado homologia com sequências de cloroplasto da família *Streptophyta* (Figura 7). Portanto, deduz-se que este par de iniciadores pode ser usado nos estudos de comunidades bacterianas associadas a tecidos vegetais por abordagens independente de cultivo.

A análise das sequências obtidas de colmo e raiz de 3 genótipos distintos de capim-elefante revelaram grande diversidade bacteriana metabolicamente ativa associada a estes tecidos. De maneira geral, os grupos detectados com maior frequência (≥ 10 sequências) em tecidos de capim-elefante foram Proteobacteria - constituído de β - (*Leptothrix* spp e *Burkholderia* spp), α - (*Bradyrhizobium* spp, *Methylobacterium* spp e *Rhizobium* spp), γ - (*Steroidobacter* spp e unclassified-Gammaproteobacteria) - e Actinobacteria (*Actinoplanes*

spp, *Conexibacter* spp, *Solirubrobacter* spp e *Amycolatopsis* spp). Gêneros menos frequentes distribuídos randomicamente entre as bibliotecas foram *Mesorhizobium* spp, *Sphingomonas* spp, *Acidovorax* spp e *Dyella* spp. Entretanto, faz-se necessário salientar que a proporção destes grupos variou em função das amostras (Figura 7). Em estudos previos utilizando métodos independentes de cultivo - normalmente baseados em amostras de DNA - para analisar comunidades bacterianas associadas a tecidos de milho (ROESCH et al., 2008; PEREIRA et al., 2011), arroz (HARDOIM et al., 2011), cana-de-açúcar (MAGNANI et al., 2010; FISHER et al., 2011) grande parte destes gêneros também foram identificados. Entretanto, além destes grupos comumente encontrados, sequências raramente detectadas como Deltaproteobacteria, Acidobacteria, TM7, Gemmatimonadetes, Tenericutes, Deinococcus e Bacteroidetes também foram identificadas nas bibliotecas de 16S rRNA. Normalmente, estes grupos raros têm sido acessados somente através de métodos de alto rendimento como pirosequenciamento e PhyloChip™ em amostras de solo e rizosfera de algumas plantas de interesse agrícola como citrus e batata (TRIVEDI et al., 2012; ÖZGÜL et al., 2011; WEINERT et al., 2011), mas suas funções ainda são desconhecidas.

A composição da comunidade microbiana variou entre amostras de raiz e colmo dos 3 genótipos de capim-elefante testados. Grupos taxonômicos distribuídos entre as bibliotecas de raiz e colmo que apresentaram uma única sequência não foram considerados na discussão, bem como o grupo com homologia a organelas vegetais. Contudo, 54 grupos taxonômicos foram analisados e diagramas de Venn foram elaborados, individualmente, para verificar as interseções e peculiaridades entre os dados das bibliotecas de 16S rRNA (Figuras 8 e 9). O diagrama do conjunto de dados das bibliotecas de raiz revelou que 22,5% dos grupos taxonômicos (9) foram compartilhados entre os 3 genótipos avaliados (RG1, RG4 e RG5) (Figura 8a). Dentre estes, a maior frequência de sequências foi observada para *unclassified* γ -*Proteobacteria* (46 sequências), seguida de *Actinoplanes* (21), *Steroidobacter* (21), *Conexibacter* (12) e *Amycolatopsis* (11). Para as amostras de colmo, o diagrama revelou que 20% (8) dos grupos bacterianos foram detectados simultaneamente nas 3 bibliotecas, sendo os gêneros *Leptothrix* (55), *Burkholderia* (40), *Bradyrhizobium* (27) e *unclassified* α -*Proteobacteria* (40) com maior frequência (Figura 9b). Interessantemente, os gêneros *Leptothrix* (77 sequências), *Burkholderia* (54), *Bradyrhizobium* (39), bem como sequências de α -*Proteobacteria* (45), foram identificados em todas as amostras de raiz e colmo, com exceção das amostras de raiz do genótipo Roxo (RG4) (Figura 7a e 8b). Analisando as sequências por genótipo, considerando uma amostra composta de raiz e colmo, 14 gêneros e três famílias foram identificados nos 3 genótipos (Figura 9).

Espécies do gênero *Leptothrix* pertencem a família *Burkholderiales* e são comumente encontradas em habitats de água doce, como lagos, lagoas e pântanos (SPRING et al., 1996). Estes microrganismos são reconhecidos por sua capacidade de oxidar grandes quantidades de Fe (II) e/ou Mn (II) em seus ambientes naturais. Em plantas, a espécie *L. ginsengiosoli* foi recentemente isolada de raiz de *Phaseolus vulgaris* cultivado em condições estéreis no México (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2010) e clones de 16S rRNA foram identificados endofiticamente em raízes de *Typha angustifolia* (LI et al., 2011). Embora não existam relatos na literatura sobre a funcionalidade deste gênero em plantas, o gene *nifH* foi identificado em *Leptothrix cholodnii* (ATCC 51168) e *L. discophora* (SP-6) (<http://www.uniprot.org/uniprot/B1Y771>).

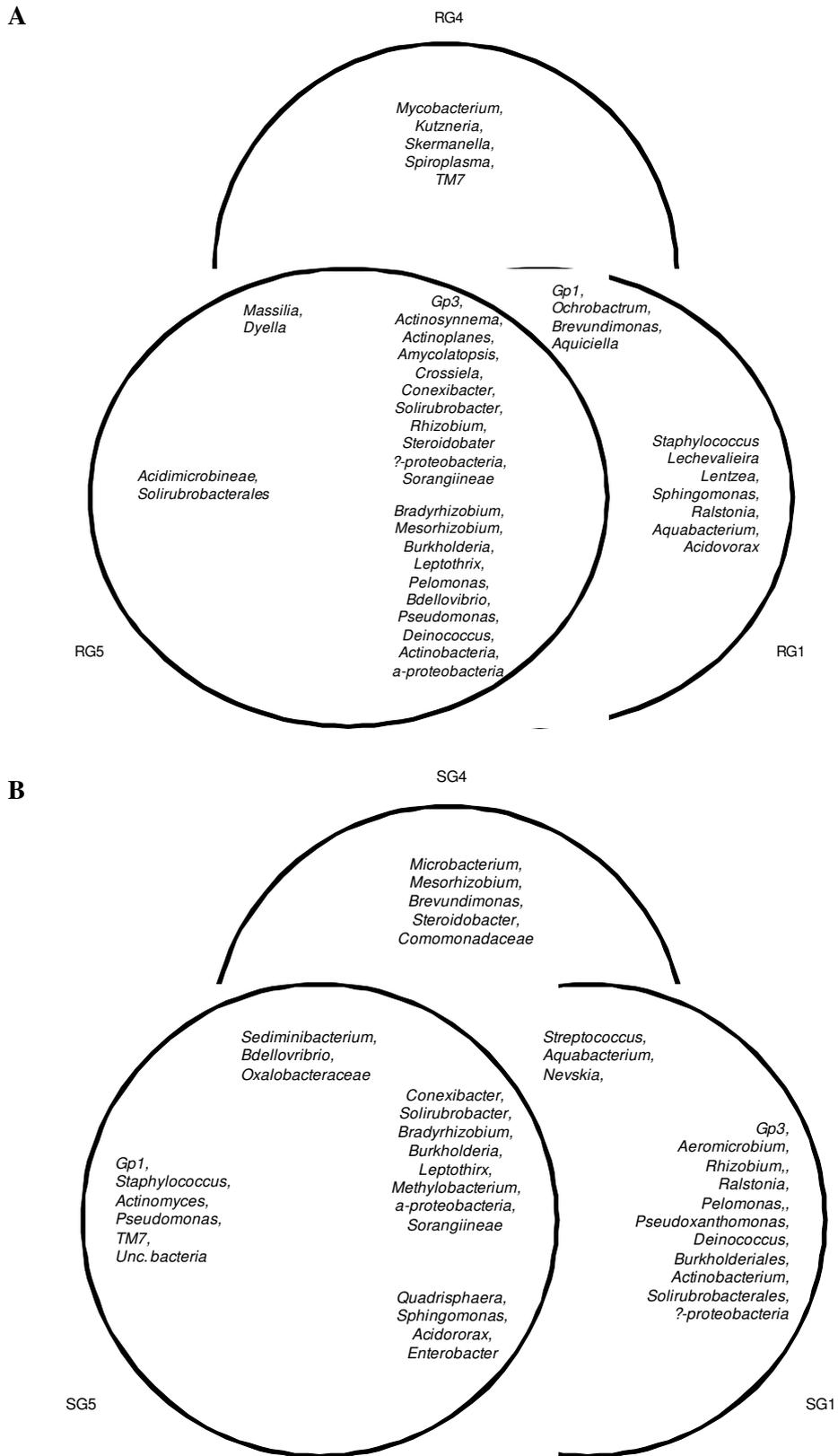


Figura 8 Representação esquemática dos diferentes gêneros encontrados entre as amostras de raiz (A) e colmo (B) de capim-elefante com base em sequências de 16S rRNA. G1- Cameroon, G4- Roxo e G5- CNPGL91F06-3.

O segundo grupo mais abundante foi *Burkholderia*, um gênero amplamente distribuído em ambientes naturais como solo, rizosfera e interior de tecidos vegetais de poáceas e leguminosas (SALLES et al., 2002; PERIN et al., 2006). Espécies deste gênero tem mostrado diversas funções biológicas incluindo a promoção de crescimento de plantas através da FBN e solubilização de fosfato (REIS et al., 2004), supressão de patógenos de plantas (BEVIVINO et al., 1998), incrementos de produtividade de plantas agrícolas (GOVINDARAJAN et al., 2008), bem como degradação de diversos pesticidas (DAUBARAS et al., 1996). Recentemente, um grande número de estudos tem detectado sequências pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* em plantas de arroz (HARDOIM et al., 2011), cana-de-açúcar (BURBANO et al., 2011; FISHER et al., 2011) e batata doce (TERAKADO-TONOOKA et al., 2008). Este gênero tem a capacidade de estabelecer relações simbióticas com diferentes plantas da família *Fabaceae* e contribuir significativamente com N derivado da FBN para seu hospedeiro (LINDSTRÖM et al., 2010), entretanto, o tipo de associação e sua contribuição para plantas da família *Poaceae* ainda é desconhecida. A grande maioria dos estudos que detectaram sequências homologas às de *Bradyrhizobium* em tecidos de plantas da família *Poaceae* tem sido conduzido com análises de genes funcionais como o gene *nifH*, através de amostras de DNA e/ou cDNA.

Nas bibliotecas de *nifH*-cDNA de raízes e colmo de plantas de capim-elefante, 26,38% (43) do total de fragmentos de *nifH* foram relacionados com sequências de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* (Figura 7b). As sequências detectadas em raiz mostraram maior similaridade com estirpes de rizóbios fototróficos (IRBG228 e BTAi1), os quais podem fixar nitrogênio em condições de vida livre (LADHA e SO, 1994, GIRAUD et al. 2007); e não-fototróficos (MAFF210318), isolado de nodulos de *Aeschynomene* na Tailândia (Cantera et al., 2004). As sequências detectadas no colmo apresentaram homologia com estirpes endofíticas fotosintéticas de *Bradyrhizobium* sp (ORS331, ORS278 e ORS285) isoladas de diferentes espécies de *Aeschynomene* no Senegal (NZOUE et al., 2009). Além do gênero *Bradyrhizobium*, detectado em todas as bibliotecas de *nifH*-cDNA, outros 12 gêneros de bactérias diazotróficas metabolicamente ativos foram identificados, mas sua distribuição foi aleatória entre bibliotecas. Sequências homólogas ao gene *nifH* de *Azospirillum brasilense* (9), *Azohydromonas australica* (3), *Burkholderia silvatlantica* (21), *Enterobacter* sp MTP_050512 (17) e *Mesorhizobium loti* (2) foram detectadas somente em amostras de colmo. Já os gêneros *Xantobacter autotrophicus* (22), *Burkholderia vietnamiensis* (4), *Cyanobacteria* (2), *Klebsiella pneumoniae* (15), *Azotobacter vinelandii* (5) e *Pseudomonas stutzeri* (1) foram identificados somente em amostras de raiz. Sequências de raiz (12) e colmo (6) dos genótipos Cameroon e Roxo apresentaram alta homologia com sequências de *Unidentified nitrogen-fixing bacteria*, clones do gene *nifH* obtidos de rizosfera de *Spartina alterniflora* (LOVELL et al., 2008).

Através da utilização de meios de cultivo livres de N para estudar a comunidade de bactérias diazotróficas cultiváveis em dois genótipos de capim-elefante, baixa diversidade foi detectada, e gêneros relacionados com promoção de crescimento vegetal como *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Azospirillum*, além de *Gluconacetobacter*, também foram identificados (VIDEIRA et al., 2011). Através destes resultados podemos concluir que, de fato, estudos moleculares de bactérias associadas a tecidos vegetais revelam uma diversidade de bacterias diazotróficas metabolicamente ativas que ainda não haviam sido isoladas por métodos tradicionais de cultivo.

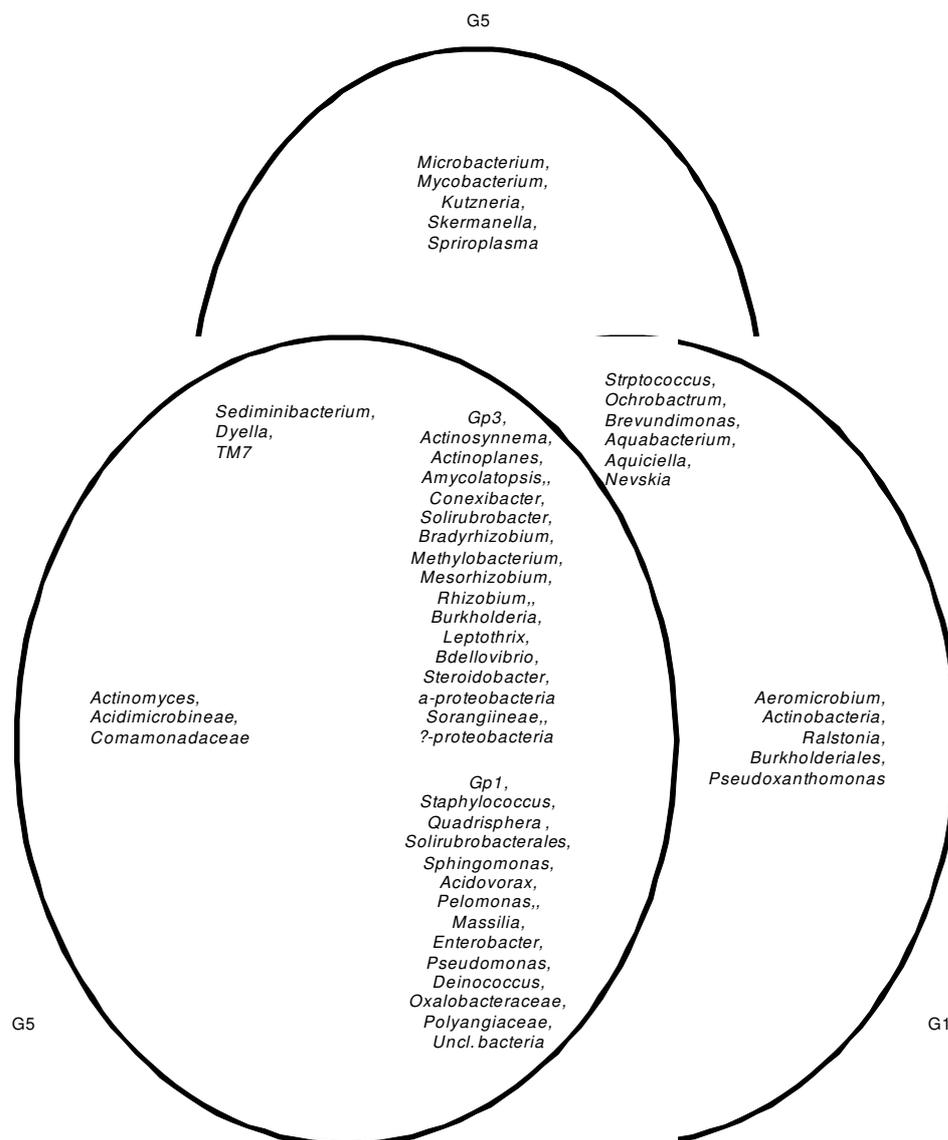


Figura 9 Representação esquemática dos diferentes gêneros encontrados entre os genótipos de capim-elefante com base em sequências de 16S rRNA. G1- Cameroon, G4-Roxo e G5- CNPGL91F06-3.

Em relação a baixa diversidade de bactérias diazotróficas metabolicamente ativas detectada em tecidos de capim-elefante, os resultados corroboram com estudos obtidos em plantas de arroz selvagem, cana-de-açúcar, Kallar grass e *Picea abies* (HUREK et al., 2002; ZHANG et al., 2007; BURBANO et al., 2011). Dembla Diallo et al., (2008), utilizando as mesmas condições de reação, detectaram baixo número de fragmentos em perfis de *nifH*-DGGE a partir de amostras de cDNA de raízes de arroz. De acordo com esses autores, a baixa diversidade está relacionada com a combinação de iniciadores desenvolvidos por Poly et al., (2001), já que ao utilizarem os iniciadores desenvolvidos por Zehr e McReynolds (1989) uma diversidade mais completa de genes da nitrogenase foi observada. Ao sequenciarem os fragmentos obtidos com os iniciadores descritos por Poly et al. (2001) detectaram sequências similares a *Unidentified nitrogen-fixing bacteria* de *Spartina alterniflora* e *Methylocystis echinoides* (filogeneticamente relacionada a *Xanthobacter autotrophicus*). Já os fragmentos gerados com os iniciadores descritos por Zehr e McReynolds (1989), além destes grupos,

detectaram também sequências homologas a *Bradyrhizobium* sp (MAFF210318), *Azoarcus* sp BH72, *Pseudomonas stutzeri*, além de Firmicutes, Geobacteraceae, bactérias anaeróbias obrigatórias e Archaea. Em Kallar grass, genes da nitrogenase foram quase que exclusivamente expressos por *Azoarcus* sp. (HUREK et al., 2002); ainda mais surpreendente tem sido a dominância de sequências de *nifH*-cDNA relacionadas com *Rhizobium rosettiformans* e *Bradyrhizobium* spp distribuídas globalmente em cana-de-açúcar (Brasil, Japão) e spruce (Alemanha) (THAWEENUT et al., 2011; FISHER et al., 2011; BURBANO et al., 2011). Estudos previos também já haviam detectado membros desta família colonizando sistematicamente o interior de plantas de arroz (CHI et al., 2005).

Este estudo sugere que muitas bactérias relacionadas com a promoção de crescimento vegetal, incluindo alguns gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio, estão associados a plantas de capim-elefante com atividade no interior de seu hospedeiro. Vale ressaltar que a diversidade bacteriana estrutural e funcional descritas aqui representam apenas uma visão pontual, já que a amostragem foi realizada em um único ponto e tempo. Desta forma, não é possível afirmar se a estrutura da comunidade bacteriana, bem como os organismos dominantes, variam em função do ciclo da planta e outros fatores ambientais, como observado para outras culturas.

6 CONCLUSÕES GERAIS

A utilização de métodos dependentes e independente de cultivo revelou que a população de bactérias totais e diazotróficas foram mais influenciadas pelo tecido vegetal do que pelos genótipos de capim-elefante testados, sendo a maior população encontrada nos tecidos de raiz.

Através da utilização de meios de cultivo livres de N, foi possível isolar 204 estirpes bacterianas associativas e endofíticas de plantas de capim-elefante; deste total, 75% apresentaram atividade da nitrogenase, 97% produziram compostos indólicos, 22% solubilizaram fosfato e 15% apresentaram as três características.

Em relação à comunidade diazotrófica, sequências relacionadas a bactérias dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Azospirillum* e *Enterobacter* foram predominantemente detectadas por métodos dependentes de cultivo; enquanto os métodos independentes de cultivo mostraram dominância de genes *nifH* homólogos a *Bradyrhizobium* spp.

As análises filogenéticas baseadas em fragmentos do gene 16S rDNA - amplificados diretamente de amostras de capim-elefante - revelaram maior abundância de sequências pertencentes aos gêneros *Leptotrix*, *Burkholderia* e *Bradyrhizobium* em raízes e colmo desta planta.

A inoculação de bactérias diazotróficas não proporcionou efeito significativo na produção de biomassa, acúmulo de nutrientes e teor de proteína; embora a inoculação com estirpes de *Azospirillum* e *Gluconacetobacter* tenham promovido incrementos de matéria seca de raízes e acúmulo de N e P-total.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estimativas globais apontam que, nas últimas cinco décadas, cerca de dois dos 8,7 bilhões de hectares de terras agricultáveis, pastagens permanentes e florestas do mundo tenham sido degradadas (CASSMAN, 1999). Frente a esta problemática, a construção de modelos de produção sustentável é colocada como marco central para agricultura do século XXI, exigindo, dentre uma gama incontável de ações, o desenvolvimento de tecnologias alternativas para incremento da produção e proteção vegetal. Neste contexto, a utilização de processos biológicos envolvendo microrganismos, na qualidade de insumos biológicos, merece destaque por minimizarem potencialmente a necessidade de aplicação de fertilizantes e defensivos agrícolas, adequando-se ao modelo sócio-econômico de produção agrícola (BASHAN, 1998; SAHARAN e NEHRA, 2011; DASH e GUPTA, 2011).

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que existe uma grande diversidade de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas com habilidades de promover o crescimento e desenvolvimento de plantas de capim-elefante. Ressalta-se, porém, que novos trabalhos devem ser desenvolvidos com intuito de confirmar estes resultados e, futuramente maximizar os benefícios proporcionados pela interação planta-bactéria. Em decorrência da diversidade dos gêneros bacterianos identificados neste estudo, aliado a diversidade dos ambientes de cultivo de capim-elefante e a variabilidade genética destas plantas, sugere-se a continuidade dos trabalhos de pesquisa, buscando a identificação das interações mais eficientes entre a planta hospedeira e as estirpes bacterianas utilizadas para inoculação.

O capim-elefante é considerado uma cultura semi-perene e qualquer tecnologia que vise à redução de insumos, como os fertilizantes sintéticos, deverão ser avaliadas durante todo o seu ciclo de desenvolvimento. Da mesma forma, os efeitos da inoculação com bactérias diazotróficas devem ser avaliados ao longo do ciclo da cultura, que para fins energéticos tem durabilidade média de 6 meses, podendo ser cortado até 14 vezes (2 cortes/ano). Até o momento, nenhum estudo foi realizado mostrando a flutuabilidade da população de bactérias diazotróficas, bem como os possíveis efeitos na promoção de crescimento nos diferentes estágios fenológicos da cultura, os resultados mostrados até então, destacam somente a presença de bactérias em amostragens pontuais. Outro ponto relevante é a inserção no melhoramento vegetal de ferramentas que possibilitem a identificação de genótipos promissores quanto à capacidade de associação com microrganismos promotores de crescimento e responsivos a inoculação com bactérias diazotróficas.

Compilando os resultados gerados pelos 3 capítulos descritos nesta tese, podemos sugerir estudos futuros de inoculação com bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Gluconacetobacter* e *Enterobacter*, identificadas como promotoras de crescimento vegetal, em conjunto com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, as quais mostraram atividade da FBN *in situ*. Da mesma forma, espera-se que os próximos trabalhos com capim-elefante, bem como com outras culturas bioenergéticas de comportamento similar, tragam respostas positivas de modo que esta tecnologia possa ser aperfeiçoada e aplicada comercialmente.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ALLA, M.H. Use of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar. viceae phosphatases. **Biology and Fertility of Soils** v.18, p.216-218,1994.
- AHEMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizobacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, p.173-181, 2008.
- ALBINO, U.; SARIDAKIS, D.P.; FERREIRA, M.C.; HUNGRIA, M.; VINUESA, P.; ANDRADE, G. High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. **Plant and Soil** , v.287, p.199-207, 2006.
- ALMEIDA, J.; COSTA, B.M.; PAIVA, J.A.J.; TAVARES, J.T.Q. Avaliação de fenos de campí-elefante cv. Roxo. **Revista Bahia Agrícola**, v.6, p.67-71, 2004.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. GAPPED. BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.
- ALVES, B. J. R.; SANTOS, J. C. F. dos; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Métodos de determinação do nitrogênio em solo e planta. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S., (Org.) **Manual de métodos empregados em estudo de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa-SPI; Goiania: Embrapa-CNPAP; Londrina: Embrapa-CNPSO, 1994. p. 449-409. (Embrapa-CNPAP. Documentos, 46).
- ALVES, G. C. **Efeito da inoculação de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do milho**. Seropédica/RJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007. 63p. Dissertação Mestrado.
- AMANN, R.; SNAIDR, J.; WAGNER, M.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. -H. *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.3496-3500, 1995.
- ANDO, S.; GOTO, M.; MEUNCHANG, S.; THONGRA-AR, P.; FUJIWARA, T.; HAYASHI, H.; YONEYAMA, T. Detection of *nifH* sequences in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.). **Soil Science & Plant Nutrition**, v.51, p.303-308, 2005.
- ANTOUN, H., PRÉ VOST, D., Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. In: SIDDIQUI, Z.A. (Ed.), **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. Springer, Dordrecht, p. 1-38, 2005.
- APPLEBY, P.G.; OLDFIELD F. The assessment of of ²¹⁰Pb data from sites with varying sediment accumulation rates. **Hydrobiologia**, v. 103, p. 29-35, 1983.
- ASEA, P.E.A.; KUCEY, R.M.N; STEWART, J.W.B. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, p.459-464, 1988.
- AVEIRO, A.R.; SIEWERDT, L.; SILVEIRA, J.R., P. Capim-elefante: efeitos da irrigação e das adubações mineral e orgânica. I - Teor e produção total de matéria seca. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.20, p.239-247, 1991.

- AVIS, T.J.; GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology and Biochemistry**, v.40, p. 1733-1740, 2008.
- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR.; W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, p.40-65, 2000.
- BACA, B. E.; ELMERICH, C. Microbial Production of Plant Hormones. In: ELMERICH, C. e NEWTON, W. E. (Eds.) **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**, Springer: v. 5, 2007, p.111-137.
- BAKER D.D.; MULLIN, B.C Actinorhizal symbioses. In: STACEY, G; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (eds) **Biological Nitrogen Fixation**. Routland, Chapman and Hall, 1992, p. 259–292.
- 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.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Genus III. *Herbaspirillum*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2nd ed. Newark: Springer, 2005, p. 629-636.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.911-922, 1997.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p. 485–491, 2000.
- BALLY, R.; ELMERICH, C. Biocontrol of plant diseases by associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria. In: ELMERICH C., NEWTON W.E. **Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**. Springer, 2007, p. 171-190.
- BARMAN, M.; UNOLD, D.; SHIFLEY, K.; AMIR, E.; HUNG, K.; BOS, N.; SALZMAN, N. Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. **Infect Immun**, v.76, p.907-915, 2008.
- BARRIUSO, MAICAS, J., RAMOS, SOLANO, B. GUTIÉRREZ, MAÑERO, F.J. Protection against pathogen and salt stress by four PGPR isolated from *Pinus* sp. on *Arabidopsis thaliana*. **Phytopathology**, v.98, p. 666-672, 2008.
- BAR-YOSEF, B. Advances in fertigation. **Advances in agronomy**, v. 65, p.1-77, 1999.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v.108, p.77-136, 2010.
- BECKER, R.; BEHRENDT, U.; HOMMEL, B.; KROPF, S.; ULRICH, A. Effects of transgenic fructan-producing potatoes on the community structure of rhizosphere and phyllosphere bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.66, p.411–425, 2008.
- BERGAMASCHI, H. et al. Maize yield and rainfall on different spatial and temporal scales in Southern Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 603-613, 2007.
- BERGMAN, B.; OSBORNE, B. The Gunnera-Nostoc symbiosis. **Biology and Environment**, v.122, p.35–39, 2002.

- BERMAN-FRANK, I.; LUNDGREN, P.; FALKOWSKI, P.G. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria, **Research in Microbiology**, v.154, p.157–164, 2003.
- BEVIVINO, A.; SARROCCO, S.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; CANTALE, C.; CHIARINI, C. Characterization of free-living maize rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 27, p. 225-237, 1998.
- BISHOP, PE, JARLENSKI ,DM, HETHERINGTON, DR. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.77(12):p.7342–7346, 1980
- BODDEY, R. M.; MACEDO, R.; TARRÉ, R. M.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, O. C.; REZENDE, C. de P.; CANTARUTTI, R. B.; PEREIRA, J. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycling in Brachiaria pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 103, p. 389-403, 2004.
- BODDEY, R. M.; SOARES, L. H. B.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Bio-Ethanol Production in Brazil. In: PIMENTEL, D. (Ed.). Biofuels, solar and wind as renewable energy systems.: **Springer**, New York. p. 321-356, 2008.
- BODDEY, R.M e VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Bachiaria*, *Paspalum notatum* cv. batatais using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, v. 90, p. 265-292, 1986.
- BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in sugar cane: a key to energetically viable biofuel production. **Critical Reviews in Plant Sciences**,v.14, p. 263-279, 1995.
- BODDEY, R.M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.6, p.209-266, 1987.
- BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contribution and prospects for improvements. **Plant and Soil**, v.174, p. 195-209, 1995.
- BODDEY, R.M.; CLARK, P.M.; VICTORIA, R.L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the 15N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. batatais. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 1036-1045, 1983.
- BONILLA, G. A. E. **Seleção de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fósforo e seu efeito no desenvolvimento de plantas de arroz**. Seropédica: UFRRJ, 2011 Dissertação. (Mestrado em Fitotecnia) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- BOOGAARD, R.; VAN DEN; VENEKLAAS, E.J.; LAMBERS, H. The association of biomass allocation with growth and water use efficiency of two *Triticum aestivum* cultivars. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.23, p.751-761, 1996.
- BRADFORD, M.M. "Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248–254, 1976.
- BRASIL, M.S.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D. Occurrence and diversity of diazotrophic bacteria associated to forage grasses of the Pantanal in the state of Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, p.179-190, 2005.

- BRONS, J.K.; VAN ELSAS, J.D.; Analysis of bacterial communities in soil by use of denaturing gradient gel electrophoresis and clone libraries, as influenced by different reverse primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p.2717–2727, 2008.
- BURBANO, C.S.; LIU, Y.; ROESNER, K.L.; REIS, V.M.; CABALLERO-MELLADO, J.; REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Predominant *nifH* transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformansin* field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. **Environmental Microbiology Reports**, v.3, p.383–389, 2011.
- BURKE, C.; THOMAS, T.; LEWIS, M.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S. Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. **ISME Journal**, v.5, p.590–600, 2011.
- BYRT, C.S; GROF, C.P.L; FURBANK, R.T. C₄ plants as biofuel feedstocks: optimising biomass production and feedstock quality from a lignocellulosic perspective. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 53, p.120-135, 2011.
- CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA-DE-LOS SANTOS, J.; MARTINEZ-AGUILAR L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p. 5308–5319.
- CABRAL, L. S.; BHERING, M.; ABREU, J. G. ; REVERDITO, R. ; PEREIRA, G. A. C. ; KAISER, J. ; MIRANDA, L.; ZERVOUDAKIS, J. T. ; SOUZA, A. L. . Teores de Proteína bruta e FDN do capim-elefante roxo obtido em diferentes idades de corte na baixada cuiabana. In: **Anais do ZOOTEC 2006**. Recife - PE, 2006.
- CANTERA, J.J.L.; KAWASAKI, H.; SEKI, T. The nitrogen-fixing gene (*nifH*) of *Rhodospseudomonas palustris*: a case of lateral gene transfer? **Microbiology**, v.150, p.2237–2246, 2004.
- CARVALHO, M. M.; ALVIM, M. J.; XAVIER, D. F.; CARVALHO, L. de A. Capim-elefante: produção e utilização, **EMBRAPA-CNPGL - Coronel Pacheco**, 1994.p .227.
- CASSÁN ,F, PERRIG, D, SGROY ,V., LUNA, V. Basic and technological aspects of phytohormone production by microorganisms: *Azospirillum* sp. as a model of plant growth promoting rhizobacteria In: MAHESHWARI D. K. **Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management**, p.141-182, 2011.
- CASSÁN, F.; BOTTINI, R.; SCHNEIDER, G.; PICCOLI, P *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolize conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1 in seedlings of rice dwarf mutants. **Plant Physiol** v.125,p. 2053–2058, 2001.
- CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, v.63, p.1670-1680, 1999.
- CAVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v.108, p.23-31, 1988.
- CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The Diversity of *Archaea* and *Bacteria* in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v.41, p.252-263, 2001.
- CHEN, D.H.; RONALD, P.C. A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.17, p.53-57, 1999.
- CHI, F.; SHEN, S.H.; CHENG, H.P.; JING, Y.X.; YANNI, Y.G.; DAZZO, F.B. Ascending migration of endophyticrhizobia from roots to leaves, inside rice plants and assessment of

benefits to rice growth physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.7271-7278, 2005.

COELHO, M.R.R.; CARNEIRO, N.P.; MARRIEL, I.E.; SELDIN, L. Molecular detection of gene-containing in the rhizosphere of sorghum sown in Cerrado soil. **Letters in Applied Microbiology**, v.48, p.611-617, 2009.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v.37, p.141-145, 2009.

COMPANT S.; CLÉMENT C.; SESSITSCH A. Colonization of plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: importance, mechanisms involved and future prospects. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p.669–678, 2010

COOLEN, M.J.L.; OVERMANN, J. Analysis of subfossil molecular remains of purple sulfur bacteria in a lake sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.4513-4521, 1998.

CORSI, M., NUSSIO, L.G. Manejo do capim-elefante: correção e adubação do solo. In: **Simpósio Sobre Manejo Da Pastagem**, 10., Piracicaba, Anais... , Piracicaba: FEALQ, p. 87-117, 1992.

COUILLEROT, O.; POIRIER, M.A.; PRIGENT-COMBARET, C.; MAVINGUI, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.528-38, 2010.

CROZIER, A.; KAMIYA, Y.; BISHOP, G.; YOKOTA, T. Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**, p. 850–929, 2000.

CURTIS, T.P.; SLOAN, W.T. Exploring microbial diversity – a vast below. **Science**, v.309, p.1331–1333, 2005.

DALTON, H.; POSTATEJ, R. Growth and physiology of *Azotobacter chroococcum* in continuous culture. **Journal of General Microbiology**, v.56, p. 307-319, 1969

DASTAGER, S.G.; DEEPA, C.K.; PUNEET, S.C.; NAUTIYAL, C.S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of plant growth-promoting strain *Pantoea* NII-186. From Western Ghat forest soil, India. **Letters in Applied Microbiology**, v.49, p.20-25, 2009.

DAUBARAS, D.L.; SAIDO, K.; CHAKRABARTY, A.M. Purification of hydroxyquinol 1,2-dioxygenase and maleylacetate reductase: the lower pathway of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid metabolism by *Burkholderia cepacia* AC1100. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4276–4279, 1996.

DEBROAS, D.; HUMBERT, J.F., ENAULT, F.; BRONNER, G.; FAUBLADIER, M.; CORNILLOT, E. Metagenomic approach studying the taxonomic and functional diversity of the bacterial community in a mesotrophic lake (Lac du Bourget–France). **Environmental Microbiology**, v.11, p.2412–2424, 2009.

DEMBLA DIALLO, M.; REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Evaluation of PCR primers for universal *nifH* gene targeting and for assessment of transcribed *nifH* pools in roots of *Oryza longistaminata* with and without low nitrogen input. **FEMS Microbiology Ecology**, v.65, p.220–228, 2008.

- DE-POLLI H; MATSUI E; DÖBEREINER J; SALATE E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses $^{15}\text{N}_2$ incorporation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 9, p.119-123, 1977.
- DESLIPPE, J.; EGGER, K. Molecular diversity of *nifH* genes from bacteria associated with high arctic dwarf shrubs. **Microbial Ecology**, v.51, p.516-525, 2006.
- DEUBEL A, GRANSEE A, MERBACH W Transformation of organic rhizodepositions by rhizosphere bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v.163, p.387-392, 2000.
- DIDONET, A.D.; LIMA, O.S.; CANDATEN, A.A.; RODRIGUES, O. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido a inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p. 401-411, 2000.
- 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.
- DOBBELAERE, Y.; OKON, Y. The plant growth promoting effect and plant responses. In: ELMERICH C.; NEWTON W.E., Eds, **Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 2007, p. 1–26.
- DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em associação com gramíneas. In.: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas : SBCS, p. 173-180, 1992.
- DÖBEREINER, J. Isolation and identification of root associated diazotrophs. **Plant and Soil** v.110, p.207-212, 1988.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa-SPI, Brasília, 1995. 60 p.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M.; DART, P.J. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* association. **Journal of General Microbiology**, v.71, p.103-116, 1972.
- DOHLEMAN, F.G.; HEATON, E.A.; LEAKEY, A.D.B.; LONG, S.P. Does greater leaf-level photosynthesis explain the larger solar energy conversion efficiency of miscanthus relative to switchgrass? **Plant, Cell & Environment**, v. 32,p. 1525–37,2009
- DOMMERCUYES, Y.; ALANDREAJU, B.; INAUDOG, R.; WEINHARD, P. Non-symbiotic nitrogen fixation in the rhizospheres of rice, maize and different tropical grasses. **Soil Biology and Biochemistry** v.5, p. 83-89, 1973.
- DUINEVELD, B.M., KOWALCHUK, G.A.; KEIJZER, A.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VEEN, J.A. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.172–178, 2001.
- EADY, R.R.; ROBSON, R.L.; RICHARDSON, T.H.; MILLER, R.W.; HAWKINS, M. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*: Purification and properties of the VFe protein. **Biochemical Journal**, v.15, p.197–207, 1987.
- ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v 51, p.17–26. 2001.

- EL-BASSAM, N. Energy plant species: Their use and impact on environment and development. In: EL BASSAM N., BEHL R.K., PROCHNOW B (Eds.) **Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry**. James and James (Science Publishers) Ltd., UK, 167-171, 1998.
- ELSAYED, M.A.; MATTHEWS, R.; MORTIMER, N.D. Production of ethanol from sugar beet (Appendix Q). In: ELSAYED, M. A.; MATTHEWS, R.; MORTIMER, N. D. **Carbon and energy balance for a range of biofuels options**. Sheffield: Sheffield Hallam University, 2003. 341 p.
- ERCOLI, L.; MARIOTTI, M.; MASONI, A.; BONARI, E. Effect of irrigation and nitrogen fertilization on biomass yield and efficiency of energy use in crop production of *Miscanthus*. **Field Crops Research**, v.63, p. 2–11,1999.
- FAY, P. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.56, p.340–373, 1992.
- FERREIRA, J. S. **Qualidade de inoculante, inoculação e reinoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em duas variedades de arroz irrigado**. 2008. 83f. Tese de (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008.
- FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; REIS, V.M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HOFMANN, A.; MARTINEZ-ROMERO, E.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, A. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant and Soil** DOI 10.1007/s11104-011-0812-0. 2011.
- FOLLETT, J.R.; FOLLETT, R.F. Utilization and metabolism of nitrogen by humans. In: FOLLETT, R.; HATFIELD, J.L. (eds), **Nitrogen in the Environment: Sources, Problems and Management**. Elsevier, New York, 2001. p. 65–92.
- FRANKE-WHITTLE, I.H.; FEGAN, M.; HAYWARD, C.; LEONARD, G.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L.I. Description of *Gluconacetobacter sacchari* sp. nov., a new species of acetic acid bacterium isolated from the leaf sheath of sugar cane and from the pink sugar-cane mealy bug. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.1681-1693, 1999.
- 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.271, p. 285-295, 2005.
- FURUSHITA, M.; SHIBA, T.; MAEDA, T.; YAHATA, M.; KANEOKA, A.; TAKAHASHI, Y.; TRII, K.; HASEGAWA, T.; OHTA, M. Similarity of tetracycline resistance genes applied isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5336–5342, 2003.
- GAMALERO, E.; GLICK, B. R. Ethylene and Abiotic Stress Tolerance in Plants In: AHMAD, P.; PRASAD, M.N.V. **Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change**, 2012.p. 395-412.
- GAUTHIER, D.L.; DIEM, H.G.; DOMMERGUES, Y. I *In vitro* nitrogen fixation by two actinomycete strains isolated from Casuarina nodules. **Applied and Environmental Microbiology**,v.14, p.306-308, 1981.
- GIRAUD, E.; MOULIN, L.; VALLENET, D.; BARBE, V.; CYTRYN, E.; AVARRE, J.C.; JAUBERT, M.; SIMON, D.; CARTIEAUX, F.; PRIN, Y.; BENA, G.; HANNIBAL, L.; FARDOUX, J.; KOJADINOVIC, M.; VUILLET, L.; LAJUS, A.; CRUVEILLER, S.; ROUY, Z.; MANGENOT, S.; SEGURENS, B.; DOSSAT, C.; FRANCK, W.L.; CHANG, W.S.;

- SAUNDERS, E.; BRUCE, D.; RICHARDSON, P.; NORMAND, P.; DREYFUS, B.; PIGNOL, D.; STACEY, G.; EMERICH, D.; VERMÉGLIO, A.; MÉDIGUE, C.; SADOWSKY, M. Legumes symbioses: absence of nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. **Science**, v.316, p.1307–1312, 2007.
- GLICK, B.R.; PATTEN, C.L.; HOLGIN, G.; PENROSE, D.M. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. **Imperial College Press**, 1999. p. 267.
- GLICK, B.R.; TODOROVIC, B.; CZARNY, J.; CHENG, Z.; DUAN, J.; MCCONKEY, B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.26 p. 227–242, 2007.
- GONÇALVES, C.A.; COSTA, L.C. Adubação orgânica, frequência de corte de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*. Schum, cv. Cameroon) em Porto Velho, Rondônia. **Revista Lavoura Arrozeira**, v. 44, p.27-29, 1991.
- GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; KWON, S. W.; WEON, H.Y.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbial Ecology**, v.55, p. 21-37, 2008.
- GUIMARÃES, S. L.; CAMPOS, D. T. S.; BALDANI, V. L. D.; JACOB-NETO, J. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em cultivares de arroz. **Revista Caatinga**. Mossoró, v. 23, n. 4, p. 32-39, 2010
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v.245,p.83-93, 2002
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; MATHAN, N.; REDDY, P.M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J.K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p. 2634-2645, 2001.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.
- HAMEEDA, B.; RUPELA, O.P.; REDDY, G.; SATYAVANI, K. Application of plant growth-promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v.43,p. 221-227, 2006.
- HARDOIM, P.R.; ANDREOTE, F.D.; REINHOLD-HUREK, B.; SESSITSCH, A.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. **FEMS Microbiology Ecology**, v.77, p.154–164, 2011.
- HARTMANN, A.; BASHAN, Y. Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB). **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.1-122, 2009.
- HATCH, MD. C₄ photosynthesis, a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biochimica et Biophysica Acta*, v.895,p.81–106,1987.
- HAVLIN, J.; BEATON, J. D.; TISDALE, S. L.; NELSON, W. L. Soil fertility and fertilizers: an introduction nutrient management. Upper Saddle River: **Prentice Hall**. 1999. p.499.
- HEFFER, D.M.; PRUD'HOMME 79th IFA Annual Conference, Montreal, May 2011“Fertilizer Outlook 2011 - 2015” **Disponível em www.fertilizer.org**
- HILL, G.M.; GATES, R.N.; WEST, J.W.; BURTON, G.W. Tifton 85 bermudagrass utilization in beef, dairy, and hay production. In: **workshop sobre o potencial forrageiro do gênero Cynodon, Anais... Juiz de Fora: Embrapa-CNPGL**, p.140-150,1996.

- HUNGRIA M. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo . – Londrina: **Embrapa Soja**, 2011. 36p. – (Documentos / Embrapa Soja)
- HUREK, T.; HANDLEY, L.; REINHOLD-HUREK, B.; PICHÉ, Y. *Azoarcus*, grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.15, p.233–242, 2002.
- HUREK, T.; WAGNER, B.; REINHOLD-HUREK, B.; Identification of N₂-fixing plant- and fungus-associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4331-4339, 1997.
- IDRIS, R.; TRIFONOVA, R.; PUSCHENREITER, M.; WENZEL, W.W.; SESSITSCH, A. Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thlaspi goessingense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.2667–2677, 2004.
- IKEDA ,S.; KANEKO, T.; OHKUBO, T.; RALLOS, L.E.; EDA, S.; MITSUI, H.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; MINAMISAWA, K. Development of a bacterial cell enrichment method and its application to the community analysis in soybean stems. **FEMS Microbiology Ecology**, v.58, p.703-714, 2009.
- ILMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic calcium phosphates - solubilization mechanisms. **Soil Biology & Biochemistry**, v.27, p. 257-263, 1995.
- İNCEOĞLU, Ö.; AL-SOUD, W.A.; SALLES, J.F.; SEMENOV, A.V.; VAN ELSAS, J.D. Comparative analysis of bacterial communities in a potato field as determined by pyrosequencing. **PLoS ONE**, v.6, e23321. doi:10.1371/journal.pone.0023321, 2011.
- IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. Greenhouse Gas Inventory Programme. **Guidelines for national greenhouse gas inventories**. Hayama, Japan: Institute for Global Environmental Strategies, 2006. Disponível em: <<http://www.ipcc-nggi.iges.or.jp/public/2006gl>>
- ISLAM, M.R.; MADHAIYAN, M.; BORUAH, H.P.D.; YIM, W.; LEE, G.; SARAVANAN, V.S.; FU, Q.; HU, H.; SA, T. Characterization of plant growth-promoting traits of free-living diazotrophic bacteria and their inoculation effects on growth and nitrogen uptake of crop plants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.1213–1222, 2009.
- JACQUES, A.V.A. Caracteres morfo-fisiológicos e suas implicações com o manejo. In: **Capim-elefante: Produção e Utilização**. Coronel Pacheco, T: EMBRAPA, CNPGL, p.31-48, 1994.
- JAMES E.K.; OLIVARES F.L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.17, p.77–119, 1998.
- JHA, B.; THAKURA, M. C.; GONTIA, I.; ALBRECHT, V.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.62-72, 2009.
- JOERGER, R.D.; BISHOP, P.E. Nucleotide sequence and genetic analysis of the nifB-nifQ region from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 1475- 1487, 1988.
- 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.

- KAMKE, J.; TAYLOR, M.W.; SCHMITT, S. Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNA vs 16S rRNA gene comparisons. **ISME Journal**, v.4, p.498–508, 2010.
- KANG, S.C.; HA, C.G.; LEE, T.G.; MAHESHWARI, D.K. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil inhabiting fungus *Fomitopsis* sp. PS 102. **Current Science**, v.82, p.439-442, 2002.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.32, p. 210–220, 2006.
- KATIVU, S, MITHEN, R. *Pennisetum* in Southern Africa. **Plant Genetic Resources**, v. 73, p. 1-8,1987.
- KAUTER, D.; LEWANDOWSKI, I.; CLAUPEIN, W. Quantity and quality of harvestable biomass from *Populus* short rotation coppice for solid fuel use – a review of the physiological basis and management influences. **Biomass and Bioenergy**, v. 24, p.411–427, 2003.
- KEMBEL, S.W.; EISEN, J.A.; POLLARD, K.S.; GREEN, J.L. The Phylogenetic Diversity of Metagenomes. **PLoS ONE** v. 6, e23214. 2011 doi:10.1371/journal.pone.0023214
- KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; WANI, P.A.; AHMAD, M.; OVES, M. Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria. In: KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (ed) **Microbial Strategies for Crop Improvement**, Springer, Berlin, 2009. pp 105-132.
- KIM, K.Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G.A. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria, and microbial activity in soil: effect of carbon sources. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.995-1003, 1998.
- KIM, S.; DALE, B.E."Life cycle assessment of fuel ethanol derived from corn grain via dry milling." **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5250- 5260, 2008.
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing a bacterial species that occurs in C₄-fibre plants. **International Journal of Systematics Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 157-168, 2001.
- KIRCHHOF, G.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; ECKERT, B.; DÖBEREINER, J.; HARTMANN, A. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil**, v.104, p.45-55, 1997a.
- KIRCHHOF, G.; SCHLOTTER, M.; ABMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. **Soil Biology e Biochemistry**, v.29, p.853-862, 1997b.
- KNAUTH, S.; HUREK, T.; BRAR, D.; REINHOLD-HUREK, B. Influence of different *Oryza* cultivars on expression of *nifH* gene pools in roots of rice. **Environmental Microbiology**, v.7, p.1725-1733, 2005.
- KNEIP, C.; LOCKHART, P.; VOß, C.; MAIER, U.G. Nitrogen fixation in eukaryotes – new models for symbiosis. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, p.55, 2007.
- KNUPP, A.M.; MARTINS., C.M.; FARIA., J.C. de; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Comunidade bacteriana como indicadora do efeito de feijoeiro geneticamente modificado sobre organismos não alvo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, pp. 1692-1699, 2009.
- KONGSHAUG, G. 1998. Energy Consumption and Greenhouse Gas Emissions in Fertilizer Production. IFA Technical Conference, Marrakech, Morocco, 1998, 18pp.

- KUMAR, V.; NARULA, N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, 301–305, 1999.
- LADHA, J.K.; SO, R.B. Numerical taxonomy of photosynthetic rhizobia nodulating *Aeschynomene* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.62-73, 1994.
- LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M., eds., **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York, NY, 1991. pp. 115-175.
- LEACH, A.W.; MUMFORD, J.D. Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. **Environmental Pollution** v.151, p.139–147, 2008.
- LERNER, A.; VALVERDE, A.; CASTRO-SOWINSKI, S.; LERNER, H.; OKON, Y.; BURDMAN, S. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* exposed to starvation. **Environmental Microbiology**, v.2, p.1758-2229, 2010.
- LI, Y.H.; LIU, Q.F.; LIU, Y.; ZHU, J.N.; ZHANG, Q. Endophytic bacterial diversity in roots of *Typha angustifolia* L. in the constructed Beijing Cuihu Wetland (China) **Research in Microbiology**, v.162, p.124-131, 2011.
- LILLIS, L.; DOYLE, E.; CLIPSON, N. Comparison of DNA and RNA-based bacterial community structures in soil exposed to 2,4-dichlorophenol. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p.1883–1893, 2009.
- LINDSTRÖM, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research in Microbiology**, v.161, p.453–463, 2010.
- LOGANATHAN, P.; SUNITA, R.; PARIDA, A.K.; NAIR, S. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.167-172, 1999.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ROGEL, M.A.; ORMENO-ORRILLO, E.; MARTINEZ-ROMERO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Phaseolus vulgaris* seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as *Rhizobium endophyticum* sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, p.322–327, 2010.
- LOVELESS, T.M.; SAAH, J.R.; BISHOP, P.E. Isolation of nitrogen-fixing bacteria containing molybdenum-independent nitrogenases from natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p. 4223-4226, 1999.
- LOVELL, C.R.; DECKER, P.V.; BAGWELL, C.E.; THOMPSON, S.; MATSUI, G.Y. Analysis of a diverse assemblage of diazotrophic bacteria from *Spartina alterniflora* using DGGE and clone library screening. **Journal of Microbiological Methods**, v.73, n.2, p.160-171. 2008.
- MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E..M Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.250–258, 2010.
- MÅRTENSSON, L.; DÍEZ, B.; WARTIAINEN, I.; ZHENG, W.W.; EL-SHEHAWY, R.; RASMUSSEN, U. Diazotrophic diversity, *nifH* gene expression and nitrogenase activity in a rice paddy field in Fujian, China. **Plant and Soil**, v.325, p.207–218, 2009.

- MARTINELLI, L.A.; VICTORIA, R.L.; TRIVELIN, P.C.O.; DEVOL, A.H.; RICHEY, J.E. ^{15}N natural abundance in plants of the Amazon river floodplain and potential atmospheric N_2 fixation. **Oecologia**, v.90, p.591-596, 1992.
- MASSON-BOIVIN C, GIRAUD E, PERRET X, BATUT J Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? **Trends in Microbiology**, v.17, p.458–466, 2009.
- MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans* and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v.51, p.326-335, 2006.
- MEHTA, S.; NAUTIYAL, C.S. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. **Current Microbiology**, v.43, p.51-56, 2001.
- MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B. Microrganismos e disponibilidade de Fósforo (P) nos solos: uma análise crítica.: **Documentos 85**. Embrapa Cerrados, Planaltina -DF, 2003.
- MENGONI, A.; TATTI, E.; DECOROSI, F.; VITI, C.; BAZZICALUPO, M.; GIOVANNETTI, L. Comparison of 16S rRNA and 16S rDNA T-RFLP approaches to study bacterial communities in soil microcosms treated with chromate as perturbing agent. **Microbial Ecology**, v.50, p.375-84, 2005.
- MIYAMOTO, S.T.; LOMBARDI JR, I.; BERG, K.O.; RAMOS, L.R.; NATOUR, J. Brazilian version of the Berg balance scale. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1411-1421, 2004.
- MONTEITH, J.L. Reassessment of maximum growth rates of C_3 and C_4 crops. **Experimental Agriculture**, v.14, p. 1–5, 1978.
- MOORE, F.P.; BARAC, T.; BORREMANS, B.; OEYEN, L.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D.; CAMPBELL, D.; MOORE, E.R.B. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.539–556, 2006.
- MORAIS, R.F.; QUESADA, D. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.) **Plant Soil** DOI 10.1007/s11104-011-0944-2. 2011.
- MORAIS, R. F.; SOUZA, B.J.; LEITE, J.M.; SOARES, L.H.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Elephant grass genotypes for bioenergy production by direct biomass combustion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.133-140, 2009.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626p.
- MOZZER, O.L. 1993. **Capim-elefante - Curso de Pecuária Leiteira**. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL. 2.ed. (Documentos n. 43).
- MUÑOZ-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.; KANG, U. G.; PARK, K. D.; JEON, W.-T.; PARK, C. Y.; CHO, Y. S.; KWON, S.-W.; SONG, J.; ROH, D.-H.; REVATHI, G. Enumeration, isolation and identification of diazotrophs from Korean wetland rice varieties grown with long-term application of N and compost and their short-term inoculation effect on rice plants. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p.981–991, 2007.

- MUYZER, G.; DE WAAL E.C.; UITTERLINDEN A.G. Profiling of complex microbial communities 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.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.73, p.127-141, 1998.
- NAYAK, B.S.; BADGLEY, B.; HARWOOD, V.J. Comparison of genotypic and phylogenetic relationships of environmental Enterococcus isolates by BOX-PCR typing and 16S rRNA gene sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.5050-5055, 2011.
- NICOL, G.W.; GLOVER, L.A.; PROSSER, J.I. The impact of grassland management on archaeal community structure in upland pasture rhizosphere soil. **Environmental Microbiology**, v.5, p.152–162, 2003.
- NOUIOUI, I.; GHODHBANE-GTARI, F.; BEAUCHEMIN, N.J.; TISA, L.S.; GTARI, M. Phylogeny of members of the Frankia genus based on gyrB, nifH and glnII sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v.100, p.579-87, 2011.
- NUNES, F.S.; RAIMONDI, A.C.; NIEDWIESKI, A.C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. **Química Nova**. v.26, p.872-879, 2003.
- NZOUE A, MICHE L, KLONOWSKA A, LAGUERRE G, DELAJUDIE P.; MOULIN, L. Multilocus sequence analysis of bradyrhizobia isolated from *Aeschynomene* species in Senegal. **Systematic and Applied Microbiology**, v.32, p.400–412, 2009.
- OKON, Y., LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*. In: RYDER, M.H., STEPHENS, P.M., BOWEN, G.D. (Eds.), **Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria**. Common wealth Scientific and Industrial Research Organization, Adelaide, Australia, 1994. p. 274–278.
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants, **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.366-370, 1997.
- OLIVARES F.L., JAMES E.K. Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in sugar cane plants. In: PEDROSA, FO, HUNGRIA, M, YATES, T, NEWTON, WE, eds. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer, p.413–414, 2000.
- OLIVARES, F. L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.* Híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. 1997. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 1997.
- OLIVARES, F. L. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p. 33 - 34, 2009.
- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂ –fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and soil**, v. 242, p. 205-215, 2002.
- OLSEN, G.J.; WOESE, C.R.; OVERBEEK, R The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.1-6, 1994.
- ORR, C.; JAMES, A.; LEIFERT, C.; COOPER, J.M.; CUMMINGS, S.P. Diversity and function of free-living nitrogen fixing bacteria and total bacteria in organic and

- conventionally managed soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.911-919, 2011.
- OSBORNE, C.A.; GALIC, M.; SANGWAN, P.; PANSEN, P.H. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers. **FEMS Microbiology Letters**, v.248, p.183–187, 2005.
- OSORIO, N.W. Effectiveness of phosphate solubilizing microorganisms in increasing plant phosphate uptake and growth in tropical soils In: MAHESHWARI D.K. (ED). **Bacteria in Agrobiolology: Plant Nutrient Management** (Volume III). Springer-Verlag Berlin, 2011. P.65-80.
- PACE, N. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v.274, p.734 - 740, 1997.
- PARIONA-LLANOS, R.; IBAÑEZ DE SANTI, F.F.F.; SOTO GONZALES, H.H.; BARBOSA, H.R. Influence of organic fertilization on the number of cultivable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. **European Journal of Soil Biology**, v.46, p.387-393, 2010.
- PARK, J. H., BOLAN, N., MEGHARAJ, M., & NAIDU, R. Concomitant rock phosphate dissolution and lead immobilization by phosphate solubilizing bacteria (*Enterobacter* sp.). **Journal of Environmental Management**, v.92, p.1115–1120, 2011.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42,p. 207-220,1996.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. The role of bacterial indoleacetic acid in the development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3795-3801, 2002.
- PEDRAZA, R.O.; RAMÍREZ-MATA, A.; XIQUI, M.; BACA, B.E. Aromatic amino acid aminotransferase activity and indole-3-acetic acid production by associative nitrogen-fixing bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v.233, p.15–21. 2004.
- PENG, G.; ZHANG, W.; LUO, H.; XIE, H.; LAI, W.; TAN, Z. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, p.1650-1655, 2009.
- PEREIRA E SILVA, M.C.; SEMENOV, A.V.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.77, p.57–68, 2011.
- PEREIRA, A.V. Escolha de variedade de capim-elefante. In: **Simpósio sobre manejo de pastagem**, 10, Piracicaba. Anais... Piracicaba: ESALQ, 1993. p.47-62.
- PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES, V. G.; BALDANI, J.I.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1931-1937, 2006.
- PERRINE-WALKER, F.; GHERBI, H.; IMANISHI, L.; HOCHER, V.; GHODHBANE-GTARI, F.; LAVENUS, J.; BENABDOUN, F.M.; NAMBIAR-VEETI, M.; SVISTOONOFF, S.; LAPLAZE, L. Symbiotic signaling in actinorhizal symbioses. **Current Protein & Peptide Science**, v.12, p.156–164, 2011.
- PICENO, Y.M.; NOBLE, P.A.; LOVELL, C.R. Spatial and temporal assessment of diazotroph assemblage composition in vegetated salt marsh sediments using denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Microbial Ecology**, v.38, p.157–167, 1999.

- PODILE, A.R.; KISHORE, G.K. Plant growth promoting rhizobacteria. In: GNANAMANICKAM, S.S. E(D) **Plant Associated Bacteria**. Netherlands: Springer. pp. 195–230, 2006.
- 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.
- PRAKAMHANG, J.; MINAMISAWA, K.; TEAMTAISONG, K.; BOONKERD, N.; TEAUMROONG, N. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Applied Soil Ecology**, v.42, p.141-149, 2009.
- QUESADA D.M., **Parâmetros quantitativos e qualitativos da biomassa de genótipos de Capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) com potencial para uso energético, na forma de carvão vegetal. 2005.** 65f. Tese (Doutorado em Agronomia Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2005
- RADWAN, T.E.E.; MOHAMED, Z.K.; REIS, V.M. Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. **Symbiosis**, v. 32, p.39–54, 2002.
- RASCHE F, TRONDL R, NAGLREITER C, REICHENAUER TG, SESSITSCH A Chilling and cultivar type affect the diversity of bacterial endophytes colonizing sweet pepper (*Capsicum annum* L.). **Canadian Journal of Microbiology**, v.52, p.1036–1045, 2006.
- RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, C.R. BLANKENSHIP, R.E. The natural history of nitrogen fixation. *Molec. Molecular Biology and Evolution*, v.21, p.541-554, 2004.
- REHDER, D. Structure and function of vanadium compounds in living organisms. **Biometals**, v.5, p. 3–12,1992.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Reassessment of the taxonomic structure of the diazotrophic genus *Azoarcus* sensu lato and description of three new genera and new species, *Azovibrio restrictus* gen. nov., sp. nov., *Azospira oryzae* gen. nov., sp. nov. and *Azonexus fungiphilus* gen. nov., sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.50, p.649-659, 2000.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.435-43, 2011.
- REIS JUNIOR, F. B. **Ecologia e diversidade de bactérias do gênero *Azospirillum* em associação com pastagens de *Brachiaria* spp..** 2002. 97p. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- REIS, V. M.; REIS JUNIOR, F.B.; SALES, J.F.; SCHLOTTER, M. Characterisation of different polyclonal antisera to quantify *Herbaspirillum* spp. in Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Symbiosis**, v. 29, p.139–150, 2000.
- REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F.; HIPOLITO, G.; OLIVEIRA, R. P.; MORAES, R. F.; LEITE, J. M.; SCHUTZ, N.; BAPTISTA, R B. **Eficiência agrônômica do inoculante de cana-de-açúcar aplicado em três ensaios conduzidos no Estado do Rio de Janeiro durante o primeiro ano de cultivo.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009, 22 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 45).
- REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M.F.; FERREIRA, A.C.; REIS JÚNIOR, F.B.; SALLES, J.F.; WEBER, O.B. **Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas.** Seropédica, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1997. 11p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 30)

- REIS, V.M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J.I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2155–2162, 2004.
- REIS, V.M.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M.S., ed. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciências do Solo. 2006. p.153-172.
- REIS, V.M.; REIS JUNIOR, F.B.; QUESADA, D.M.; OLIVEIRA, O.C.A.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation associated with tropical pasture grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28. p.837-844, 2001.
- RIGGS, P.J.; CHELIUS, M.K.; INIGUEZ, A.L.; KAEPLER, S.M.; TRIPLETT, E.W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 829-836, 2001.
- RODRIGUES, E.P. Isolamento e caracterização de mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* defectivos na produção de auxinas. **Tese (Doutorado em Agronomia, área de concentração em Biotecnologia vegetal)** - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. p.142,. 2008.
- RODRIGUES, L. da S.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Diversity of endophytic diazotrophic bacteria of the genus *Herbaspirillum* and *Burkholderia* in wetland rice. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, p.275-284, 2006.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**,v.17, p.319-339, 1999.
- ROESCH, L.F.W.; OLIVARES, F.L.; PASSAGLIA, L.M.P.; SELBACH, P.A.; SA, E.L.S.; CAMARGO, F.A.O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen supply. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.967-974, 2006.
- ROESCH, L.F.W.; CAMARGO, F.A.O.; BENTO, F.M.; TRIPLETT, E.W. Biodiversity of diazotrophic bacteria within the soil, root and stem of field-grown maize. **Plant and Soil**, v.302, p.91–104, 2008.
- ROY, B.D.; DEB, B.; SHARMA, G.D. Role of acetic acid bacteria in biological N₂ fixation-A Review. **Biofrontiers**, v.1, p.47-57. 2010.
- SABINO, D.C.C. **Interação planta-bactéria diazotrófica na cultura do arroz**. 2007. 71p. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- SAHARAN, B.S.; NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Sciences and Medicine Research**, v.21, p.1-30, 2011.
- SAIKIA, S.P.; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma? **Current Science**, v.92, p.317–322, 2007.
- SALA, V.M.R.; CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, J.G.; SILVEIRA, A.P.D. Response of wheat genotypes to inoculation with diazotrophic bacteria under field conditions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.833-842, 2007.

- SALAMONE, I.E.G. de; DI SALVO, L.P.; ORTEGA, J.S.E.; BOA SORTE, P.M.F.; URQUIAGA, S.; TEIXEIRA, K.R. dos 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.
- SALLES, J.F.; DE SOUZA, F.A.; VAN ELSAS, J.D. Molecular method to assess the diversity of *Burkholderia* species in environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1595–1603, 2002.
- SAMSON, R.; MANI, S.; BODDEY, R.; SOKHANSANJ, S.; QUESADA, D.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; HO LEM, C. The potential of C₄ perennial grasses for developing a global BIOHEAT industry. **Critical reviews in plant sciences**, v.24, p.1-35, 2005.
- SANTOS, C.J.A. **Composição mineral, valor protéico e fatores fisiológicos de 4 cultivares de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.), submetidos a duas idades de corte**. Recife: UFRPE, 1994. 107p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1994.
- SARWAR, M.; KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, v.172, p. 261-269, 1995.
- SASHIDHAR, B.; PODILE, A.R. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway glucose dehydrogenase. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.1-12, 2010.
- SCHLOSS, P.D.; WESTCOTT, S.L.; RYABIN, T.; HALL, J.R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E.B.; LESNIEWSKI, R.A.; OAKLEY, B.B.; PARKS, D.H.; ROBINSON, C.J.; SAHL, J.W.; STRES, B.; THALLINGER, G.G.; VAN HORN, D.J.; WEBER, C.F. Introducing MOTHUR: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.23, p.7537-7541, 2009.
- SCHMER, M.R.; VOGEL, K.P.; MITCHEL, R.B.; PERRIN, R.K. Net energy of cellulosic ethanol from switchgrass. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p.464–469, 2008.
- SESHADRI, S.; MUTHUKUMARASAMY, R.; LAKSHMINARASIMHAN, C.; IGNACIMUTHU, S. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. **Current Science**, v.79, p.565-567, 2000.
- SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomyces*-specific PCR of 16S rRNA genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.39, p.23-32, 2002.
- SHANKAR, M.; PONRAJ, P.; ILAKKIAM, D.; GUNASEKARAN, P. Root colonization of a rice growth promoting strain of *Enterobacter cloacae*. **Journal of Basic Microbiology**, v.51, p.523-30, 2011.
- SILVA, M.M.P.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M.; XAVIER, D.F.; DÖBEREINER, J. Screening *Pennisetum* ecotypes (*Pennisetum purpureum*, Schum.) for biological nitrogen fixation. In: BODDEY RM, RESENDE AS (ed.) **Int. Symp. of Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Nitrogen Fixation**. Angra dos Reis, Brazil, 1995. pp 236–237.
- SILVA, J.G.; SERRA, G.E. Energy balance for ethyl alcohol production from crops. **Science**, v.201(8), p. 903–906., 1978.

- SIMPSON, F.B.; BURRIS, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does revert evolution of hydrogen by nitrogenase. **Science**, v.224, p.1095-1097, 1984.
- SOARES, R.A.; ROESCH, L.F.R.; 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.
- SOMERVILLE, C.; YOUNGS, H.; TAYLOR, C.; DAVIS, S.C.; LONG, S.P. Feedstocks for lignocellulosic biofuels. **Science**, v.329, p.790–792, 2010.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y.; Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. In VAN LOON, L. C. (ed) **Advances in Botanical Research**, Burlington: Academic Press, v. 51, p.283-320, 2009.
- SPRENT J. I.; SPRENT P. Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects. **Chapman and Hall**, London , p 266, 1990.
- SPRING, S.; KÄMPFER, P.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Polyphasic characterization of the genus *Leptothrix*: new descriptions of *Leptothrix mobilis* sp. nov. and *Leptothrix discophora* sp. nov. nom. rev. and emended description of *Leptothrix cholodnii* emend. **Systematic and Applied Microbiology**, v.19, p.634–643, 1996.
- STAAL, M.; TE LINTEL-HEKKERT, S.; HARREN, F.; STAL, L. Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: a comparison between batch incubation and on-line monitoring. **Environmental Microbiology**, v.3, p. 343-351, 2001.
- EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.1-42.
- SUMAN, A.; A. GAUR; A.K. SHRIVASTAVA.; R.L. YADAV, 2005. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant Growth Regulation**, v.47, p. 155-162.
- SUNDARA, B.; NATARAJAN, V.; HARI, K. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. **Field Crops Research**, v. 77, p. 43-49, 2002.
- SUR, S.; BOTHR, A.K.; SEM, A. Symbiotic nitrogen fixation-A bioinformatics perspective. **Biotechnology**, v.9 p. 257-273 , 2010.
- TAGHAVI, S.; GARAFOLA, C.; MONCHY, S.; NEWMAN, L.; HOFFMAN, A.; WEYENS, N.; BARAC, T.; VANGRONVELD, J.; VAN DER LELIE, D. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p.748–757, 2009.
- TAKEI, K.; SAKAKIBARA, H.; TANIGUCHI, M.; SUGIYAMA, T. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. **Plant and Cell Physiology**, v.42, p.85-93, 2001.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.2731-2739, 2011.

TAYLOR, S.H.; HULME, S.P.; REES, M.; RIPLEY, B.S.; WOODWARD, F.I.; OSBORNE, C.P. Ecophysiological traits in C₃ and C₄ grasses: a phylogenetically controlled screening experiment. **New Phytologist**, v.185, p. 780–791, 2010.

TCACENCO, F. A.; BOTREL, M. A. Identificação e avaliação de acessos e cultivares de capim-elefante. In: CARVALHO, M. M.; ALVIM, M. J.; XAVIER, D. F.; CARVALHO, L.A. **Capim-elefante: produção e utilização.**: EMBRAPA-CNPGL, Juiz de Fora, p. 1-30, 1997.

TEIXEIRA, K.R.S.; MARIN, V.A.; BALDANI, J.I. **Nitrogenase: bioquímica do processo de FBN.** Documentos 84; Embrapa Agrobiologia, Seropédica., p.25,1998.

TERAKADO-TONOOKA, J.; OHWAKI, Y.; YAMAKAWA, H.; TANAKA, F.; YONEYAMA, T.; FUJIHARA, S. Expressed *nifH* genes of endophytic bacteria detected in field-grown sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.). **Microbes and Environments**, v.23, p.89–93, 2008.

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

TRINGE, S.G.; HUGENHOLTZ, P.A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, p.442–446, 2008.

TRIVEDI, P.; ZHILI, H.; VAN NOSTRAND, J.D.; ALBRIGO, G.; ZHOU, J.; WANG, N. Huanglongbing alters the structure and functional diversity of microbial communities associated with citrus rhizosphere **ISME Journal**, v.6, p.363–383, 2012.

TRUJILLO, M.E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, A.M.; RIVAS, R.; LUDENA, D.; MATEOS, P.F.; MARTINEZ-MOLINA, E. VELASQUEZ, E. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum* lupine. **Applied and Environmental Microbiology**,v. 71, p.1318-1327, 2005.

TURNBAUGH, P.J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B.L.; DUNCAN, A.; LEY, R.E.; SOGIN, M.L.; JONES, W.J.; ROE, B.A.; AFFOURTIT, J.P.; EGHOLM, M.; HENRISSAT, B.; HEATH, A.C.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v.57, p.480-484, 2009.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI T. Remarkable N₂ –fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. **Journal of Bacteriology**, v.177, p.1414-1417, 1995.

VADAS, P.A.; BARNETT, K.H.; UNDERSANDER, D.J. Economics and energy of ethanol production from alfalfa, corn and switchgrass in the Upper Midwest, USA. **BioEnergy Research**, v.1, p.44-55, 2008.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, p.435–440, 2003.

VEIGA, J. B.; MOTT, G. D.; RODRIGUES, L. R. A. et al. Capim-elefante ano sob pastejo. I. Produção de forragem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.20, n.8, p.929-936, 1985.

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 Cellular Biology**, v.5, p.25-40. 1994.

- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v. 255, p.571-586, 2003.
- VESSEY, J.K.; PAWLOWSKI, K.; BERGMAN, B. Root-based N₂-fixing symbiosis: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and *Cycads*. **Plant and Soil**, v.266, p 205-230, 2004.
- VIDEIRA, S.S.; ARAÚJO, J.L.S.; RODRIGUES, L.S.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Occurrence and diversity of nitrogen-fixing *Sphingomonas* bacteria associated with rice plants grown in Brazil. **FEMS Microbiology Letters**, v.293, p.11-19, 2009.
- VIDEIRA, S.S.; OLIVEIRA, D.M.; MORAIS, R.F.; BORGES, W.L.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil** (2011) DOI: 10.1007/s11104-011-1082-6
- VOLLÚ, R.E.; BLANK, A.F.; SELDIN, L.; COELHO, M.R.R. Molecular diversity of nitrogen-fixing bacteria associated with *chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty (vetiver). an assential oil producer plant. **Plant and Soil**, 2011. DOI: 10.1007/s11104-011-0801-3
- VON CAEMMERER, S.; FURBANK, R.T. The C₄ pathway: an efficient CO₂ pump. **Photosynthesis Research**, v. 77, p.191–2003, 2003.
- WAGNER, R. The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. **Archives of Microbiology**, v.161, p.100–109, 1994.
- WANG, Q.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M.; COLE, J.R. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.5261-5267, 2007.
- WANG, R.F.; CAO, W.W.; CERNIGLIA, C.E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.341-343, 1996.
- WARTIAINEN, I.; ERIKSSON, T.; ZHENG, W.; RASMUSSEN, U. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy-*nifH* PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. **Applied Soil Ecology**, v.39, p.65-75, 2008.
- WEINERT, N.; PICENO, Y.; DING, G.C.; MEINCKE, R.; HEUER, H.; BERG, G.; SCHLOTTER, M.; ANDERSEN, G.; SMALLA, K. PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in the rhizosphere of different potato cultivars: many common and few cultivar-dependent taxa. **FEMS Microbiology Ecology**, v.75, p.497-506, 2011.
- WELCH, S.A.; TAUNTON, A.E.; BANFIELD, J.F. Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. **Geomicrobiology Journal**, v. 19, p.343-367, 2002.
- WU, S.C.; CAO, Z.H.; LI, Z.G.; CHEUNG, K.C.; WONG, M.H. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. **Geoderma**, v.125, p.155–166, 2005.
- XAVIER, D.F.; BOTREL MA; VERNEQUE, R.S.; FREITAS, V.P.; BODDEY, R.M. Estabilidade da produção de forragem de cultivares de capim-elefante em solo com baixa disponibilidade de nitrogênio. **Pasturas tropicales**, v.20 p.35–40, 1998.
- XIN, G.; ZHANG, G.Y.; KANG, J.W.; STALEY, J.T.; DOTY, S.L. A diazotrophic, indole-3-acetic acid-producing endophyte from wild cottonwood. **Biology and Fertility of Soils**, v.45, p.669–674, 2009.
- YAMADA, Y.; HOSHINO, K.; ISHIKAWA, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16s ribosomal RNA: the elevation of the subgenus

Gluconoacetobacterium to generic level. **Bioscience Biotechnology e Biochemistry**, 61:1244-1251, 1997.

YANG, C.H.; CROWLEY D.E.; BORNEMAN, J.; NKEEN, T. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, p.3889-3894, 2001.

YANO, D.M.Y.; FARRIS, M.G.; UMINO, C.Y.; COUTINHO, H.L.C.; CANHOS, V.P. **Técnicas para cultivo, identificação e preservação de bactérias**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, 1993. 64p.

YAZDANI, A.; A.R. ANITA; K.S. HAYATI ; M.Y. ADUN, 2009. **Association between awkward posture and musculoskeletal symptom among automobile assembly line workers in Malaysia**. **Proceeding of the National Symposium on Advancements in Ergonomics and Safety (Ergosym)**, Dec. 1-2, Universiti Malaysia Perlis, Venue. <http://publicweb.unimap.edu.my/~ergosym2009/callforpapers.htm>

ZEHR, J.P. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. **Trends in Microbiology**, v.19, p.162-732, 2011.

ZEHR, J.P.; BENCH, S.R.; MONDRAGON, E.A.; MCCARREN, J.; DELONG, E.F. Low genomic diversity in tropical oceanic N₂-fixing cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, p.17807–17812, 2007.

ZEHR, J.P.; McREYNOLDS, L.A. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the *nifH* gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.2522–2526, 1989.

ZHANG, G.X.; PENG, G.X.; WANG, E.T.; YAN, H.; YUAN, Q.H.; ZHANG, W.; LOU, X.; WU, H.; TAN, Z.Y. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. **Archives of Microbiology**, v.188, p. 431-9, 2007.

ZILLI, J.É.; BOTELHO, G.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Efeito de glyphosate e imazaquin na comunidade bacteriana do rizoplano de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e em características microbiológicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.633-642, 2008.

ZUCKERMANN, H.; STAAL, M.; STAL, L. J.; REUSS, J.; HEKKERT S TE, L., HARREN F.; PARKER, D. On-line monitoring of nitrogenase activity in *Cyanobacteria* by sensitive laser photoacoustic detection of ethylene **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4243 - 4251, 1997.

9 ANEXOS

Frequência dos grupos bacterianos baseado no gene 16S rRNA em raiz (R) e colmo (S) de 3 genótipos de Capim-elefante: Cameroon (G1), Roxo (G4) e CNPGL91F06-3 (G5).

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	RG1	RG2	RG3	SG1	SG2	SG3	Raiz	Colmo	Total				
Acidobacteria	Gp1	-	-	Gp1	2		3			1	5	1	6				
				Gp3	4	2	1	1		7	1	8					
Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus	2					3	2	3	5				
				Streptococcus			3	2		5		5					
Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	Sediminibacterium					2	6		8	8				
Actinobacteria	Actinobacteridae	Actinomycetales	Actinomycetaceae	Actinomyces						2		2	2				
				Actinosynnemataceae	Actinosynnema	1	4	1				6		6			
					Lechevalieria	1					1		1				
					Lentzea	1					1		1				
					Gordoniaceae	Gordonia				1		1	1				
					Kineosporiaceae	Quadrisphaera			1		2		3				
					Microbacteriaceae	Curtobacterium			1				1				
						Microbacterium					2		2				
					Micromonosporaceae	Actinoplanes		1	12	8			21	21			
					Mycobacteriaceae	Mycobacterium			2				2				
					Nocardioideae	Aeromicrobium					3		3				
					Promicromonosporaceae	Cellulosimicrobium					1		1				
					Propionibacteriaceae	Propionibacterium						1	1				
					Pseudonocardiaceae	Amycolatopsis		1	7	3			11				
						Crossiella			1				1				
						Kibdelosporangium		1					1				
						Kutzneria			2				2				
						Streptomycetaceae	Streptacidiphilus				1		1				
							unclassified_Acidimicrobineae				2		2				
							unclassified_Actinobacteria		1			2	1	2			
							unclassified_Actinosynnemataceae		1				1				
						Acidimicrobiales	Iamiaceae	Iamia				1		1			
					Rubrobacteridae	Solirubrobacterales	Conexibacteraceae	Conexibacter	1	3	8	3	2	2	12	7	19
							Solirubrobacteraceae	Solirubrobacter	1	5	2	1	3	1	8	5	13
								unclassified_Solirubrobacterales			2	1			2	1	3
							Microbacteriaceae	unclassified_Microbacteriaceae						1		1	1
				Proteobacteria	Alpha	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Bosea	1						1		1
Bradyrhizobium	9		3					9	8	10	12	27	39				
Brucellaceae	Ochrobactrum	1	1									2		2			
Hyphomicrobiaceae	Prosthecomicrobium	1										1		1			
Methylobacteriaceae	Methylobacterium								2	5	3		10	10			
Phyllobacteriaceae	Aminobacter	1										1		1			
	Mesorhizobium	2						2			3	4	3	7			
	Rhizobiaceae	Rhizobium	1					6	3	1			10	1	11		
	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	Inquilinus						1					1		1	

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	RG1	RG2	RG3	SG1	SG2	SG3	Raiz	Colmo	Total
				<i>Phaeospirillum</i>	1						1		1
				<i>Skermanella</i>		4					4		4
		<i>Caulobacterales</i>	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	2	1			1		3	1	4
				<i>Geminicoccus</i>	1						1		1
		<i>Sphingomonadales</i>	<i>Sphingomonadaceae</i>	<i>Sphingomonas</i>	1			3		2	1	5	6
				<i>unclassified_Alphaproteobacteria</i>	4		1	16	18	6	5	40	45
<i>Beta</i>		<i>Burkholderiales</i>	<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Azohydromonas</i>	0		1				1		1
			<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	9		5	12	15	13	14	40	54
				<i>Ralstonia</i>	1			1			1	1	2
			<i>Burkholderiales_incertae</i>	<i>Aquabacterium</i>	1			1	3		1	4	5
				<i>Ideonella</i>						1		1	1
				<i>Leptothrix</i>	18		4	14	21	20	22	55	77
			<i>Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax</i>	1			3		4	1	7	8
				<i>Pelomonas</i>	1		1	1			2	1	3
				<i>unclassified_Comamonadaceae</i>		2			1		2	1	3
			<i>Oxalobacteraceae</i>	<i>Collimonas</i>				1				1	1
				<i>Herminiimonas</i>					1			1	1
				<i>Massilia</i>		1	1				2		2
				<i>unclassified_Oxalobacteraceae</i>					2	1		3	3
				<i>unclassified_Betaproteobacteria</i>					1			1	1
				<i>unclassified_Burkholderiales_incertae</i>	1			1			1	1	2
		<i>Neisseriales</i>	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Neisseria</i>					1			1	1
<i>Delta</i>		<i>Bdellovibrionales</i>	<i>Bdellovibrionaceae</i>	<i>Bdellovibrio</i>	1		2		2	1	3	3	6
		<i>Myxococcales</i>	<i>Polyangiaceae</i>	<i>Byssovorax</i>			1				1		1
				<i>Sorangium</i>		1					1		1
				<i>unclassified_Nannocystineae</i>			1				1		1
				<i>unclassified_Polyangiaceae</i>		1	2				3		3
				<i>unclassified_Sorangineae</i>	3	6	1	8	6	6	10	20	30
<i>Gamma</i>		<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>				2		3		5	5
				<i>Pantoea</i>				1				1	1
				<i>Serratia</i>					1			1	1
				<i>unclassified_Enterobacteriaceae</i>				1				1	1
		<i>Legionellales</i>	<i>Coxiellaceae</i>	<i>Aquicella</i>	2	1					3		3
		<i>Pseudomonadales</i>	<i>Moraxellaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>		1					1		1
			<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	1		1			1	2	1	3
		<i>Xanthomonadales</i>	<i>Sinobacteraceae</i>	<i>Nevskia</i>				1	3			4	4
				<i>Steroidobacter</i>	8	9	4		1		21	1	22
			<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Dyella</i>		4	4				8		8
				<i>Pseudoxanthomonas</i>				4				4	4
				<i>Rudaea</i>			1	0			1		1
				<i>unclassified_Gammaproteobacteria</i>	17	13	16	1			46	1	47
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Cyanobacteria</i>		<i>Chloroplast</i>	<i>Streptophyta</i>				0	1	1		2	2
<i>TM7</i>				<i>TM7_genera_incertae_sedis</i>		2				1	2	1	3
<i>Deinococcus-Thermus</i>	<i>Deinococci</i>	<i>Deinococcales</i>	<i>Deinococcaceae</i>	<i>Deinococcus</i>	2		4	2			6	2	8
<i>Gemmatimonadete</i>				<i>Gemmatimonas</i>	1						1		1
<i>unclassified_Bacteria</i>				<i>unclassified_Bacteria</i>		1				1	4	1	5

Frequência dos grupos bacterianos baseado no gene *nifH* em raiz (R) e colmo (S) de 3 genótipos de Capim-elefante: Cameroon (G1), Roxo (G4) e CNPGL91F06-3 (G5).

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	RG1	RG2	RG3	SG1	SG2	SG3	Raiz	Colmo	Total				
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	1		1				2		2				
				<i>Bradyrhizobium sp. BTAi1</i>	12							12		12			
				<i>Bradyrhizobium</i> genosp. TUXTLAS-23	1								1		1		
				<i>Bradyrhizobium sp. IRBG 228</i>	4								4		4		
				<i>Bradyrhizobium sp. ORS278</i>							3		1		4	4	
				<i>Bradyrhizobium sp. ORS285</i>								1	6		7	7	
				<i>Bradyrhizobium sp. MAFF 210318</i>	4	4								8		8	
				<i>Bradyrhizobium sp. ORS331</i>							1	2	2		5	5	
				<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium loti</i>							2			2	2	
				<i>Xanthobacteraceae</i>	<i>Xantobacter autotrophicus</i>						22	1			22	1	23
				<i>Rhodospirillales</i>	<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>							9		9		9
				Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Azohydromonas australica</i>							3		3	3
							<i>Burkholderia silvatlantica</i>						11	10		21	21
							<i>Burkholderia vietnamiensis</i>					4			4		4
Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		15						15		15				
			<i>Enterobacter sp. MTP_050512</i>				17				17	17					
	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae;	<i>Azotobacter vinelandii</i>	5							5		5				
			<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1							1		1				
Cyanobacteria	Nostocales	Microchaetaceae	<i>Tolypotrix sp. LCRNK_26</i>				1				1		1				
			<i>Nostocaceae</i>	<i>Anabaena variabilis</i>				1			1		1				
Unidentified nitrogen-fixing bacteria					2	10		4	2		12	6	18				