



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KARINA MARIA LIMA MILANI

**UMA ABORDAGEM SEQUENCIAL PARA O
DESENVOLVIMENTO DE INOCULANTE PARA CANA-DE-
AÇÚCAR**

Londrina
2018

KARINA MARIA LIMA MILANI

**UMA ABORDAGEM SEQUENCIAL PARA O
DESENVOLVIMENTO DE INOCULANTE PARA CANA-DE-
AÇÚCAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito ao título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Milani, Karina Maria Lima.

Uma Abordagem Sequencial para o Desenvolvimento de Inoculante para Cana-de-açúcar / Karina Maria Lima Milani. - Londrina, 2018.
189 f.

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, , 2018.

Inclui bibliografia.

1. Inoculante - Tese. 2. Cana-de-açúcar - Tese. I. Oliveira, André Luiz Martinez de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. . III. Título.

KARINA MARIA LIMA MILANI

**UMA ABORDAGEM SEQUENCIAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE
INOCULANTE PARA CANA-DE-AÇÚCAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito ao título de Doutora em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Renata Stolf Moreira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– Embrapa Soja, Londrina

Dr. Mariangela Hungria
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– Embrapa Soja, Londrina

Dr. Ricardo Silva Araujo
Total Biotecnologia Indústria e Comércio Ltda

Londrina, 21 de Setembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me ajudado a enfrentar todos os desafios e por todas as bênçãos recebidas.

Aos meus pais (Rosemary Lima Milani e Osvaldo Milani) e minha irmã (Karoline Lima Milani) por todo incentivo, apoio e paciência durante a caminhada até aqui. Os dias nem sempre foram fáceis e o apoio de vocês foi essencial. Minha família, meu alicerce, meu amparo, meu apoio incondicional, bênção de Deus! Amo vocês!

Ao meu orientador André Luiz Martinez de Oliveira, pela orientação durante todos esses anos, ensinamentos, paciência, amizade e por toda contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Dr Elcio Liborio Balota por ter me concedido a primeira oportunidade de estágio. Agradeço pela orientação, por todo aprendizado, pela confiança em meu trabalho e por sempre acreditar em mim. Estendo este agradecimento a Dra Diva Andrade. Minha eterna gratidão!

Aos membros da banca, Dra Mariangela Hungria, Dr Marco Antonio Nogueira, Dr Ricardo Araújo e Dra Renata Stolf, pela disponibilidade em participar deste momento tão importante e por agregar conhecimentos a este trabalho.

Aos estagiários Diana Lezier e Douglas Costa pela contribuição na execução deste trabalho, pelo convívio e principalmente pela amizade.

Aos colegas e amigos do Laboratório, pela troca de experiências, pelos auxílios nos experimentos e por fazerem parte da minha rotina de trabalho. Em especial, a Monica pela amizade construída e companheirismo durante todos esses anos. Você é um tesouro que a vida me concedeu!

Ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina e a todos os professores e funcionários, em especial o técnico Nelson Janeiro Rodriguez.

A empresa Total Biotecnologia pela parceria e aporte financeiro para realização do projeto.

A usina Companhia Melhoramentos Norte do Paraná (CMNP) pela disponibilização da área e sua equipe.

Ao CNPq RHAE e CAPES pela concessão da bolsa.

E por fim agradeço a todos que fazem parte da minha vida e que contribuíram direta ou indiretamente para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada!

MILANI, Karina Maria Lima. Uma abordagem sequencial para o desenvolvimento de inoculante para a cana-de-açúcar, 2018. 189 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2018.

RESUMO

A identificação de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV) capazes de promover incrementos no desenvolvimento e produtividade de cana-de-açúcar já foi evidenciada, entretanto, ainda não existe inoculante comercial registrado para esta cultura. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo identificar estirpes de BPCV com alto potencial biotecnológico, para o desenvolvimento de um inoculante para uso em cultivos comerciais de cana-de-açúcar. O trabalho foi realizado por uma abordagem sequencial sendo dividido em duas etapas. Na etapa 1, foi avaliada a diversidade e posicionamento taxonômico de uma coleção de 69 isolados provenientes de amostras de solo, raiz, tolete e folhas de cana-de-açúcar, coletadas em duas regiões distintas do Paraná, Brasil. A identificação dos isolados foi realizada com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. No total, 44 espécies pertencentes a 17 gêneros foram identificadas, sendo que *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Pantoea* sp., *Acinetobacter* sp. e *Rhizobium* sp. foram encontrados em maior abundância. Ainda, verificou-se que as diferenças na distribuição dos gêneros bacterianos foram relacionadas aos nichos ecológicos, origem geográfica, variedades de cana-de-açúcar e meio de cultura utilizados. Na segunda etapa, foi utilizada uma estratégia para selecionar as BPCV, usando sementes de sorgo como indicadores de eficiência associativa à cana-de-açúcar. Com base nos resultados obtidos em sorgo, 20 bactérias foram selecionadas para avaliação dos efeitos promotores do crescimento sobre o desenvolvimento da variedade RB966928 de cana-de-açúcar, em condições de casa-de-vegetação. Essas mesmas estirpes bacterianas foram avaliadas quanto a produção de auxinas e solubilização de fosfatos inorgânicos *in vitro*, visando identificar os mecanismos potencialmente ativos na promoção do crescimento vegetal. Os resultados permitiram identificar 4 bactérias com alto potencial biotecnológico, sendo pertencentes aos gêneros *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Gluconacetobacter* sp., e *Rhizobium* sp. Essas estirpes foram avaliadas *in vitro* quanto a compatibilidade entre elas, e inoculadas em diferentes combinações (7) em três variedades (RB835054, RB867515 e RB966928) de cana-de-açúcar em casa-de-vegetação. A utilização conjunta das bactérias proporcionou efeitos significativos no desenvolvimento da cana-de-açúcar. Em adição, as estirpes foram avaliadas quanto a diversidade metabólica por meio da análise de utilização de diferentes fontes de carbono. Conforme os resultados obtidos, referentes as duas etapas deste trabalho, foi possível verificar que a utilização do sorgo para seleção inicial das bactérias demonstrou-se eficiente, e as estirpes obtidas ao final do estudo são consideradas promissoras para o desenvolvimento de uma formulação inoculante para cana-de-açúcar. Um estudo separado das etapas referidas acima foi realizado em condições de campo com objetivo de avaliar a eficiência agrônômica, bem como diferentes formas de aplicação, de inoculantes formulados com *Azospirillum brasilense* e *Rhizobium* sp. O inoculante testado foi eficiente no aumento da produtividade de colmos e teor de sacarose da variedade de cana-de-açúcar RB867515, em ciclo de

13 meses para cana planta. Também foi verificada maior eficiência do produto quando aplicado em pós-emergência, em dose única e na ausência de adubação nitrogenada.

Palavras-chave: Microbioma. Filogenia. Bactérias promotoras do crescimento vegetal.

MILANI, Karina Maria Lima. A sequential approach for the development of inoculant for sugarcane, 2018. 189 p. Thesis (PhD in Biotechnology) State University of Londrina, Londrina-PR, 2018.

ABSTRACT

The identification of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) that promote increases in the development and productivity of sugarcane has been reported, however, there is still not a commercial inoculant registered for this crop. In this sense, this work aimed to identify strains of PGPB with high biotechnological potential, for the development of an inoculant for use in commercial sugarcane crops. This research was carried out by a sequential approach being divided into two steps. In the first step, we evaluated the diversity and taxonomic position of a collection of 69 isolates from soil, root, tolete and sugarcane leaves collected in two different regions of Paraná, Brazil. The identification of the isolates was performed based on the partial sequencing of the 16S rRNA gene. A total of 44 species belonging to 17 genera were identified, and *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Pantoea* sp., *Acinetobacter* sp. and *Rhizobium* sp. were found in greater abundance. Also, it was verified that the differences in the distribution of the bacterial genera were related to the ecological niches, geographic origin, sugarcane varieties and culture medium used. In the second step, a strategy was used to select the BPCV, using sorghum seeds as indicators of associative efficiency to sugarcane. Based on the results obtained in sorghum, 20 bacteria were selected to evaluate the growth-promoting effects on the development of the sugarcane variety RB966928 under greenhouse conditions. These same bacterial strains were evaluated *in vitro* for auxin production and solubilization of inorganic phosphates, in order to identify the potential mechanisms involved in the plant-growth promotion. The results allowed to identify 4 bacteria with high biotechnological potential, belonging to the genera *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Gluconacetobacter* sp., and *Rhizobium* sp. These strains were evaluated *in vitro* for compatibility between them, and inoculated in different combinations (7) in three sugarcane varieties (RB835054, RB867515 e RB966928) in a greenhouse. The combined use of bacteria has had significant effects on the development of sugarcane. In addition, the strains were evaluated for metabolic diversity through the use of different carbon sources. According to the results in the two steps of this work, it was possible to verify that the use of sorghum was efficient for initial selection of the bacteria, and the strains obtained at the end of this study are considered promising for the development of an inoculant formulation for sugarcane. A separate study of the steps mentioned above was carried out under field conditions to evaluate the agronomic efficiency, as well as different forms of inoculants application formulated with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium* sp. The inoculant tested was efficient in increasing the yield of stalks and sucrose content of the sugarcane variety RB867515, in a cycle of 13 months. It was also verified greater efficiency of the inoculant when applied in post-emergence, in a single dose without nitrogen fertilization.

Key words: Microbioma. Phylogeny. Plant growth promoting bacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Evolução da área colhida e produção de cana-de-açúcar no Brasil 19
- Figura 2** – Grupos bacterianos mais frequentes encontrados em cana-de-açúcar de acordo com a coleta de dados realizada na literatura (Tabela S2 do capítulo 1). As cores em verde, laranja, azul claro, amarelo e azul escuro representam bactérias das classes Bacilli, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria, respectivamente.....25
- Figura 3** – Fluxograma de procedimentos para o desenvolvimento de inoculantes.....32

CAPÍTULO 1

- Figure 1** – Distribution of bacterial isolates used in this study at class (inner circle) and genus (outer circle) level, according to the RDP-Classifer at 90% confidence.....54
- Figure 2** – Relative Abundance of bacterial phylogenetic groups isolated from sugarcane according to habitat (soil, washed roots, stem, leaves), geographic origin (Londrina and Paranavaí), semi-solid N-free culture medium (NFB, LGI, LGI-p) and varieties (RB72454; RB845210; RB855156; RB855546; RB867515).57
- Figure 3** – Heat map representing the relative abundance of the given 66 bacterial phylotypes isolated in association with sugarcane. The numbers inside boxes represents the respective absolute abundance within the isolates collection. Dendrograms represent the phylotypes clustering in relation to the isolation habitat (upper dendrogram) or to the relationships across genera (right dendrogram), based upon Euclidean distance method58
- Figure 4** – Principal Component Analysis (PCA) of diversity indices as influenced by the habitat, geographic origin of samples and semi-solid N-free culture media (A). PCA analysis of diversity indices as affected by the sugarcane genotype (B). The data were normalized by the square root and the equity data were multiplied by -1 to result in positive values ...64

Figure 5 – Veen diagram illustrating the overlaps of bacterial genera identified in association with sugarcane based on literature data (culture-dependent and independent approaches) and the present study. (a) Number of bacterial genera identified using metagenomics approaches. (b) Number of bacterial genera identified using culture-dependent approaches. (c) Number of bacterial genera identified in the present study. Details can be found in the supplementary Table S2	67
Figure 6 – Overlapping of bacterial genera described in association with sugarcane according to the method used to diversity access. Red-dotted square indicates bacterial genera identified by culture-independent methods and found in more than one study. Blue-dotted square presents the bacterial genera identified by culture-dependent approaches. Middle square presents the bacterial genera found in the present study that were previously reported by culture-independent (shown in red), culture-independent (shown in blue) or both methods (shown in purple). Details can be found in the supplementary Table S2	67
Figure 7 – Suggested core sugarcane microbiome based on the most frequent genera identified by bacterial diversity studies published in the literature. Details can be found in the supplementary Table S2. Letters in parentheses denote the isolation sites: RH (rhizosphere); R (root); S (stem); L (leaves)	69

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Esquema do experimento para avaliar o desenvolvimento inicial de plântulas de sorgo inoculadas com bactérias, tomando a raiz como parâmetro	118
Figura 2 – Imagens dos vasos durante a condução do experimento	121
Figura 3 – Imagens da desinstalação do experimento em casa-de-vegetação e respectivas avaliações. (A) altura das plantas; (B) diâmetro do colmo; (C) teor de clorofila; (D) coleta da parte aérea e raízes; (E) raízes; (F) volume de raízes.....	122
Figura 4 – Imagens dos vasos durante a condução do experimento	127

Figura 5 – Linhagens de Sorgo inoculadas com estirpes bacterianas isoladas de cana-de-açúcar. (A) raiz de Sorgo SHS410 sem inoculação; (B) raiz de Sorgo SHS410 inoculada com <i>Rhizobium</i> sp. (27); (C) raiz de Sorgo SHS410 inoculada com <i>Pseudomonas</i> sp. (120); (D) raiz de Sorgo PODIUM sem inoculação; (E) raiz de Sorgo PODIUM inoculada com <i>Rhizobium</i> sp. (142); (F) raiz de Sorgo PODIUM inoculada com <i>Pseudomonas</i> sp. (136)	132
Figura 6 – Análise de Componentes Principais (PCA) do desenvolvimento inicial de raízes de Sorgo PODIUM e SHS410 inoculados com diferentes gêneros bacterianos	135
Figura 7 – Análise de Componentes Principais (PCA) com base em atributos relativos ao desenvolvimento de cana-de-açúcar inoculada com diferentes gêneros de BPCV	139
Figura 8 – Ensaio de compatibilidade entre os isolados de cana-de-açúcar, baseado no método de confrontação direta. (A) Co-cultivo de <i>Pseudomonas</i> sp. (parte inferior) e <i>Gluconacetobacter</i> sp. (disco superior). (B) Co-cultivo de <i>Gluconacetobacter</i> sp. (parte inferior) e <i>Pseudomonas</i> sp. (disco superior). (C) Co-cultivo de <i>Pseudomonas</i> sp. (parte inferior) e <i>Rhizobium</i> sp (disco superior) (D) <i>Rhizobium</i> sp (parte inferior) e <i>Pseudomonas</i> sp (disco superior). (E) <i>Rhizobium</i> sp (parte inferior) e <i>Acinetobacter</i> sp (disco superior). (F) <i>Acinetobacter</i> sp (parte inferior) e <i>Rhizobium</i> sp (disco superior). (G) <i>Acinetobacter</i> sp (parte inferior) e <i>Gluconacetobacter</i> sp. (disco superior). (H) <i>Gluconacetobacter</i> sp. (parte inferior) e <i>Acinetobacter</i> sp. (disco superior). (I) <i>Pseudomonas</i> sp. (parte inferior) e <i>Acinetobacter</i> sp. (disco superior). (J) <i>Acinetobacter</i> sp (parte inferior) e e <i>Pseudomonas</i> sp (disco superior). (K) <i>Gluconacetobacter</i> sp. (parte inferior) e <i>Rhizobium</i> sp (disco superior). (L) <i>Rhizobium</i> sp (parte inferior) e <i>Gluconacetobacter</i> sp. (disco superior).....	144
Figura 9 – Análise de Componentes Principais (PCA) com base nos atributos relativos ao desenvolvimento de cana-de-açúcar inoculada com diferentes gêneros de BPCV	150

Figura 10 – Contagem de células das bactérias *Rhizobium* sp. (27), *Gluconacetobacter* sp. (109), *Acinetobacter* sp. (113) e *Pseudomonas* sp. (121) cultivadas em diferentes fontes de carbono 152

Figura 11 – Densidade Óptica (Esquerda) e pH (direita) do meio após 6, 12 e 24 h de crescimento em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono. (A) *Rhizobium* sp. (27), (B), *Gluconacetobacter* sp. (109), (C) *Acinetobacter* sp. (113) e (D) *Pseudomonas* sp. (121)153

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1** – Coleção de bactérias isoladas de amostras de solo, rizosfera+raiz, tolete e folha de cana-de-açúcar (cultivares RB 855546; RB 845210; RB 72454; RB 867515; RB 855156) plantadas em duas regiões do Paraná.....43
- Tabela 2** – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.46
- Table 1** – Isolation source of bacterial isolates used in this study, using different semi-solid N-free culture medium.....51
- Table 2** – Phylogenetic affiliation of diazotrophic bacteria isolated from different localities and habitats associated to sugarcane, according to the sequence identity matrix constructed using Bioedit v. 7.2.5 with the respective 16S rRNA gene sequences (partial) and type strains gene sequences.....61
- Table 3** – Diversity indexes based on the number of phylotypes determined by the analysis of partial 16S rRNA gene sequences from putative diazotrophs associated with sugarcane.....63

CAPÍTULO 2

- Tabela 1** – Codificação e gêneros das bactérias utilizadas no experimento.....117
- Tabela 2** – Descrição dos tratamentos utilizados no experimento120
- Tabela 3** – Combinação das estirpes bacterianas para o ensaio de compatibilidade125
- Tabela 4** – Descrição dos tratamentos utilizados no experimento126
- Tabela 5** – Avaliação dos efeitos promotores de crescimento de raízes de Sorgo (podium) inoculadas com isolados bacterianos de Cana-de-açúcar ..133
- Tabela 6** – Avaliação dos efeitos promotores de crescimento de raízes de Sorgo (SHS 410) inoculadas com isolados bacterianos de Cana-de-açúcar134
- Tabela 7** – Avaliação dos efeitos promotores de crescimento de cana-de-açúcar (RB 966928) inoculadas com diferentes com isolados bacterianos de Cana-de-açúcar138

Tabela 8 – Produção de compostos indólicos na presença do precursor L-triptofano e solubilização dos fosfatos de ferro (FePO ₄ .2H ₂ O) e de alumínio (AlPO ₄) por bactérias isoladas de cana-de-açúcar	142
Tabela 9 – Características bioquímicas dos isolados selecionados e eficiência na promoção do crescimento de cana-de-açúcar	143
Tabela 10 – Avaliação dos efeitos promotores de crescimento de Cana-de-açúcar (RB835054, RB867515 e RB966928) inoculadas com diferentes isolados de BPCV.....	148

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos para conduzidos para a determinação da eficiência agrônômica de inoculantes em cana-de-açúcar.....	166
Tabela 2 – Açúcares redutores (%), pureza do caldo (%), teores de fibra da cana (%) e umidade do colmo (%) para a variedade de cana-de-açúcar RB867515 sob diferentes tratamentos de inoculação com os inoculantes AzoTotal e UEL e diferentes doses de nitrogênio (ureia). Fazenda Jussara, PR, 2016.....	170
Tabela 3 – Quantidade de sacarose aparente da cana (PC%), Brix% da cana (B%C) e açúcar teórico recuperável (ATR kg Mg ⁻¹ colmos) para a variedade de cana-de-açúcar RB867515 sob diferentes tratamentos de inoculação com os inoculantes AzoTotal e Uel, e diferentes doses de nitrogênio (ureia). Fazenda Jussara, PR, 2016.....	172
Tabela 4 – Teores de nitrogênio foliar e acúmulo de nitrogênio na matéria verde (folhas e ponteiros) para a variedade de cana-de-açúcar RB867515 sob diferentes tratamentos de inoculação com AzoTotal e UEL com e sem 30 kg ha ⁻¹ de N (ureia). Fazenda Jussara, PR, 2016	174
Tabela 5 – Número de colmos industrializáveis por parcela (24 m ²), número de colmos industrializáveis corrigido (10 m ²), e respectivos modelos de regressão utilizados para ajuste do número de colmos por parcela para a variedade de cana-de-açúcar RB867515 sob diferentes tratamentos de inoculação com AzoTotal e Inoculante UEL e diferentes doses de nitrogênio (ureia). Fazenda Jussara, PR, 2016..	176

Tabela 6 – Peso de colmos industrializáveis (kg), produtividade de colmos por hectare (Mg ha⁻¹), e toneladas de sacarose por hectare (Mg POL ha⁻¹) para a variedade de cana-de-açúcar RB867515 sob diferentes tratamentos de inoculação com AzoTotal e Inoculante UEL e diferentes doses de nitrogênio (ureia). Fazenda Jussara, PR, 2016..179

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	CANA-DE-AÇÚCAR	18
3.1.1	Aspectos Gerais Da Cultura	18
3.1.2	Nutrição E Adubação	20
3.2	MICROBIOMA VEGETAL	22
3.3	DIVERSIDADE MICROBIANA ASSOCIADA À CANA-DE-AÇÚCAR	23
3.4	APLICAÇÃO DE BPCV EM CULTURAS AGRÍCOLAS	28
3.4.1	Formulação E Produção De Inoculantes	30
4	REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 1 – IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL		42
1	MATERIAL E MÉTODOS	43
1.1	ORIGEM DAS ESTIRPES BACTERIANAS	43
1.2	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	43
1.2.1	Extração Do DNA Genômico	43
1.2.2	Sequenciamento Parcial Do Gene 16s rRNA	44
1.2.3	Amplificação Do DNA Genômico Pela Técnica Rep-PCR (BOX-PCR)	47
ARTIGO: Comparative analysis of cultivable diazotrophic bacteria isolated from sugarcane in the state of Paraná		48

CAPÍTULO 2 – SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA APLICAÇÃO EM CULTIVOS DE CANA-DE-AÇÚCAR		116
1	INTRODUÇÃO	117
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	119
2.1	EFICIÊNCIA DAS BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO RADICULAR DO SORGO (SORGHUM BICOLOR L. MOENCH)	119
2.2	EXPERIMENTO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO I: EFEITO DOS ISOLADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR	120
2.2.1	Avaliações	123
2.3	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.....	125
2.3.1	Produção De Compostos Indólicos.....	125
2.3.2	Solubilização De Fosfato Inorgânico	126
2.4	TESTE DE COMPATIBILIDADE BACTÉRIA X BACTÉRIA IN VITRO.....	126
2.5	EXPERIMENTO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO II: EFEITO DOS ISOLADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR	127
2.5.1	Avaliações	129
2.6	CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DAS ESTIRPES QUANTO AO USO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO.....	130
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	131
3.1	EFICIÊNCIA DAS BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO RADICULAR DO SORGO (SORGHUM BICOLOR L. MOENCH)	131
3.2	EXPERIMENTO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO I: EFEITO DOS ISOLADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS ESTIRPES	139
3.3	CARACTERIZAÇÃO METABÓLICA DAS ESTIRPES	156
4	CONCLUSÃO.....	159
5	REFERÊNCIAS.....	159

CAPÍTULO 3 – EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE INOCULANTES CONTENDO BACTÉRIAS DO GÊNERO AZOSPIRILLUM SP. E RHIZOBIUM SP. PARA A CULTURA DA CANA- DE-AÇÚCAR SOB CONDIÇÕES DE CAMPO		167
1	INTRODUÇÃO	168
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	170
2.1	ÁREA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	170
2.2	INOCULANTE E INOCULAÇÃO	171
2.3	COLHEITA E DETERMINAÇÕES TECNOLÓGICAS	172
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	174
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	174
3.1	AÇÚCARES REDUTORES DO CALDO (AR %), PUREZA DO CALDO (PC%), FIBRA DA CANA (FIB%) E UMIDADE DO COLMO (UC%).....	174
3.2	POL% DA CANA (PC), BRIX% DA CANA (B%C), E AÇÚCAR TEÓRICO RECUPERÁVEL (ATR KG MG COLMOS ⁻¹).....	176
3.3	N-TOTAL NA MASSA SECA (G KG ⁻¹) E ACÚMULO DE N POR HECTARE	177
3.4	NÚMERO DE COLMOS INDUSTRIALIZÁVEIS POR PARCELA (24 M ²) E NÚMERO DE COLMOS INDUSTRIALIZÁVEIS CORRIGIDO (10 M LINEARES).....	180
3.5	PESO MÉDIO DE COLMOS (KG), PRODUTIVIDADE DE COLMOS POR HECTARE (MG HA ⁻¹) E TONELADAS DE SACAROSE POR HECTARE (MG POL HA ⁻¹)	183
4	CONCLUSÃO.....	186
5	REFERÊNCIAS	187

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar possui importante impacto na economia brasileira, sendo uma cultura de caráter estratégico do ponto de vista econômico, social e energético. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra 2018/2019 de cana-de-açúcar ocupa uma área de 8.613,6 mil hectares do território agrícola brasileiro, com estimativa de produção de 625,96 milhões de toneladas (CONAB, 2018). Existe a necessidade de aumento da produção e produtividade da cultura de cana-de-açúcar, garantindo sua oferta no mercado a preços compatíveis aos derivados de petróleo. O desenvolvimento contínuo de técnicas de manejo, novas cultivares, maquinários e a capacitação de produtores segundo os preceitos da sustentabilidade devem ser prioridade.

O aumento da produtividade da cultura da cana-de-açúcar é possível por meio da adoção de tecnologias de manejo que possibilitem melhor qualidade nutricional e fitossanitária das plantas. Neste sentido, a aplicação de fertilizantes minerais e outros insumos químicos pode aumentar a disponibilização de nutrientes e diminuir as perdas relacionadas a problemas fitossanitários, possibilitando o aumento da produtividade. Entretanto, esta prática pode levar a um desequilíbrio no balanço energético da cultura e ao aumento no custo de produção, além do potencial em ocasionar problemas ambientais. Como alternativa, o uso de produtos biotecnológicos contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), pode diminuir a quantidade de fertilizantes químicos aplicados na cultura, levando à redução dos custos de produção e conseqüente, o favorecimento de um balanço energético positivo (URQUIAGA, ALVES, BODDEY, 2005). Exemplos bem-sucedidos da exploração de processos naturais realizados por esses microrganismos, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) ou o controle biológico, corroboram as potencialidades deste grupo microbiano como componentes de um manejo agrícola sustentável. Estima-se que a utilização de BPCV em cultivos de cana-de-açúcar no Brasil, pode gerar uma economia equivalente a US\$ 300 milhões devido a redução no uso de fertilizantes nitrogenados (SOUSA et al., 2017).

Dentre as espécies bacterianas mais estudadas em cana-de-açúcar, encontram-se *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Burkholderia tropica* e *Nitrospirillum amazonense*

(antigo *Azospirillum amazonense*). Resultados indicam que bactérias associadas a cana-de-açúcar podem fornecer até 70% de nitrogênio devido ao processo de FBN (URQUIAGA et al., 2011). Apesar da diversidade de microrganismos associados a cana-de-açúcar e seus efeitos benéficos para a cultura, ainda não existe um inoculante comercial registrado para cana-de-açúcar no Brasil.

Considerando o interesse crescente pelo uso de inoculantes contendo bactérias que promovam o crescimento e incrementem a produtividade de plantas e a importância econômica da cana-de-açúcar, o estudo de BPCV que se associem a esta cultura é altamente relevante, pois poderá levar ao desenvolvimento de um inoculante para a cultura, diminuindo os custos de produção e os efeitos negativos do uso de fertilizantes minerais nitrogenados. O presente trabalho teve como objetivo identificar estirpes de BPCV com alto potencial biotecnológico, bem como avaliar parâmetros de compatibilidade entre variedades de cana-de-açúcar e diferentes isolados de BPCV, visando o desenvolvimento de um bioproduto – Inoculante – para uso em cultivos comerciais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a diversidade e posicionamento taxonômico de uma coleção de bactérias isoladas de cana-de-açúcar (69), assim como seu potencial biotecnológico, visando o desenvolvimento de um inoculante para uso em cultivos comerciais da cultura.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a posição taxonômica de 69 isolados com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e avaliar a diversidade genotípica entre os isolados utilizando a técnica Rep-PCR (BOX-PCR) (**Capítulo 1**).
- b) Avaliar o efeito das bactérias na promoção do crescimento vegetal por meio de ensaios de inoculação utilizando duas linhagens de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) como indicadoras de eficiência associativa à cana-de-açúcar (**Capítulo 2**).
- c) Realizar a caracterização bioquímica das bactérias mediante avaliações *in vitro* como: produção de auxinas e solubilização de fosfatos (**Capítulo 2**).
- d) Avaliar a compatibilidade entre as bactérias estudadas, visando a utilização conjunta das estirpes em experimentos de inoculação (**Capítulo 2**).
- e) Avaliar a eficiência agrônômica das bactérias por meio de ensaios de inoculação em casa de vegetação utilizando diferentes variedades de cana-de-açúcar (**Capítulo 2**).
- f) Caracterizar a diversidade metabólica de estirpes bacterianas, promissoras ao desenvolvimento de formulações inoculantes, por meio da análise de utilização de diferentes fontes de carbono (**Capítulo 2**).
- g) Realizar ensaios de eficiência agrônômica para determinar a viabilidade de inoculantes formulados com estirpes *A. brasilense* e *Rhizobium sp*, na promoção do crescimento e produtividade da cana-de-açúcar, bem como, avaliar diferentes formas de aplicação (**Capítulo 3**).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cana-de-açúcar

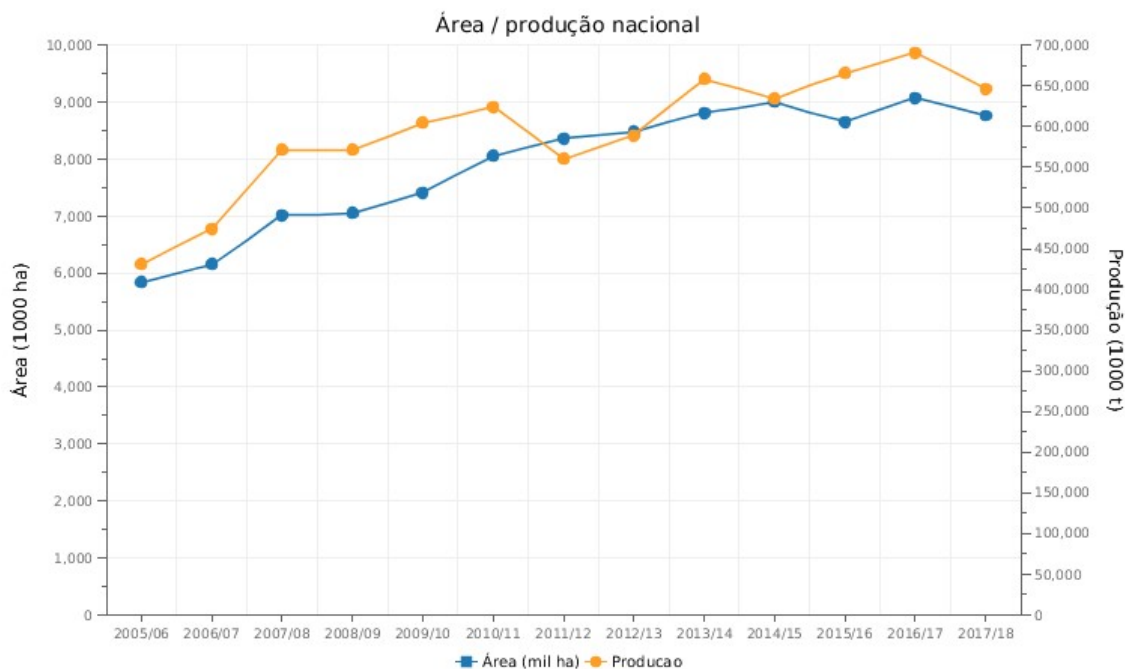
3.1.1 Aspectos gerais da cultura

A cana-de-açúcar foi introduzida ao Brasil no século XVI e tem como centro de origem o sudeste da Ásia. A cultura pertence à família *Poaceae* e gênero *Saccharum*, compreendendo seis espécies: *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. robustum*, *S. spontaneum*, *S. sinensis* e *S. edule*. As variedades utilizadas em cultivos comerciais são híbridas decorrente do cruzamento dessas diferentes espécies, sendo que *S. officinarum* e *S. spontaneum* são os maiores contribuintes do genoma (DINARDO-MIRANDA; VASCONCELOS; LANDELL, 2010; MORAIS et al., 2015). O plantio da cana-de-açúcar ocorre tradicionalmente entre as latitudes 35 °N a 35 °S em três épocas diferentes: sistema de ano-e-meio, sistema de ano e plantio de inverno (DINARDO-MIRANDA; VASCONCELOS; LANDELL, 2010).

Esta cultura possui importante impacto econômico, social e energético, sendo cultivada em diversos países de clima tropical e subtropical. Além de seus principais produtos como o açúcar e o álcool, os subprodutos gerados (bagaço, vinhaça e torta de filtro) apresentam grande importância na geração de energia, produção de ração animal, fertilizantes, entre outros (AGUIAR et al., 2014). O bagaço da cana-de-açúcar, por exemplo, vem sendo utilizado na geração de eletricidade, contribuindo para a diversificação do setor sucroenergético.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, ocupando uma área de aproximadamente 8.661,4 mil hectares, com produção total estimada de 635,51 milhões de toneladas para safra 2018/2019 (CONAB, 2018). O centro-sul destaca-se por ser a maior região produtora de cana, concentrando cerca de 90% da produção nacional, enquanto que a região Norte/Nordeste é responsável por apenas 10%. O país ocupa o primeiro lugar no ranking de produção de açúcar e é o maior exportador de etanol. A produção de cana no Brasil evoluiu expressivamente nas últimas décadas: de 80 milhões de toneladas em 2005/2006, para 635,51 milhões de toneladas em 2018/2019 (CONAB, 2018) (Figura 1).

Figura 1. Evolução da área colhida e produção de cana-de-açúcar no Brasil.



Fonte: CONAB, 2018.

A constante busca por combustíveis renováveis que substituam o petróleo e não sejam agressivos ao ambiente faz da cana-de-açúcar uma cultura de importância global na busca por um desenvolvimento sustentável. O aumento da área destinada à produção de cana-de-açúcar tem se intensificado principalmente pelo interesse crescente ao uso de etanol como alternativa para a matriz energética mundial, em resposta à substituição dos combustíveis fósseis.

A expansão de áreas para o plantio de cana-de-açúcar tem gerado uma série de preocupações quanto ao impacto da agricultura no ambiente. Dentro desse contexto, o contínuo aperfeiçoamento da cultura para aumentar sua produtividade, garantir melhores condições de cultivo e reduzir impactos ambientais poderá implicar na redução das áreas necessárias para cultivo. Para isso, deve-se levar em conta o desenvolvimento de novas variedades, o aperfeiçoamento das técnicas de manejo, e ainda, a capacitação dos produtores. Atualmente, o Brasil possui uma grande estrutura para o melhoramento da cana-de-açúcar, destacando-se a RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético) da qual fazem parte diversas universidades e centros de pesquisa. Estes programas buscam

atender o uso de variedades adaptadas às condições edafoclimáticas particulares de cada região de cultivo, bem como às necessidades de atendimento ao aumento do período de safra e à colheita mecanizada. Além disso, existe a necessidade de substituição das variedades periodicamente, devido ao declínio decorrente do cultivo continuado ao longo dos anos (CESNIK, 2004). O aumento da produtividade para a cultura da cana-de-açúcar também é possível pela adoção de tecnologias de manejo que levem a melhores condições nutricionais da planta. Neste sentido, a disponibilização de nutrientes para as plantas pode ser alcançada pelo incremento na quantidade de fertilizantes aplicados nas áreas de cultivo. Considerando todos esses fatores, é possível aumentar a produtividade da cana-de-açúcar sem que haja necessidade de aumento excessivo de áreas plantadas com a cultura.

3.1.2 Nutrição e Adubação

A adubação é um fator que apresenta elevada influência na produtividade das culturas agrícolas, sendo responsável em até 25% de todos os custos do plantio de cana-de-açúcar (ROSSETTO, DIAS, VITTI; 2008). Verifica-se que o acúmulo de macronutrientes na cana planta é de até 150, 69, 311, 33, 45 e 84 kg 100 t⁻¹ colmos para o nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S), respectivamente. Para cana soca, os valores encontrados são respectivamente de até 120, 41, 256, 52, 53 e 153 kg 100 t⁻¹ colmos para o N, P, K, Ca, Mg e S. Quanto aos micronutrientes, esse acúmulo está em torno de 8,0 (ferro - Fe); 3,0 (manganês - Mn); 596 (zinco - Zn); 339 (cobre - Cu) e 235 (boro - B) g 100 t⁻¹ (ROSSETTO, DIAS, VITTI; 2008; ORLANDO FILHO, 1993). No entanto, deve-se considerar que o acúmulo dos nutrientes pela cultura pode variar de acordo com a disponibilidade destes no solo, a cultivar plantada, a idade da cultura, e ainda quanto aos fatores edafoclimáticos (OLIVEIRA et al., 2007).

O nitrogênio é considerado fator limitante na produção agrícola, influenciando o crescimento das plantas mais do que qualquer outro nutriente. Isso porque está presente na composição das mais importantes biomoléculas, como proteínas, aminoácidos, bases nitrogenadas, clorofila, enzimas, entre outras (KIM; REES, 1994). Devido a sua importância na nutrição e fisiologia da cana-de-açúcar, o nitrogênio, juntamente com o potássio, é requerido em maiores quantidades pela cultura (MALAVOLTA et al., 1997; COLETI et al., 2002; ROSSETTO, DIAS, VITTI; 2008). A absorção de N pela cana-de-açúcar aumenta a atividade do meristema da

parte aérea da planta, resultando em maior perfilhamento e índice de área foliar (IAF) da cultura. Esse aumento no IAF eleva a eficiência do uso da radiação solar, mediada como taxa de fixação de gás carbônico, aumentando, portanto, o acúmulo de massa seca. Devido à importância do nitrogênio na síntese de biomoléculas, sua deficiência pode provocar redução na síntese de aminoácidos, clorofila e diminuição na energia disponível para produção de carboidratos, com um efeito direto no crescimento e produtividade da cultura (MALAVOLTA et al., 1997).

A aplicação de fertilizante nitrogenado na cana-planta varia de 30 a 100 kg ha⁻¹, enquanto que na cana-soca recomenda-se adição de 125 kg ha⁻¹ de N (OLIVEIRA et al., 2007; ROSSETTO, DIAS, VITTI; 2008). Apesar de sua exigência em nitrogênio, a cultura apresenta baixa resposta a adubação nitrogenada no Brasil (AZEREDO et al., 1986). Verifica-se que a falta de resposta ocorre com maior frequência em cana-planta, enquanto que em cana-soca a adubação nitrogenada apresenta maior eficiência (FRANCO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2007). Franco et al. (2011) verificaram que durante o desenvolvimento inicial da cana de açúcar, apenas 40 % do N absorvido pela planta foi proveniente de N-fertilizante para cana-planta.

Considerando o acúmulo de aproximadamente 150 kg de N, e a adição de 30 a 100 Kg ha⁻¹ em cana-planta, observa-se que a cultura utiliza outra fonte para suprir o restante de nitrogênio necessário. Diversos autores atribuem a baixa eficiência de absorção de N-fertilizante em cana-planta devido à mineralização da matéria orgânica do solo e incorporação de resíduos da cultura anterior, à fixação biológica de nitrogênio (FBN), às épocas de aplicação do fertilizante, à melhoria da fertilidade do solo com a restauração do canavial, às perdas por lixiviação e desnitrificação, ou ainda, a combinação de todos esses fatores. (AZEREDO et al., 1986; CANTARELLA; RAIJ, 1986; CARNAÚBA, 1990; URQUIAGA et al., 1992; ORLANDO FILHO et al., 1999; ROSSETTO, DIAS, VITTI; 2008 FRANCO et al., 2011). Segundo Salcedo e Sampaio (1984) a maior utilização de N-fertilizante em soqueira é devido à menor taxa de mineralização de N no solo, reduzido preparo do solo, e eficiência do sistema radicular na cana-soca para absorção de fertilizante nitrogenado.

Para adubação de fósforo e potássio em cana-planta recomenda-se a aplicação de 40 a 180 kg ha⁻¹ e 40 a 120 kg ha⁻¹, respectivamente, considerando uma produtividade de 100 a 150 t ha⁻¹ (ROSSETTO, DIAS, VITTI; 2008). Em cana-soca torna-se necessário realizar uma análise do solo para posterior adubação. O

fósforo é requerido em menor quantidade pelas plantas, comparativamente ao N e K, no entanto, são aplicadas altas dosagens nos solos brasileiros. Essa alta dosagem é explicada devido baixa disponibilidade natural do fósforo, e ainda pela alta afinidade da fração mineral tornando-se indisponível para a planta. Esse elemento participa como constituinte dos fosfolipídeos, ácidos nucleicos (DNA e RNA) e também da adenosina trifosfato (ATP), sendo elemento-chave de vias metabólicas e bioquímicas. Além disso, é de extrema importância para a cana-de-açúcar, pois influencia a produção de açúcar e a qualidade do caldo produzido (INUI, 2009). Já o potássio, é o nutriente exigido em maior quantidade pela cultura de cana-de-açúcar (ORLANDO FILHO, 1993). Participa da síntese de açúcares e proteínas, da conversão de energia nos cloroplastos, da abertura e fechamento de estômatos, e ainda é cofator de aproximadamente de diversas enzimas, principalmente ligadas ao metabolismo de açúcares, transformações anabólicas e catabólicas de sacarose e hexose (ROSSETTO, DIAS, VITTI; 2008).

3.2 Microbioma vegetal

O ecossistema solo-planta abriga uma diversidade de microrganismos que possuem diversas funções especializadas e desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e na saúde das plantas. Essa microbiota é composta por protistas, Archae, fungos e bactérias. Dentre os procariotos, os filos Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes são encontrados em maior abundância (BULGARELLI et al., 2013; MÜLLER et al., 2016). O resultado da interação planta-microrganismo é dependente de vários fatores, que conjuntamente determinam se à associação será benéfica, neutra ou prejudicial (TURNER et al., 2013; MÜLLER et al., 2016).

Microrganismos benéficos têm sido continuamente descritos em associação com culturas economicamente importantes, como milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), arroz (*Oryza sativa*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). Esses organismos são encontrados colonizando diferentes nichos ecológicos como a filosfera, endosfera e rizosfera, podendo atuar no crescimento da planta por meio de mecanismos diretos (fixação biológica de nitrogênio, síntese de fitohormônios e solubilização de fosfato) e/ou mecanismos indiretos (biocontrole de fitopatógenos e insetos, aumento da resistência contra estresses, modulação da expressão de genes vegetais) (BULGARELLI et al., 2013). O ambiente filosfera está

relacionado com as partes aéreas das plantas e a endosfera refere-se à colonização dos tecidos internos do vegetal (TURNER et al., 2013; BULGARELLI et al., 2013; SCHLAEPPI et al., 2015; MÜLLER et al., 2016). Já o termo rizosfera pode ser definido como a zona ao redor da raiz, onde microrganismos e importantes processos para o crescimento e a saúde das plantas estão localizados (HARTMANN et al., 2008, BAKKER et al., 2013). A rizosfera é influenciada pela rizodeposição de exsudatos, mucilagem e células descamadas. Os exsudatos contêm uma variedade de compostos, como ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, vitaminas, fatores de crescimento, hormônios e compostos antimicrobianos que são determinantes na estrutura do microbioma da rizosfera. Por outro lado, a filosfera é relativamente pobre em nutrientes e sujeita a extremos de temperatura, radiação e umidade. Os microrganismos que habitam a rizosfera e filosfera são considerados epifíticos, enquanto aqueles que colonizam a endosfera (folhas, raízes ou caules) são chamados de endofíticos (MÜLLER et al., 2016).

Considerando os benefícios da associação planta-microrganismo, a compreensão da diversidade microbiana e suas aplicações potenciais na agricultura é considerada importante para manter a sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola.

3.3 Diversidade microbiana associada à cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância na produção de alimentos e biocombustíveis, com alto impacto na economia global. Plantas de cana-de-açúcar abrigam uma enorme diversidade de microrganismos (DE SOUZA et al., 2016; KRUSUWAN; THAMCHAIPENET, 2016; RODRIGUES et al., 2016; TAULÉ et al., 2011) que incluem bactérias fixadoras de nitrogênio como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae* e outras que são capazes de colonizar os tecidos internos da cana-de-açúcar e desempenhar papel importante na nutrição nitrogenada desta planta (CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988; JAMES et al., 1994; BALDANI et al., 2002; BODDEY et al. al., 2003). Altas populações de bactérias associativas são encontradas colonizando a rizosfera, raízes, toletes e folhas da cana-de-açúcar (MENDES et al. 2007; MAGNANI et al. 2010; BENEDUZI et al. 2013; ARMANHI et al. 2016; DOS-SANTOS et al. 2017), embora a estrutura e a composição da comunidade bacteriana sejam

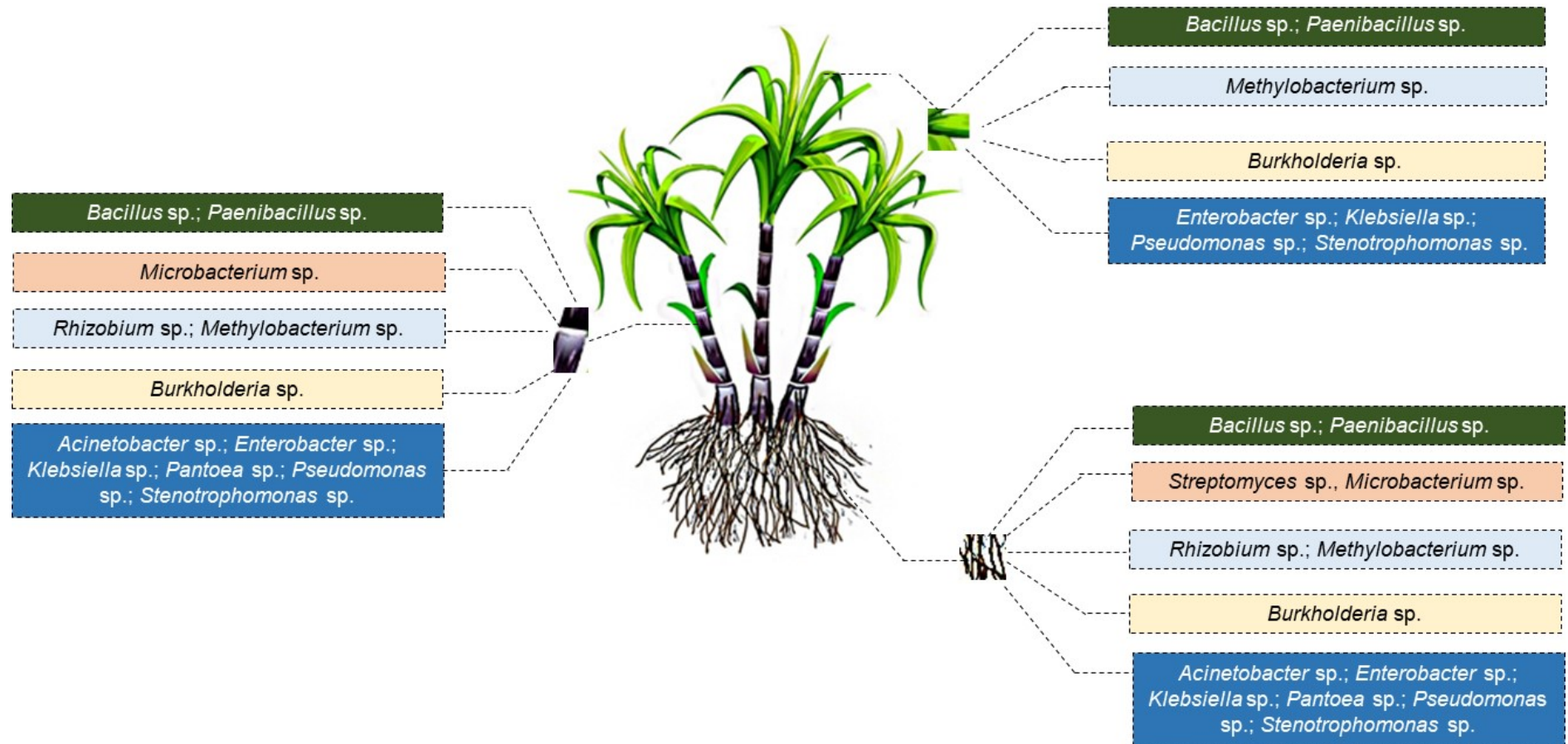
influenciadas pelo genótipo da planta, idade da planta e localização geográfica, entre outras influências (BENEDUZI et al. 2013; DONG et al. 2018).

A abordagem metagenômica tem proporcionado um estudo mais detalhado do microbioma associado aos diferentes nichos ecológicos da cana-de-açúcar (rizosfera, raiz, tolete e folha). Souza et al. (2016) identificaram 23.811 OTUs de bactérias e 11.727 OTUs de fungos habitando os compartimentos endofíticos e exofíticos de raízes, brotos e folhas de cana.

Embora a metagenômica esteja em evidência em estudos relacionados à estrutura e diversidade de comunidades microbianas, incluindo aquelas associadas à cana-de-açúcar (PISA et al., 2011; ARMANHI et al., 2016; DE SOUZA et al., 2016; DOS-SANTOS et al., 2017), estudos dependentes do cultivo ainda são indispensáveis para disponibilizar aos indivíduos representativos estudos bioquímicos, fisiológicos e filogenéticos detalhados, além de desenvolvimento de insumos biotecnológicos.

Dados da literatura que reportam grupos bacterianos encontrados em associação com a cana-de-açúcar foram compilados a fim de verificar os gêneros mais frequentemente identificados nesta cultura. As informações publicadas que constituem o microbioma da cana-de-açúcar, acessadas por meio de abordagens dependentes de cultura e metagenômicas, estão apresentadas no material suplementar Tabela S2 (capítulo 1). Conforme os estudos indicados, 262 gêneros bacterianos diferentes foram descritos em associação à rizosfera, raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar, dos quais 35 (13,4% do total) foram identificados por métodos dependentes e independentes de cultivo (Figura 5 – capítulo 1). No geral, as bactérias encontradas em maior abundância (citadas ≥ 6 estudos) foram: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium* e *Microbacterium* (Figura 2). A classe mais abundante e diversificada de bactérias encontrada em associação com cana-de-açúcar foi a Gammaproteobactéria. (Figura 2). Filotipos representativos de gêneros bacterianos sugeridos como o microbioma central da cana-de-açúcar também são relatados em associação com outras gramíneas, como milho, trigo, arroz e sorgo, com várias estirpes apresentando importantes propriedades promotoras de crescimento (ARRUDA et al., 2013; BERTANI et al., 2016; MONTAÑEZ et al., 2012; MOREIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2011; RODRÍGUEZ-BLANCO; SICARDI; FRIONI, 2015).

Figura 2 Grupos bacterianos mais frequentes encontrados em cana-de-açúcar de acordo com a coleta de dados realizada na literatura (Tabela S2 do capítulo 1). As cores em verde, laranja, azul claro, amarelo e azul escuro representam bactérias das classes Bacilli, Actinobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria, respectivamente.



3.3.1 Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) em cana-de-açúcar

As BPCV são um grupo benéfico de microrganismos que podem ser encontrados na rizosfera, filosfera ou endosfera e promovem o crescimento das plantas direta ou indiretamente (GLICK, 1995; BULGARELLI et al., 2013). A promoção direta ocorre quando as BPCV afetam o metabolismo das plantas fornecendo nutrientes por meio de processos como a fixação biológica de nitrogênio atmosférico (BODDEY; DOBBEREINER, 1988; BALDOCK; BALLARD, 2004), solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999, RODRIGUEZ et al., 2004), produção de hormônios vegetais como auxinas, giberilinas, citocininas e etileno (ZAHIR et al., 2004; GAMALERO; GLICK, 2011). Incrementos no volume radicular promovido pela ação de fitormônios sintetizados por essas bactérias podem favorecer a absorção de água e nutrientes do solo (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004). A promoção indireta de crescimento está relacionada ao controle biológico de fitopatógenos e insetos, aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos, além de outros mecanismos (CORREA et al., 2008; YANG et al., 2009). Em geral, acredita-se que as BPCVs favoreçam o crescimento das plantas por uma combinação de todos esses mecanismos (DOBBELARE; VANDERLEYDERN; OKON, 2003).

A maior contribuição do processo de FBN ocorre pela associação simbiótica de leguminosas com bactérias denominadas rizóbios (HUNGRIA, 2011). Essa simbiose é facilmente identificada devido à formação de uma estrutura especializada nas raízes, o nódulo (HUNGRIA, 2011). Como exemplo, a cultura da soja dispensa totalmente à adição de fertilizantes nitrogenados, pois o nitrogênio proveniente da FBN, realizada por estirpes de *Bradyrhizobium*, supre completamente as necessidades da planta (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). A inoculação em cultivos de soja proporciona um ganho de cerca de US\$ 10 bilhões/ano à economia brasileira (HUNGRIA e MENDES 2015).

Em cana-de-açúcar, as BPCV mais estudadas compreendem os gêneros *Beijerinckia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Azospirillum* (SOUSA et al., 2017). Cavalcante e Döbereiner (1988) foram os primeiros a isolar a partir de cana-de-açúcar o gênero *Gluconacetobacter* capaz de fixar nitrogênio com alta tolerância à acidez. Além de crescer e fixar N em uma ampla faixa de pH (entre 3,0 e 6,0), esse microrganismo também tolera altas concentrações de açúcar (até 30%) e

a presença de altos níveis de nitrato não inibe a atividade da nitrogenase (STEPHAN et al., 1991). Este gênero tem sido isolado de todas as partes da cana-de-açúcar, no entanto, observa-se a prevalência em amostras de tolete, indicando a colonização endofítica (BENEDUZI et al., 2013; DE SOUZA ANTONIO et al., 2016; FUENTES-RAMÍREZ et al., 1999; MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2003; MUTHUKUMARASAMY; REVATHI; LAKSHMINARASIMHAN, 1999; OLIVEIRA et al., 2008; REIS JUNIOR et al., 2000a, 2000b). Além de sua capacidade de fixação de N_2 , *G. diazotrophicus* pode promover e melhorar o crescimento da cana-de-açúcar através de efeitos hormonais nos processos metabólicos devido à sua capacidade de produzir ácido indolacético (AIA) e giberelinas (BASTIÁN et al. 1998; FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993). O sequenciamento completo do genoma de *G. diazotrophicus* Pal5 permitiu identificar genes relacionados ao estilo de vida endofítico, a fixação de nitrogênio, a promoção do crescimento de plantas, sistemas de transporte, a síntese de auxina e a ocorrência de bacteriocinas (BERTALAN et al. 2009).

A cana-de-açúcar é uma das gramíneas que mais se beneficia com a FBN. Considerando que as quantidades de fertilizante nitrogenado aplicadas geralmente não ultrapassam 100 kg ha^{-1} , enquanto é extraído em torno de 150 kg N por hectare para produção de 100 t de colmos, pode-se deduzir que o restante do N utilizado pela planta é proveniente do solo ou de processos naturais. Esta hipótese foi confirmada em análise de 135 experimentos de aplicação de N na cultura, onde foi evidenciado que em apenas 19% ocorreu aumentos significativos na produção de colmos devido à adição mineral de N (URQUIAGA et al., 1992). Estas observações levaram pesquisadores a suspeitar que deveria existir alguma contribuição da fixação biológica de nitrogênio sobre a cultura, ocorrendo uma reposição natural do N exportado. Os estudos sobre a fixação biológica de nitrogênio associada à cana-de-açúcar têm se intensificado nos últimos anos e várias bactérias fixadoras de N_2 foram isoladas de tecidos de diversas partes da planta (BALDANI et al., 2002). A contribuição da FBN para a cultura da cana já foi demonstrada em diversos estudos, implicando em uma redução significativa de custos com fertilizantes. Esses resultados mostram que até 70% do nitrogênio acumulado no vegetal foi proveniente deste processo biológico (URQUIAGA et al., 1992; URQUIAGA et al., 2011). OLIVEIRA et al. (2002) também verificaram que a inoculação de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar com bactérias diazotróficas, pode apresentar

aumentos de até 30% de N na planta. Diferentes estirpes bacterianas representativas do microbioma da cana-de-açúcar também demonstraram aumentar o crescimento e a produtividade das plantas, quando usadas como inoculantes (GONZÁLEZ; VICTORIA; MERINO, 2015; OLIVEIRA et al., 2006; SCHULTZ et al., 2016).

Estima-se que a FBN associada ao cultivo da cana-de-açúcar no Brasil, gera N uma economia de N-fertilizante equivalente a US\$ 300 milhões, contribuindo para a conservação do meio ambiente (URQUIAGA et al., 2005), porém, outros fatores como: tipo de solo, manejo, genótipo da bactéria e genótipo da planta podem interferir nesse processo.

3.4 Aplicação de BPCV em culturas agrícolas

A agricultura brasileira apresenta alto consumo de fertilizantes, sendo o quarto maior consumidor mundial. No entanto, o país permanece dependente da disponibilidade e dos preços do mercado internacional, uma vez que a produção nacional de fertilizantes supre somente cerca de 30% do mercado (ANDA, 2014). Além dos aspectos econômicos, problemas ambientais podem ser parcialmente atribuídos ao uso indiscriminado de fertilizantes industrializados como a contaminação da água e do solo, a diminuição da biodiversidade nos agroecossistemas, o aparecimento de problemas fitossanitários, entre outros (FERRAZ, 1999).

Neste contexto, a utilização de BPCVs em ambientes agrícolas é uma alternativa frente ao uso de fertilizantes químicos, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e de menor impacto ambiental (HERRMANN; LESUEUR, 2013). A inoculação desses microrganismos em cultivos agrícolas é realizada pela aplicação de um produto chamado inoculante. Segundo o MAPA, o inoculante é definido como um produto que contém microrganismos que atuam favoravelmente no desenvolvimento das plantas (MAPA, 2011). No entanto, o termo utilizado e a definição de inoculante podem ser passíveis de modificações e ampliações à medida que o conhecimento sobre o assunto avança (SILVA, 2009). Alguns autores referem-se a este produto utilizando o termo biofertilizante (BUCHER; REIS, 2008; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012; HERRMANN; LESUER, 2013).

Os inoculantes têm sido utilizados por mais de um século, e a comercialização desse produto teve início nos EUA, após o registro da primeira patente de inoculante contendo rizóbio ("Nitragin"), para a aplicação em leguminosas no ano de 1896 (NOBBE; HILTNER, 1896 apud BASHAN, 1998). Após esse período, a inoculação de estirpes de rizóbio em leguminosas tornou-se uma prática comum (BASHAN, 1998). No Brasil, a produção industrial destes inoculantes começou na década de 50 (FREIRE, 1968), a partir do estudo de bactérias fixadoras de nitrogênio para a cultura da soja. Atualmente, a aplicação de inoculantes em leguminosas como a soja é um método bem consolidado, levando o país à liderança mundial no uso de bactérias fixadoras de nitrogênio na agricultura (ARAUJO, 2014). Além das leguminosas, há alguns anos têm-se conhecimento da ocorrência de associação entre bactérias diazotróficas com espécies da família Poaceae, além de outras famílias vegetais. Dessa forma, em 2010 foi possível o desenvolvimento do primeiro inoculante comercial para milho e trigo pela EMBRAPA Soja (PR), em parceria com a Universidade Federal do Paraná (UFPR) e a iniciativa privada. Ao longo de cinco anos de estudo, os resultados mostraram incrementos médios de 25% a 30% no rendimento do milho e de 13% a 18% no rendimento do trigo (HUNGRIA, 2011).

Em 2016 foram comercializadas aproximadamente 50 milhões de doses de inoculantes no Brasil, dos quais a maioria delas é destinada à cultura da soja (ANPII, 2018). Juntamente com o Brasil, a Argentina é um dos maiores produtores e usuários de inoculantes do mundo (DAMASCENO, 2011). A utilização de inoculantes microbianos em ambientes agrícolas tem apresentado um interesse crescente na atualidade e, em comparação com os produtos químicos, estes apresentam as seguintes vantagens (BERG, 2009; BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012):

- ❖ aumento no crescimento das plantas e na produtividade da cultura pela disponibilidade de nutrientes;
- ❖ protege as plantas contra patógenos;
- ❖ auxilia no crescimento da planta sob condições de estresse bióticos e abióticos;

- ❖ promove a melhoria indireta na qualidade do solo;
- ❖ reduz a poluição ambiental causada pela aplicação de fertilizantes e produtos químicos utilizados na agricultura;
- ❖ são eficazes em pequenas quantidades;
- ❖ oferece uma maior economia ao agricultor, uma vez que, os fertilizantes nitrogenados podem chegar a participar com até 40% dos custos de produção (MC LAUGHLIN et al., 2000; HUNGRIA; VARGAS, 2000). Além disso, o baixo custo dos inoculantes cria também condições para que agricultores familiares e/ou de baixa renda utilizem esta tecnologia.

Ainda com relação à economia, no Brasil, considerando somente a reposição parcial do fertilizante nitrogenado (50%) requerido por culturas como o milho e o trigo, a eficiência de utilização dos fertilizantes nitrogenados pelas plantas e o preço médio tradicional dos fertilizantes no mercado nacional a US\$ 1 por kg de N, estima-se que o uso dos inoculantes nessas culturas possa resultar em uma economia estimada de R\$ 4,6 bilhões por ano (HUNGRIA, 2011). Já no caso de inoculação da soja, a cultura dispensa totalmente o uso de fertilizantes nitrogenados, o que resulta em uma economia de cerca de US\$ 10 bilhões anualmente no país (HUNGRIA e MENDES 2015).

3.4.1 Formulação e Produção de Inoculantes

O sucesso da tecnologia de inoculação de BPCVs depende de dois fatores: da estirpe microbiana e da formulação do inoculante (BRAHMAPRAKASH; SAHU, 2012). A formulação consiste de um veículo que deve proporcionar um ambiente adequado, que confira proteção física, e permita uma alta densidade de células viáveis no produto até sua utilização a campo. Além disso, qualquer formulação deve ser estável durante a produção, armazenamento e transporte até o agricultor. Deve-se levar em conta também a facilidade no manuseio e na aplicação do produto a campo, tendo em vista as limitações dos produtores agrícolas (BASHAN, 1998; BASHAN et al., 2013; HERRMANN; LESUEUR, 2013).

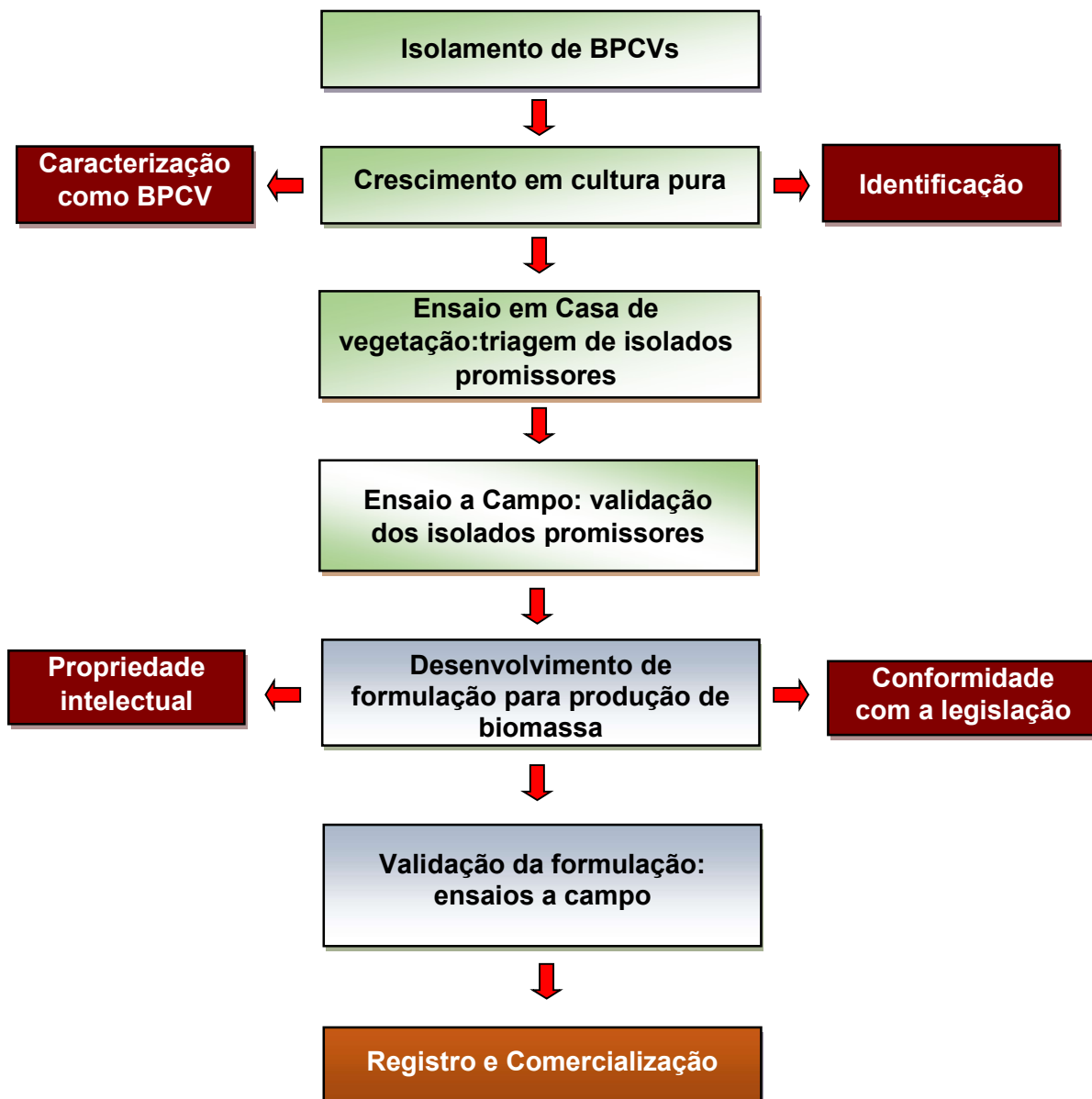
Uma formulação inoculante de excelente qualidade é o resultado de um processo polifásico e multidisciplinar que requer várias etapas até a obtenção de um

produto comercial (Figura 1). Um dos primeiros e mais importantes passos na produção de um inoculante é a seleção de estirpes de BPCVs com alto potencial biotecnológico (HUNGRIA et al., 2005). Para a escolha das estirpes, são necessários estudos *in vitro* que permitam a identificação e caracterização dessas bactérias, bem como ensaios em casa de vegetação e em condições de campo para validação das estirpes. O passo seguinte é a elaboração de uma formulação de inoculante para a cultura-alvo. As estirpes bacterianas selecionadas são geralmente cultivadas em meio líquido para obtenção de altos níveis populacionais, sendo que a composição do meio e as condições do cultivo (temperatura, agitação, tempo de cultivo) estão diretamente relacionadas com a natureza da estirpe e o tipo de inoculante que será produzido. Os cultivos de bactérias são então incorporados ao veículo se este for sólido, e quando o inoculante for líquido, realiza-se a adição de aditivos. Para produção industrial em larga escala, o cultivo da estirpe bacteriana é realizado em fermentadores (BURTON, 1984; BASHAN, 1998; ANPII, 2012; BASHAN et al., 2013; HERRMANN; LESUEUR, 2013).

No Brasil, o inoculante é desenvolvido e produzido de acordo com protocolos estabelecidos pela RELARE. A RELARE é um fórum em que os pesquisadores se reúnem a cada dois anos e, após análise dos resultados obtidos, uma lista com as estirpes selecionadas passam a ser recomendadas. Se aprovadas, as estirpes são cadastradas pelo MAPA para que possam ser usadas na produção de inoculantes (MAPA, 2011). A determinação das estirpes recomendadas é complexa, pois deve considerar fatores como: a eficiência com as cultivares recomendadas, capacidade de competir com os microrganismos estabelecidos no solo, apresentar fermentação adequada na indústria e, principalmente, ter a capacidade de se adaptar aos solos, sem prejuízo à comunidade microbiana nativa (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; HERRMANN; LESUEUR, 2013).

Bashan et al. (2013) relatam que a literatura científica está repleta de estirpes com alto potencial biotecnológico, no entanto, estas não aparecem no mercado comercial possivelmente pela falta de uma formulação apropriada. Dessa forma, um dos maiores desafios na atualidade é desenvolver uma formulação de inoculante que reúna todas as características acima descritas e que seja adequada para o uso sob condições de campo (HERRMANN; LESUEUR, 2013).

Figura 3 Fluxograma de procedimentos para o desenvolvimento de inoculantes.



Fonte: Adaptado de Bashan et al. (2013).

4 REFERÊNCIAS

ARAÚJO, S.C. **A evolução da produção de inoculantes no Brasil**. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/?artigos/6/a_evolucao_da_producao_de_inoculantes_no_brasil/30/>. Acesso em: 6 abr. 2014.

ANPII - **Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes**. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/homesite/default.asp>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

ANDA – **Associação Nacional para Difusão de Adubos**. Disponível em <<http://www.anda.org.br/estatisticas.aspx>>. Acesso em: 19 jan. 2014.

ANTONIO, C. DE SOUZA et al. Diazotrophic bacteria associated to sugarcane varieties cropped at Northeast Region of Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 4, p. 272–280, 2016.

ANTUNES, J. E. L. et al. Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 2017.

ARMANHI, J. S. L. et al. Multiplex amplicon sequencing for microbe identification in community-based culture collections. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–9, 2016.

ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15–22, 2013.

BAIS, H. P. et al. the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 233–266, 2006.

BALDANI, J. I. et al. Review: A brief story of nitrogen fixation in sugarcane — reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 29, n. 4, p. 417, 2002.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media : a practical guide for microbiologists. p. 413–431, 2014.

BASHA, S. A. et al. Performance of Native Fluorescent *Pseudomonas* on in vitro Seed Germination and Seedling Vigour of *Sorghum bicolor* (L .) Moench. **International Journal of Bio-resource and Stress Management**, v. 4, n. 4, p. 487–491, 2013.

BASHAN, Y. INOCULANTS OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA FOR USE IN AGRICULTURE. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729–770, 1998.

BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 1886, 19 nov. 2013.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. Azospirillum-plant relationships : physiological , molecular , agricultural , and environmental advances (1997 – 2003).

Canadian Journal of Microbiology, v. 50, p. 521–577, 2004.

BENEDUZI, A. et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94–104, 2013a.

BENEDUZI, A. et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94–104, jan. 2013b.

BERG, G. et al. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 2, p. 215–229, 2005.

BERTANI, I. et al. Rice bacterial endophytes: Isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. **Environmental Microbiology Reports**, v. 8, n. 3, p. 388–398, 2016.

BEUKES, C. W. et al. Genome data provides high support for generic boundaries in *Burkholderia* sensu lato. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–11, 2017.

BODDEY, R. M. et al. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: Present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 139–149, 2003.

BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K. Biofertilizers for Sustainability. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 92, p. 26, 2012.

BRENNER, J.; KALESINSKAS, L.; PUTONTI, C. Exploring the Diversity of *Bacillus* whole genome sequencing projects using Peasant, the Prokaryotic Assembly and Annotation Tool. **bioRxiv**, 2017.

BULGARELLI, D. et al. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807–838, 2013.

BUTT, A. T.; THOMAS, M. S. Iron Acquisition Mechanisms and Their Role in the Virulence of *Burkholderia* Species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. November, p. 1–21, 2017.

CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, n. 1, p. 23–31, 1988.

CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D. J.; SHARMA, A. Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes From Sugarcane and Their Potential in Promoting Growth of the Host Under Field Conditions. **Experimental Agriculture**, v. 49, n. 1, p. 43–52, 6 nov. 2012.

CRUZ, L. M. et al. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas* 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa* spp.) and Pineapple (*Ananas comosus* (L. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375–2379, 2001.

- CUESTA, G. et al. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. **Journal of environmental management**, v. 95 Suppl, p. S280-4, mar. 2012.
- DE SOUZA, R. S. C. et al. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–15, 2016.
- DE SOUZA ANTONIO, C. et al. Diazotrophic bacteria associated to sugarcane varieties cropped at Northeast Region of Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 4, p. 272–280, 2016.
- DEPOORTER, E. et al. Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5215–5229, 2016.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**, 1995.
- DOBRITSA, A. P.; SAMADPOUR, M. Transfer of eleven species of the genus Burkholderia to the genus Paraburkholderia and proposal of Caballeronia gen. nov. to accommodate twelve species of the genera Burkholderia and Paraburkholderia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 2836–2846, 2016.
- DONG, M. et al. Diversity of the bacterial microbiome in the roots of four saccharum species: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, and *S. officinarum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–10, 2018.
- DOS-SANTOS, C. M. et al. A Culture-Independent Approach to Enrich Endophytic Bacterial Cells from Sugarcane Stems for Community Characterization. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 2, p. 453–465, 2017.
- DOTY, S. L. Functional importance of the plant microbiome: Implications for agriculture, forestry and bioenergy. **Functional Importance of the Plant Microbiome: Implications for Agriculture, Forestry and Bioenergy**, p. 1–111, 2017.
- DRECHSEL, M. M. **Antibiose de Gluconacetobacter diazotrophicus contra bactérias diazotróficas e fitopatogênica de cana-de- açúcar e caracterização molecular de genes envolvidos na síntese de substâncias antagônicas**. [s.l: s.n.].
- DUFOUR, P. et al. Construction of a composite sorghum genome map and comparison with sugarcane, a related complex polyploid. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, n. 3–4, p. 409–418, 1997.
- FRANCO, H. C. J. et al. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, v. 121, n. 1, p. 29–41, fev. 2011.
- FUENTES-RAMÍREZ, L. E. et al. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, v.

29, n. 2, p. 117–128, 1999.

GALKOVSKIY, T. et al. GiA Roots : software for the high throughput analysis of plant root system architecture. 2012.

GARCÍA-FRAILE, P. et al. Rhizobium promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

GARRIDO-SANZ, D. et al. Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluoresces* complex. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 2016.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 963401, jan. 2012.

GOMILA, M. et al. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–13, 2015.

GONZÁLEZ, A. M.; VICTORIA, D. E.; MERINO, F. C. G. Efficiency of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Sugarcane. **Terra Latinoamericana**, v. 33, n. 4, p. 321–330, 2015.

GOVINDASAMY, V. et al. Functional and phylogenetic diversity of cultivable rhizobacterial endophytes of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 7, p. 925–943, 2017.

HABIBI, S. et al. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. **Plant and Soil**, v. 379, n. 1–2, p. 51–66, 2014.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, p. 95–98, 1999.

HAMONTS, K. et al. Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 124–140, 2018.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859–73, out. 2013.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, n. 347, p. 1–32, 1950.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja**, p. 36, 2011.

HUNGRIA, M.; CAMPOS, R. J.; MENDES, I. C. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO NA CULTURA DA SOJA. **Embrapa Soja**, p. 48, 2001.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V. **Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de**

Plantas por BOX-PCREEmbrapa, 2008.

IDRIS, A.; LABUSCHAGNE, N.; KORSTEN, L. Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. **The Journal of Agricultural Science**, v. 147, n. 1, p. 17, 13 nov. 2008.

JAMES, E. K. et al. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 6, p. 757–766, 1994.

JESUS, J. A. DE. **Jucimara anúncio de Jesus**. [s.l.: s.n.].

KHAN, A. L. et al. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 689–695, 2014.

KIMURA, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 1330, p. 111–120, 1980.

KRUASUWAN, W.; THAMCHAIPENET, A. Diversity of Culturable Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes Associated with Sugarcane Roots and Their Effect of Growth by Co-Inoculation of Diazotrophs and Actinomycetes. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 4, p. 1074–1087, 2016.

KUMAR, G. . . et al. Plant Growth Promoting *Pseudomonas* spp . from Diverse Agro-Ecosystems of India for *Sorghum bicolor* L . **Journal of Biofertilizers & Biopesticides**, v. 7, p. 2, 2012.

LAMERS, R. P. et al. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, 2012.

LOPES, L. D. et al. Tropical soils are a reservoir for fluorescent *Pseudomonas* spp. biodiversity. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 62–74, 2018.

LOPES, L. D.; PEREIRA E SILVA, M. DE C.; ANDREOTE, F. D. Bacterial abilities and adaptation toward the rhizosphere colonization. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–13, 2016.

LUO, S. et al. Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1745–1753, 2012.

MAGNANI, G. S. et al. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 250–258, 2010.

MAGNANI, G. S. et al. Culture-independent analysis of endophytic bacterial communities associated with Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4549–4558, 2013.

MAREQUE, C. et al. Isolation , characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). p. 1057–1067, 2015.

MENDES, R. et al. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of Burkholderia cepacia complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7259–7267, 2007.

MILANI, K. M. L.; MACHINESKI, O.; BALOTA, E. L. OCORRÊNCIA E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, p. 1345–1351, 2011.

MING, R. et al. Detailed alignment of Saccharum and Sorghum chromosomes: Comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, v. 150, n. 4, p. 1663–1682, 1998.

MONTAÑEZ, A. et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21–28, 2012.

MOREIRA, F. S. et al. Functional abilities of cultivable plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum* L .) crops. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 111–121, 2016.

MOUSAVI, S. A. et al. Phylogeny of the Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 208–215, 2014.

MOUSAVI, S. A. et al. Revised phylogeny of Rhizobiaceae: Proposal of the delineation of Pararhizobium gen. nov., and 13 new species combinations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 84–90, 2015.

MÜLLER, D. B. et al. The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. **Annual Review of Genetics**, v. 50, n. 1, p. 211–234, 2016.

MUÑOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. **Microbial Ecology**, v. 46, n. 4, p. 454–464, 2003.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 2, p. 157–164, 1999.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1–2, p. 23–32, jun. 2006.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 106–113, jan. 2008.

OLIVEIRA, A. L. M. DE et al. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 56, 22 set. 2014.

ORMEÑO-ORRILLO, E. et al. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2012.

PATIL, N. .; SHINDE, S. R. Isolation, molecular characterization and plant growth promoting traits of *Neosasaia Chiangmaiensis* (KD) from banana. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 1, p. 309–319, 2014.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 57, n. October 2017, p. 106–116, 2018.

PEREIRA, P. et al. Analysis of the Bacterial Diversity Associated with the Roots of Maize (*Zea mays* L.) through Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. **ISRN Ecology**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

PISA, G. et al. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 12, p. 1215–1221, dez. 2011.

RADEMAKER, J. L. .; DE BRUIJIN, F. . CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION OF MICROBES BY REP-PCR GENOMIC FINGERPRINTING AND COMPUTER-ASSISTED PATTERN ANALYSIS. **DNA markers: Protocols, Applications and Overviews**, p. 1995–1998, 1996.

REIS JUNIOR, F. et al. Levantamento e quantificação de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 985–994, 2000a.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v. 219, n. 1981, p. 153–159, 2000b.

RODRIGUES, A. A. et al. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane 1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 2, p. 149–158, 2016.

RODRÍGUEZ-BLANCO, A.; SICARDI, M.; FRIONI, L. Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 3, p. 391–402, 2015.

ROSSETTO, R. ; DIAS, F. L. F. ; VITTI, A. C.. Fertilidade do solo, nutrição e adubação. Em: Leila Luci DINARDO-MIRANDA; Antonio Carlos Machado de VASCONCELOS; Marcos Guimarães de Andrade LANDELL. CANA-DE-AÇÚCAR. Campinas. IAC. 2008.v. 1, p. 221-237

SÁEZ-NIETO, J. A. et al. Paenibacillus spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. **New Microbes and New Infections**, v. 19, p. 19–27, 2017.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method : A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus burkholderia: Proposal for division of this genus into the emended genus burkholderia containing pathogenic organisms and a new genus paraburkholderia gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. NOV, p. 1–22, 2014.

SCHULTZ, N. et al. INOCULATION OF SUGARCANE WITH DIAZOTROPHIC BACTERIA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 6, p. 407–414, 2014.

SCHULTZ, N. et al. Produtividade e diluição isotópica de ¹⁵N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1594–1601, 2016.

SCHULTZ, N. et al. Yield of sugarcane varieties and their sugar quality grown in different soil types and inoculated with a diazotrophic bacteria consortium. **Plant Production Science**, v. 20, n. 4, p. 366–374, 2017.

SILVA, M. F. DA. **Uso de Inoculante Polimérico contendo Bactérias Diazotróficas na Cultura da Cana-de-açúcar**. [s.l: s.n.].

SOUSA C. P., Serrano N. F. G., Lacava P. T. (2017). Endophytic microorganisms of the tropical savannah: a promising source of bioactive molecules, in Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics, eds de Azevedo J., Quecine M., editors. (Cham: Springer;), 57–70

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. et al. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2014.

TAKAHASHI, T.; SATOH, I.; KIKUCHI, N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16s rRNA gene sequence analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 725–728, 1999.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

TAULÉ, C. et al. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 35–49, 26 out. 2011.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting , position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**,

v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

URQUIAGA, S. et al. Evidence from field nitrogen balance and ^{15}N natural abundance data for the contribution of biological N_2 fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 5–21, 22 out. 2011.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 407–438, 1996.

VERMA, P. et al. Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 44–58, 2016.

VERSALOVIC, J. et al. **Microbial DNA typing by automated repetitive sequence-based PCR. Methods in Molecular and Cellular Biology**, 1994.

WANG, A.; ASH, G. J. Whole Genome Phylogeny of *Bacillus* by Feature Frequency Profiles (FFP). **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–14, 2015.

WANG, J. et al. Microcollinearity between autopolyploid sugarcane and diploid sorghum genomes. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, 2010.

WANG, Q. et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

XIE, J. B. et al. Comparative Genomic Analysis of N_2 -Fixing and Non- N_2 -Fixing *Paenibacillus* spp.: Organization, Evolution and Expression of the Nitrogen Fixation Genes. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 3, 2014.

YEOH, Y. K. et al. The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1338–1351, 2016.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the Phototrophic *Rhizobium* Strain BTAil by Polymerase Chain Reaction-Based Sequencing of a 16S rRNA Gene Segment. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2271–2277, 1991.

**CAPÍTULO 1 - IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA E ANÁLISE DA DIVERSIDADE
DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETAL**

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Origem das Estirpes Bacterianas

As estirpes estudadas (69) são provenientes de amostras de solo, rizosfera+raiz (raízes lavadas mas não desinfestadas), tolete e folhas de cana-de-açúcar coletadas em duas regiões do Paraná, Brasil: Londrina (23° 17' 34" S, 51° 10' 24" O) e Paranavaí (23° 4' 26" S, 52° 27' 55" O). O isolamento foi realizado em diferentes meios de cultura livres de nitrogênio (NFB, LGI-p, LGI) (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995) e o processo está detalhado no trabalho realizado por Milani, Machineski e Balota (2011). Todas as bactérias estão armazenadas no laboratório de bioquímica molecular da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil, estocadas em glicerol (50% v/v), a -20°C.

Tabela 1. Coleção de bactérias isoladas de amostras de solo, rizosfera+raiz, tolete e folha de cana-de-açúcar (cultivares RB 855546; RB 845210; RB 72454; RB 867515; RB 855156) plantadas em duas regiões do Paraná.

Origem geográfica	Meio de cultura	Rhizofera			Folha	Total
		Solo	+ raiz	Tolete		
Número de isolados						
Paranavaí-PR	NFB	4	Ø	4	4	12 (17,4%)
	LGI-p	3	5	4	4	16 (23,2%)
	LGI	4	3	4	5	16 (23,2%)
Londrina-PR	NFB	1	7	2	4	14 (20,3%)
	LGI-p	1	7	2	1	11 (15,9%)
	LGI			Ø		
Total		13 (18,8%)	22 (31,9%)	16 (23,2%)	18 (26,1%)	69

Meio NFB, LGI-p, LGI (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

1.2 Caracterização Genética

A posição taxonômica de cada isolado foi acessada por meio do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S rRNA e a diversidade genotípica foi analisada pela técnica de BOX-PCR.

1.2.1 Extração do DNA Genômico

O DNA genômico total dos isolados foi extraído segundo método descrito por Hungria, Chueire e Bangel (2008). As bactérias foram cultivadas individualmente em 5 mL de meio de cultura DYGS líquido (RODRIGUES NETO et al., 1986) sob agitação constante (180 rpm) a 28°C ± 2°C por 24 h. Após este período de

crescimento, 1,5 mL das suspensões bacterianas foram centrifugadas a 9.500 g por 10 min e o pellet lavado por três vezes com solução salina (NaCl 0,85% p/v). A biomassa celular presente na fração precipitada foi ressuspensa em 400 µL do tampão Tris-EDTA (TE) 50:20 (50 mM de Tris-HCl pH 8,0; 20 mM de EDTA- Na_2 pH 8,0), 50 µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10% (p/v), 5 µL de proteinase K (20 mg mL⁻¹), 10 µL de lisozima (5 mg mL⁻¹) e 1 µL de RNAse (10 mg mL⁻¹). As amostras foram incubadas a 37°C ± 2°C durante uma hora e homogeneizadas utilizando-se ponteiras de 1 mL para retirar a viscosidade. Decorrido o tempo de incubação, foram adicionados 23,5 µL de NaCl 5 mol L⁻¹, 47 µL de C₂H₃O₂Na 3 mol L⁻¹, deixando as amostras em repouso por uma hora na geladeira. Em seguida, foi realizada uma centrifugação a 12.000 rpm por 15 min, e ao volume de 300 µL do sobrenadante foram adicionados 600 µL de etanol absoluto gelado 95% (v/v). As amostras foram armazenadas overnight a -18 °C e posteriormente centrifugadas (12.000 rpm por 15 min). Ao precipitado foram adicionados 400 µL de etanol absoluto gelado 70% (v/v) para retirar o excesso de sais, seguindo uma nova centrifugação (12.000 rpm, 15 min). O sobrenadante foi descartado, o pellet foi seco em temperatura ambiente e ressuspensa em 120 µL de tampão TE 10:1 (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA pH 8,0). Os DNAs extraídos foram mantidos a -20°C.

1.2.1.1 Quantificação, Pureza e Integridade do DNA

A quantificação e análise de pureza do DNA foi verificada em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific). A integridade do DNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) com tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 0,5X (diluído a partir do TBE 5X – 54 g L⁻¹ de tris-base; 27,5 g L⁻¹ de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0), durante 40 min a 90 volts. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,2 µg mL⁻¹), visualizado por incidência de luz ultravioleta em transluminador (mini-sistema Alphamager- Cell Biosciences) e documentado (software AlphaView - Alpha Innotech).

1.2.2 Sequenciamento Parcial do gene 16s rRNA

1.2.2.1 Amplificação do gene 16S rRNA

As amostras de DNA foram submetidas à amplificação parcial do gene 16S rRNA utilizando os iniciadores Y1 e Y3 (Tabela 2) descritos por Young, Downer e Eardly (1991) e CRUZ et al. (2001), respectivamente. Para reação, foram utilizados

50 ng de DNA extraído de cada isolado, 1,5 μL de cada iniciador (20 pmol μL^{-1}), 1 μL de dNTPs (10 mM de cada base), 5 μL de tampão 10X Rnx Buffer, 2,2 μL de MgCl_2 (50 mM), 0,5 μL de enzima *Taq* DNA polimerase (5 U μL^{-1}) e água ultrapura estéril para um volume final de 50 μL . A reação de amplificação seguiu com uma etapa de desnaturação inicial (93 °C, 5 min); 35 ciclos de desnaturação (93 °C, 45 seg), anelamento (64 °C, 45 seg), extensão (72 °C, 2 min) e uma extensão final (72 °C, 5 minutos). O produto de amplificação foi avaliado por eletroforese em gel de agarose (1% p/v) submetido a corrente de 90 volts por 40 min imerso em tampão TBE 0,5X. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$), visualizado e documentado conforme descrito acima (item 1.2.1.1). Como padrão do peso molecular foi utilizado 1 Kb Plus DNA ladder (invitrogen).

1.2.2.2 Purificação

Os produtos de PCR foram purificados utilizando a enzima ExoSAP-IT® (USB® Corporation, Cleveland, Ohio, USA), que consiste em duas enzimas hidrolíticas, a Exonuclease I (degrada primers e DNA de cadeia simples inespecífico) e uma Fosfatase Alcalina (hidrolisa os nucleotídeos em excesso). Foram adicionados 2 μL da enzima para cada 10 μL do produto de amplificação, sendo mantidos a 37 °C \pm 2°C por 15 min, seguido de mais 15 min a 80°C \pm 2°C para inativação da atividade da enzima. Após a purificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, conforme descrito no item 1.2.2.1, para verificar a intensidade da banda. Amostras que apresentaram bandas fracas foram concentradas em concentrador a vácuo (Concentrador Plus, Eppendorf).

1.2.2.3 Reação de sequenciamento

Após a etapa de purificação, os produtos de PCR foram submetidos a uma nova amplificação, necessária para a etapa de sequenciamento. As reações foram realizadas em microplacas com 96 poços utilizando 3 μL do produto de PCR purificado, 1 μL do iniciador 362f (3,2 pmol μL^{-1}) (Tabela 2; CRUZ et al., 2001), 1,3 μL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), 2,5 μL do tampão 5X e água ultrapura estéril para um volume final de 20 μL . As condições de termociclagem foram desnaturação inicial (96 °C, 1 min), seguida de 35 ciclos de desnaturação (96 °C, 15 seg), anelamento (50 °C, 15 seg) e extensão (60 °C, 4 min). Em seguida, as amostras amplificadas foram precipitadas adicionando em cada

poço da placa 65 µL de etanol absoluto (99,5% v/v) e 2 µL de acetato de amônio (7,5 M). A placa foi selada e centrifugada por 45 min a 2149 g e 23°C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado lavado com 150 µL de etanol 70% (v/v) seguido de nova centrifugação (20 min a 2149 g e 23 °C). Após o descarte do sobrenadante, a microplaca foi invertida sobre papel absorvente, para retirar o excesso de etanol, e seca a 37°C ± 2°C por 1 h. O DNA foi ressuspendido em 10 µL de formamida, e a microplaca foi conduzida ao sequenciador automático MegaBACE 1000 DNA Analyses System (Amershan Biosciences) para a reação de sequenciamento.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

Iniciador	Tamanho (pb)	Posição no 16S rDNA de <i>E. coli</i>	Sequencia (5' -> 3')	Tm (°C)	Referência
Y1f	24	20 - 43	TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	80,56	YOUNG et al. 1991
Y3r	26	1482 - 1507	TACCTTGTTACGACTTCACCCAGTC	67,71	CRUZ, 2001
362f	24	362 - 385	CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG	76,62	CRUZ, 2001

1.2.2.4 Análise das sequências

Os cromatogramas obtidos foram analisados utilizando o software BioNumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica, v. 7.0) e as sequências foram comparadas no banco de dados Ribossomal Database Project (RDP), usando a ferramenta Classifier (WANG et al., 2007) para identificar as estirpes quanto ao gênero (limite de confiança de 90%). O alinhamento das sequências de DNA e as árvores filogenéticas foram construídas utilizando o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 7.0 (TAMURA et al., 2013). As sequências foram alinhadas com estirpes tipo pelo Clustal W e as árvores filogenéticas foram geradas utilizando o modelo de distância Kimura 2 (K2P) e algoritmo Neighbor-Joining (NJ) com bootstrap de 1000 repetições.

Os índices de diversidade de shannon-Wiener (H'), riqueza (J1a), equidade J (Eq) e dominância de Berger-Parker (d) foram calculados utilizando o programa DivES (Diversidade de Espécies v3.0) (RODRIGUES, 2015). Os índices foram estimados com base no número total de gêneros bacterianos identificados a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Os valores obtidos em relação ao índice de Shannon-Wiener foram submetidos ao teste *t* de Student. Uma análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para determinar a correlação entre a

diversidade bacteriana e os tipos de amostras (solo, rizosfera+raiz, tolete e folha), localidade (Londrina-PR e Paranaíba-PR), variedades (RB 855546; RB 845210; RB 72454; RB 867515; RB 855156) e meios de cultura utilizados no isolamento (NFB, LGI-p,LGI).

1.2.3 Amplificação do DNA genômico pela técnica Rep-PCR (BOX-PCR)

O DNA das bactérias foi amplificado utilizando o oligonucleotídeo iniciador BOX-A1R (5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), que amplifica regiões de ocorrência natural altamente conservadas e repetitivas do DNA cromossômico (VERSALOVIC et al., 1994). A metodologia utilizada foi descrita por Rademaker e de Bruijn (1997). As reações de amplificação foram realizadas com volume final de 25 μL contendo: 5,0 μL de tampão Gitschier 5X (Kogan et al., 1987); 0,2 μL de albumina do soro bovino (BSA) (20 mg mL^{-1}); 2,5 μL de Dimetilsulfóxido (DMSO) 100%; 12,15 μL de H_2O ultrapura estéril; 1,25 μL de dNTPs (25 mM de cada base); 2,5 μL do oligonucleotídeo BOX-A1R ($20 \text{ pMol } \mu\text{L}^{-1}$); 0,4 μL de Taq DNA polimerase ($5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) e 1 μL do DNA molde ($50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$). A amplificação foi realizada em termociclador usando os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 95°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturação (94°C , 3 seg; 92°C , 30 seg), anelamento (50°C , 1 min), extensão (65°C , 8 min) e um ciclo de extensão final a 65°C por 8 min. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) com tampão TBE 0,5X por 10 h a 60 volts e corrente entre 30 – 40 mA. O gel foi corado em solução de brometo de etídio ($0,2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), visualizado e documentado conforme descrito no item 1.2.1.1. Para assegurar os resultados obtidos, foi utilizado controle positivo e controle negativo (água ultrapura estéril) para cada conjunto de reações de amplificação.

1.2.3.1 Análise

O perfil das bandas no gel foi analisado no programa Bionumerics (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica, versão 4.6), utilizando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) para a análise de agrupamento e o coeficiente Jaccard (JACCARD, 1912). O dendograma foi construído com tolerância das bandas estabelecida em 2%.

ARTIGO: Comparative analysis of cultivable diazotrophic bacteria isolated from sugarcane in the state of Paraná

Karina Maria Lima Milani¹, Mónica Yorlady Alzate Zuluaga¹, André Luiz Martinez de Oliveira^{1,*}, Elcio Libório Balota²

¹ Universidade Estadual de Londrina, Dept. Biochemistry and Biotechnology, C.P. 10.011, 86057-970, Londrina, PR, Brazil.

²Instituto Agrônômico do Paraná, C.P. 481, 86001-970, Londrina, Paraná, Brazil.

*Corresponding author: Universidade Estadual de Londrina, Dept. Biochemistry and Biotechnology, C.P. 10.011, 86057-970, Londrina, PR, Brazil. Email: almoliva@uel.br

Abstract

The objective of this work was to establish the identity and phylogenetic position of 69 bacterial strains, originally isolated from sugarcane cultivated in the State of Paraná, Brazil. We also evaluated the bacterial diversity in relation to the isolation site (Paranavaí and Londrina, Brazil), plant genotype (5 different varieties) and bacterial habitat (soil, washed roots, stem, and leaves). The identification of isolates was performed based on the partial sequencing of the 16S rRNA gene. Differences between the bacterial communities associated to sugarcane were measured through the indices of Shannon (H'), richness (J1a) and Berger-Parker dominance (d), estimated according to the number of different genera as defined by 16S rRNA gene sequence analysis. Most of the identified isolates were associated with the Proteobacteria phylum (85,5%), including the classes Gammaproteobacteria (53.6%), Betaproteobacteria (21.7%) and Alphaproteobacteria (10.1%). We also identified representatives of the Firmicutes phylum, however, in a low percentage (14,5%). In total, 44 species belonging to 17 different genera were identified, with *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Acinetobacter* and *Rhizobium* found in greater abundance. Differences in the distribution of bacterial phylotypes were observed in relation to the ecological niche, geographical origin, sugarcane variety and culture medium used for isolation. This study highlights the importance of culture-dependent microbiological approaches to detect some bacterial groups, such as *Gluconacetobacter diazotrophicus* that seems cryptic in sugarcane and not found in culture-independent studies.

Introduction

The plant-associated microbial community has proven to rule specialized activities in ecosystems and plant development, raising up interest in a better knowledge of plant microbiomes composition and function. It has been stated that the phylogenetic structure of prokaryotes in the plant microbiomes comprises dominant phyla, mainly Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes and, to a lesser extent, Firmicutes (MÜLLER et al., 2016). The outcome of plant-microorganism interactions is dependent on several factors, that jointly determine whether a compatible interaction would produce beneficial or deleterious effects to the involved organisms. Putative beneficial microorganisms have been continuously described in association with economically important crops, such as maize (*Zea mays*), wheat (*Triticum aestivum*), soybean (*Glycine max*), rice (*Oryza sativa*) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Such organisms are found colonizing each plant tissue, from the rhizosphere to inner meristematic tissues and are thought to affect plant growth through direct (biological nitrogen fixation, phytohormones synthesis and phosphate solubilization) and/or indirect mechanisms (biocontrol of phytopathogens and insects, increased resistance against stresses, modulation of plant gene expression) (BULGARELLI et al., 2013). Considering the need for modern agriculture move towards biofuel production in line with the sustainability principles, highly productive crops must be better studied to understand how its associated microbiome can be explored to favor the plant growth-promoting bacteria (PGPB) expression traits and achieve higher productivities under lower use of industrial inputs.

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is an important tropical crop of great importance in food and biofuel production, with high impact in global economy. Sugarcane plants harbor a huge diversity of microorganisms (DE SOUZA et al., 2016; KRUSASUWAN; THAMCHAIPENET, 2016; RODRIGUES et al., 2016; TAULÉ et al., 2011) which includes nitrogen-fixing bacteria such as *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae* and others that are able to colonize the sugarcane internal tissues and thought to play major role in the nitrogen nutrition of this plant (BALDANI et al., 2002; BODDEY et al., 2003; CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988; DOTY, 2017; JAMES et al., 1994). In fact, as an annual grass crop the sugarcane plants offer a multitude of different ecological niches for its associative microorganisms (MÜLLER et al., 2016), that may favor their long-term establishment, development and productivity once compatible

interactions with PGPB are accomplished. High populations of associative bacteria are found colonizing the sugarcane rhizosphere, roots, stem and leaves (MENDES et al. 2007; MAGNANI et al. 2010; BENEDUZI et al. 2013; ARMANHI et al. 2016; DOS-SANTOS et al. 2017), although the structure and composition of such populations are influenced by the plant genotype, plant age and geographical location, among other influences (BENEDUZI et al. 2013; DONG et al. 2018).

The potential of sugarcane be benefited from its own microbiome is well known, and up to 70% of its nitrogen demands can be supplied through biological nitrogen fixation (BNF) (URQUIAGA et al., 2011). Selected bacterial strains representative from the sugarcane microbiome have been also demonstrated to increase the plant growth and productivity, when used as inoculants (GONZÁLEZ; VICTORIA; MERINO, 2015; OLIVEIRA et al., 2006; SCHULTZ et al., 2016). As observed for the soybean crop and other grasses such as maize, the identification of elite bacterial strains to be used as commercial inoculants can increase the availability of nutrients and its efficiency of use in the sugarcane crop, as well as decrease the need for chemical inputs. Considering the outstanding diversity of the sugarcane microbiome, in addition to the high number of cane genotypes available, the identification and characterization of sugarcane-associated microorganisms is of great interest. Although the metagenomic approach is in the spotlight of studies related to the structure and diversity of microbial communities, including those associated with sugarcane (ARMANHI et al., 2016; DE SOUZA et al., 2016; DOS-SANTOS et al., 2017; PISA et al., 2011), cultivation-dependent studies are still indispensable to put available representative individuals for detailed biochemical, physiological and phylogenetic studies, and further development of biotechnological inputs.

The aim was to study the diversity of cultivable bacteria able to grow in N-free culture medium, obtaining the identity and phylogenetic positioning of 69 bacterial strains isolated from sugarcane plants grown in different localities at Paraná state, Brazil. The phylogeny of the isolates based on the 16S rRNA gene sequence is presented, and the influence of plant genotype, geographic location and bacterial habitat in relation to the composition of diazotrophic communities in sugarcane is discussed.

Material and Methods

Origin of bacterial strains

A collection of 69 bacterial strains used in this study was previously obtained by Milani et al. (2011), from sugarcane fields in Londrina (23° 21' 39.96" S, 51° 09' 4.96" W) and from five varieties from a sugarcane germplasm bank sited at Paranaíba (22°58'44" S, 52°27'51" W), both located in Paraná State (Brazil). This bacterial collection comprises representative isolates from different habitats (soil, washed roots, stems and leaves) with ability to succeeding growth in N-free semi-solid culture media (NFB, LGI-p or LGI) and hence considered as diazotrophs (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). This culture collection is cryopreserved at the Molecular Biochemistry Laboratory at the Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brazil (Table 1).

Table 1 Isolation source of bacterial isolates used in this study, using different semi-solid N-free culture medium.

Geographic Origin	N-free Medium	Soil	Washed roots	Stem	Leaves	Total
Paranaíba-PR	NFB	4	0	4	4	12 (17,4%)
	LGI-p	3	5	4	4	16 (23,2%)
	LGI	4	3	4	5	16 (23,2%)
Londrina-PR	NFb	1	7	2	4	14 (20,3%)
	LGI-p	1	7	2	1	11 (15,9%)
	LGI			0		
Total		13 (18,8%)	22 (31,9%)	16 (23,2%)	18 (26,1%)	69

N-free culture medium (DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

Growth conditions and DNA extraction

Bacterial isolates were cultured in DYGS liquid medium (RODRIGUES NETO et al. 1986) for 48h at 28 ± 2 °C in a rotary shaker at 150 rpm. Cells were collected by centrifugation at 9.500 g for 10 min at 4 °C and washed with 0.85% NaCl (w/v). Total genomic DNA was extracted according Hungria et al. (2008). DNA integrity was checked by electrophoresis on agarose gel 0,8% (w/v), and visualization under UV light. The quantification of DNA extracts was obtained using the NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific) spectrophotometer.

16S rRNA gene sequencing

Genomic DNA from each bacterial isolate was subjected to amplification of the 16S rRNA gene using the primers Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3') and Y3 (5'-TACCTTGTTACTTCACCCCAGTC-3') described by Young et al. (1991) and Cruz et al. (2001) respectively. After confirmation of obtained amplicons at the expected length, PCR products were purified using the enzyme ExoSAP-IT (USB® Corporation, Cleveland, Ohio, USA) according to the manufacturer's instructions. Purified PCR products were subjected to sequencing reactions using the primer 362f (5' CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG 3') (SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014) and the BigDye® Terminator v3.1 commercial kit. PCR products were sequenced on an ABI 3500xL (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) capillary sequencer analyzer.

Phylogenetic positioning of isolates

Sequences from the 16S rRNA gene were checked with the BioNumerics software and submitted to the Classifier tool (WANG et al., 2007) at the Ribosomal Database Project – RDP (<https://rdp.cme.msu.edu/>) to determine the phylogenetic positioning of each isolate at genus level. Further phylogenetic analysis was conducted by sequence alignment of isolates with the type strain sequences from their respective genus using Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) and construction of phylogenetic trees using the MEGA software version 6.0 (TAMURA et al., 2013). Phylogenetic tree were generated using the neighbor-joining (NJ) method (SAITOU; NEI, 1987) with the Kimura two-Parameter (KIMURA, 1980) and 1000 bootstrap replicates. Nucleotide sequence identity between isolates was calculated using the Bioedit v. 7.2.5 (HALL, 1999). The 16S rRNA gene sequences obtained in this study are deposited in the GenBank database and assigned to accession numbers MF326436 to MF326504 (Table S1).

Diversity, richness and abundance

The structural diversity of the bacterial communities studied was investigated by the Shannon diversity index (H'), richness (J_{1a}), and Berger-Parker dominance (d). These indices were estimated based on the genus level using the software DivEs v3.0 (Rodrigues, 2017) and values from Shannon index were subjected to Student's t test. Principal component analysis (PCA) was performed using the R software version 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Genotyping of bacterial isolates - BOX-PCR

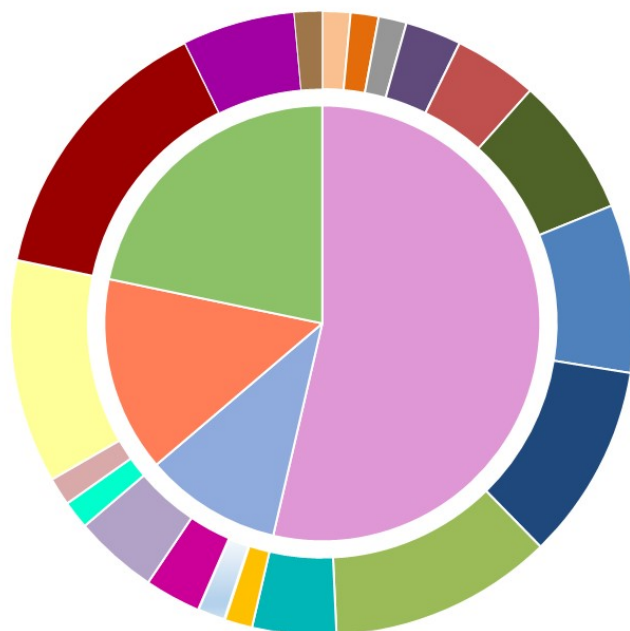
The BOX-A1R primer (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC et al., 1994) was used to determine the genotypic diversity of bacterial isolates, according to Rademaker and De Bruijn (1996). The amplified products were evaluated by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gel, at 60 volts for 10,5 h in 0,5x TBE buffer. The gel was stained and visualized under UV, and the resulting fingerprints were analyzed using the software BioNumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, v. 7.0) and used to calculate the Jaccard coefficient with 2% of tolerance and construct dendrograms based on the unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) analysis.

Results

Distribution of cultivable bacterial phylogenetic groups in sugarcane

Partial sequencing of the 16s rRNA gene resulted in fragments of 500 to 965 bp length, which were used for a preliminary taxonomic positioning of isolates by using the RDP Classifier at 90% confidence limit. Most of the isolates were classified as belonging to the Proteobacteria phylum (85.5%), encompassing the classes Gammaproteobacteria (53.6%) with the highest phylotype diversity, Betaproteobacteria (21.7%) represented by a single genus and Alphaproteobacteria (10.1%), while representatives of Firmicutes (14.5%) completed the isolates collection (Figure 1). At genus level, *Burkholderia* (n = 10; 14.5%) was the most abundant among the isolates, followed by *Pseudomonas* and *Bacillus* (n=8; 11.6% each), *Enterobacter* (n=7; 10.1%), *Klebsiella* (n=6; 8.7%), *Pantoea* (n=5; 7.2%), *Paraburkholderia* (n=4; 5.8%), *Acinetobacter* and *Rhizobium* (n=3; 4.3% each), *Stenotrophomonas* and *Sphingomonas* (n=2; 2.9% each) (Figure 1). In contrast, the genus *Paenibacillus*, *Dyella*, *Pseudoxantomonas*, *Neosaia*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Caballeronia* and *Gluconacetobacter* were represented by a single isolate each (n = 1; 1.4%). Three isolates (4.3%) belonging to Enterobacteriaceae could not be positioned at the genus level (strains 127, 158 and 175), due to the low similarity (< 90%) observed with the type strains of this family.

Figure 1 Distribution of bacterial isolates used in this study at class (inner circle) and genus (outer circle) level, according to the RDP-Classifer at 90% confidence.



Class	Genus	Genus	Genus
Gammaproteobacteria (53.62%)	<i>Dyella</i> (1.45%)	<i>Enterobacter</i> (10.14%)	<i>Caballeronia</i> (1.45%)
Betaproteobacteria (21.74%)	<i>Pseudoxanthomonas</i> (1.45%)	<i>Pseudomonas</i> (11.59%)	<i>Rhizobium</i> (4.35%)
Alphaproteobacteria (10.14%)	<i>Serratia</i> (1.45%)	<i>Unclassified</i> (4.35%)	<i>Paenibacillus</i> (1.45%)
Bacilli (14.5%)	<i>Stenotrophomonas</i> (2.90%)	<i>Gluconacetobacter</i> (1.45%)	<i>Staphylococcus</i> (1.45%)
	<i>Acinetobacter</i> (4.35%)	<i>Neosaira</i> (1.45%)	<i>Bacillus</i> (11.59%)
	<i>Pantoea</i> (7.24%)	<i>Spingomonas</i> (2.90%)	<i>Burkholderia</i> (14.5%)

The identified bacterial phylotypes were found unevenly distributed in relation to the habitat, geographic origin, culture medium and sugarcane varieties (Figure 2). Distribution of phylogenetic groups on aerial tissues was far different from those related to belowground tissues and suggests a different structure for the associated bacterial communities. *Burkholderia* along with *Enterobacter* predominated in soil (23.1% of total isolates each) and washed roots (23.8% and 19.1%, respectively), but these phylotypes were not represented (*Enterobacter*) or were found less prevalent (*Burkholderia*, 6.25% of total) among the isolates from aerial tissues. On the other hand, *Pseudomonas* and *Pantoea*, which were less representative among isolates

from belowground tissues, prevailed among isolates from leaves (25.0% and 18.8%, respectively). The sugarcane stem showed the higher phylogenetic diversity among isolates, without predominance of a given genus as observed for the roots. *Klebsiella*, *Bacillus* and *Burkholderia* were present at each environment studied in contrast to phylogenetic groups that were exclusively isolated from a given habitat, as observed for *Staphylococcus* and *Serratia* (soil), *Rhizobium* plus *Dyella* (washed roots), *Caballeronia*, *Gluconacetobacter*, *Pseudoxanthomonas* and *Neosasaia* (sugarcane stem), and *Paenibacillus* (leaf).

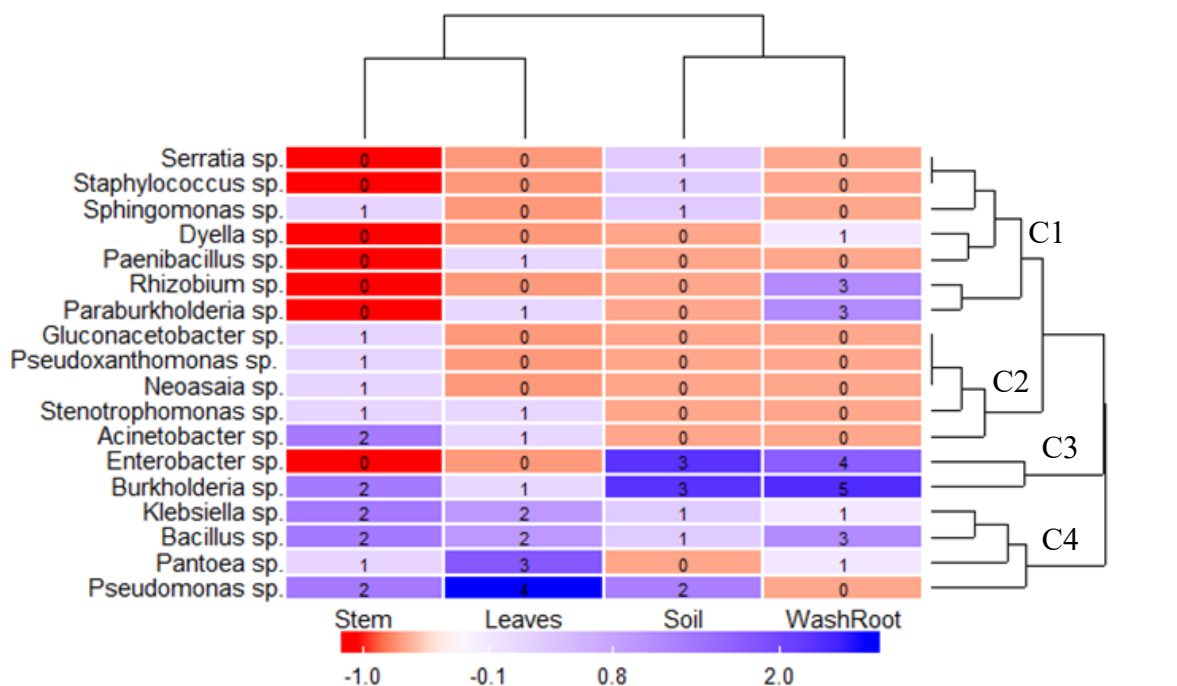
The influence of edaphoclimatic conditions over the composition of sugarcane associative diazotrophic community was also evident in respect to the geographic site of sampling. Phylotypes identified among isolates from both sites (*Enterobacter*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Paraburkholderia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Klebsiella*) differed in respect to its relative distribution, while other phylotypes were identified only in samples collected in Londrina (*Dyella*, *Gluconacetobacter*, *Paenibacillus* and *Acinetobacter*) or Paranaíba (*Caballeronia*, *Pseudoxanthomonas*, *Neosasaia*, *Staphylococcus*, *Pantoea*, *Serratia* and *Sphingomonas*). As expected, different semi-selective N-free culture media led to access different bacterial phylogenetic groups (BALDANI; REIS, 2014; DOBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995); however, this study reports that some phylotypes could be isolated irrespective the culture medium used (*Enterobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia* and *Pseudomonas*). It was also clear that N-free semi-solid NFB favored the isolation of *Enterobacter* and *Pseudomonas*, while LGI favored the growth of *Pantoea* and LGI-p resulted in high frequency of *Burkholderia* isolation.

The relative abundance of phylogenetic groups from different sugarcane varieties could be defined only for samples collected in Paranaíba, because the samples from Londrina were obtained from rural areas where the unequivocal identification of cropped varieties was not possible. Samples collected in Paranaíba came from plants subjected to the same seasonal management and edaphoclimatic conditions, allowing to attribute the differences found on the relative frequency of phylotypes isolation among samples to the influence of sugarcane genotypes over its associative microbial communities. As example, *Burkholderia* was isolated from four sugarcane varieties and its representativeness differed from 9.09% of total isolates from RB845210 variety to 37.5% in the RB855546 variety. *Pseudomonas* was also found in most of varieties sampled, except for RB855156, whereas encompasses up

to 27.3% of isolates obtained from RB845210. In addition, except for the sugarcane variety RB855446 that presented the lowest phylotypes diversity among the studied varieties, the accessed phylotypes from the other varieties included since a single (RB72454) to multiple exclusive phylogenetic groups (RB845210, RB855156 and RB867515). The phylotypes belonging to *Dyella*, *Gluconacetobacter*, *Paenibacillus* and *Acinetobacter* were only isolated from samples collected in Londrina (data not shown in table 2).

A heat map produced from the quantitative analysis of phylotypes presents the relative abundance at genus level is presented at Figure 3 and highlight the influence of habitats and the putative relationships among bacterial diversity in structuring the diazotrophic community associated to sugarcane. The clustering between phylotypes abundance in leaves and stems indicates the relatedness between these diazotrophic communities, as observed for phylotypes from soil and washed roots samples that also grouped together. In addition to this, the clustering of phylotypes at genus level suggests the inter-relationships or interdependencies across genera predominantly found in soil and washed roots (clusters C1 and C3) and those predominating in aerial tissues (clusters C2 and C4).

Figure 3 Heat map representing the relative abundance of the given 66 bacterial phylotypes isolated in association with sugarcane. The numbers inside boxes represents the respective absolute abundance within the isolates collection. Dendrograms represent the phylotypes clustering in relation to the isolation habitat (upper dendrogram) or to the relationships across genera (right dendrogram), based upon Euclidean distance method.



higher than 97% similarity to a given type specie (VANDAMME et al. 1996). Sequence similarity values ranged from 92.8% to 100% (Table 2), suggesting the presence of new species among the isolates. Nonetheless, some strains could not be identified at species level because of identical similarity values with more than one

type species. In both cases, further studies are needed to complement the results presented here. Gammaproteobacteria was the most diverse phylogenetic class and was represented by nine genera and 22 different species, while Betaproteobacteria was represented by a single genus and 11 different species, in addition to Alphaproteobacteria with four genera and six species; Firmicutes was represented by three genera and 5 different species.

The phylotypes belonging to Gammaproteobacteria were positioned into the orders Enterobacterales, with four Enterobacteriaceae genera (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* and *Serratia*); Pseudomonadales with a genus each from Moraxellaceae and Pseudomonadaceae (*Acinetobacter* and *Pseudomonas*, respectively); and three genera from Xanthomonadaceae, Xanthomonadales (*Dyella*, *Pseudoxanthomonas* and *Stenotrophomonas*). Betaproteobacteria was represented by Burkholderiales, with three genera from Burkholderiaceae (*Burkholderia*, *Caballeronia* and *Paraburkholderia*). Isolates positioned at Alphaproteobacteria comprised the orders Rhizobiales with a single Rhizobiaceae genus (*Rhizobium*); Sphingomonadales whose isolates were all positioned at Sphingomonadaceae (*Sphingomonas*); and Rhodospirillales represented by two genera from Acetobacteraceae (*Gluconacetobacter* and *Neoasaia*). Isolates positioned at Firmicutes belonged all to the class Bacilli, Bacillales order within three families (genera): Bacillaceae (*Bacillus*), Paenibacillaceae (*Paenibacillus*) and Staphylococcaceae (*Staphylococcus*).

The reconstruction of phylogenetic relationships (presented in the supplementary materials) indicates that the diazotrophic community accessed comprise 44 different bacterial species, which few were concomitantly found in samples from different habitats or edaphoclimatic conditions. *Bacillus aryabhatai* was isolated from soil and stems of plants grown in Paranaíba (strains 145 and 147), as well as from the washed roots of plants grown in Londrina (strain 112). *Stenotrophomonas maltophilia* was isolated from the stems of plants collected in Paranaíba (strain 131) and from the leaves of plants grown in Londrina (strain 118). *Bacillus flexus*/*B. megaterium* were identified in soil (strain 150) and stem (strain 166) samples collected in Paranaíba in addition to samples of washed roots from plants collected in Londrina (strains 64 and 114). *Burkholderia gladioli* was isolated from washed roots of plants collected in Londrina (strains 62, 63 and 110) as well as from the stems of plants grown in Paranaíba (strain 130). *Enterobacter tabaci* was

identified among isolates from soil (strains 21 and 61) and washed roots (strains 22, 23 and 25) collected in Londrina and from soil collected in Paranavaí (strain 124). Representative strains of *Klebsiella varriicola* were isolated from leaf samples of plants collected in Londrina (strain 119) and from stem samples of plants grown in Paranavaí (strain 132). *Pseudomonas fulva*/*P. parafulva* was found in leaf samples of plants grown in Londrina (strain 117) or Paranavaí (strain 128), in addition to soil samples from Londrina (strains 120 and 121).

Table 2 Phylogenetic affiliation of diazotrophic bacteria isolated from different localities and habitats associated to sugarcane, according to the sequence identity matrix constructed using Bioedit v. 7.2.5 with the respective 16S rRNA gene sequences (partial) and type strains gene sequences.

Class	Order	Family	Genus	Specie	Code	Similarity with type strain (%)	Habitat				Culture medium			Site		
							Soil	Washed roots	Stem	Leaves	NFB	LGI-P	LGI	Londrina	Paranavai	
Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	<i>hormaechei</i>	174	99.5	-	1	-	-	-	-	1	-	1	
			<i>Enterobacter</i>	<i>tabaci</i>	21, 22, 23, 25, 61, 124	99 - 100	3	3	-	-	5	1	-	5	1	
			<i>Klebsiella</i>	<i>michiganensis</i>	129	98.8	-	-	-	1	1	-	-	-	-	1
			<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i>	123	99.5	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1
			<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae/ quasipneumoniae</i>	167	100	-	-	1	-	-	-	-	1	-	1
			<i>Klebsiella</i>	<i>varicola</i>	119, 132, 173	99.2 - 100	-	1	1	1	2	1	-	1	2	
			<i>Pantoea</i>	<i>ananatis</i>	156	99.5	-	-	-	1	-	-	1	-	-	1
			<i>Pantoea</i>	<i>conspicua</i>	171	99.8	-	1	-	-	-	-	1	-	-	1
			<i>Pantoea</i>	<i>eucalypti</i>	165	99.8	-	-	1	-	-	-	-	1	-	1
			<i>Pantoea</i>	<i>vagans</i>	155	99.1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1
				<i>Pantoea</i>	<i>Pantoea dispersa</i>	157	99.6	-	-	-	1	-	-	1	-	1
				<i>Serratia</i>	<i>Serratia nematodiphila</i>	161	100	1	-	-	-	-	1	-	1	
		Pseudomonadales	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>	<i>solii</i>	113	100	-	-	1	-	1	-	-	1	
				<i>Acinetobacter</i>	<i>sp.^a</i>	115, 116	100	-	-	1	1	2	-	-	2	
			Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>austerensis</i>	126	98.5	-	-	-	1	1	-	-	-	1
				<i>Pseudomonas</i>	<i>chichorii</i>	138	99.5	-	-	1	-	-	1	-	-	1
				<i>Pseudomonas</i>	<i>chlororaphis</i>	136	100	-	-	1	-	-	1	-	-	1
				<i>Pseudomonas</i>	<i>congelans</i>	159	100	-	-	-	1	-	-	1	-	1
				<i>Pseudomonas</i>	<i>fulva/ P. parafulva</i>	117, 120, 121, 128	100	2	-	-	2	4	-	-	1	3
		Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Dyella</i>	<i>marensis</i>	71	99.5	-	1	-	-	-	1	-	1	
	<i>Pseudoxanthomonas</i>			<i>spadix</i>	134	99.5	-	-	1	-	1	-	-	-	1	
	<i>Stenotrophomonas</i>			<i>maltophilia</i>	118, 131	99.7	-	-	1	1	2	-	-	-	1	
Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	<i>anthina/ seminalis</i>	160	99.7	1	-	-	-	-	-	1	-	1	
			<i>Caballeronia</i>	<i>catudaia</i>	137	99.4	-	-	1	-	-	1	-	-	1	
			<i>Burkholderia</i>	<i>contaminans</i>	146	100	-	-	-	1	-	1	-	-	1	
			<i>Burkholderia</i>	<i>gladioli</i>	62, 63, 110, 130	99.1 - 100	-	3	1	-	1	3	-	3	1	
			<i>Burkholderia</i>	<i>sp.^b</i>	140	99.7 - 100	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1
			<i>Burkholderia</i>	<i>kururiensis</i>	153	96.8	1	-	-	-	-	1	-	-	-	1
			<i>Burkholderia</i>	<i>metallica</i>	143	99.7	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1
			<i>Burkholderia</i>	<i>seminalis/ territorii</i>	162	99.7	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1
			<i>Paraburkholderia</i>	<i>caribensis</i>	72,141	100	-	2	-	-	-	2	-	-	1	1
			<i>Paraburkholderia</i>	<i>phenoliruptrix</i>	149	98.5	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1
			<i>Paraburkholderia</i>	<i>silvatlantica</i>	144	100	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1
			Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	<i>sp.^c</i>	70	99.8	-	1	-	-	1	-	1
		<i>Rhizobium</i>		<i>pusense</i>	27, 142	99.2 - 100	-	2	-	-	1	1	-	1		
Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>		<i>ginsenosidimitans</i>	163	98.6	1	-	-	-	-	1	-	1		
		<i>Sphingomonas</i>		<i>yunnanensis</i>	168	99.7	-	-	1	-	-	-	1	-	1	
Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Gluconacetobacter</i>		<i>diazotrophicus</i>	109	99.5	-	-	1	-	-	1	-	1		
		<i>Neosassa</i>	<i>chiangmaiensis</i>	139	92.8	-	-	1	-	-	1	-	-	1		
Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>aryabhatai</i>	112, 145, 147	100	-	-	1	2	-	3	-	1	2	
			<i>Bacillus</i>	<i>flexus/megaterium</i>	64, 114, 150, 166	99.7 - 100	1	2	1	-	1	2	1	2	2	
			<i>Bacillus</i>	<i>invictae/ safensis</i>	28	99.8	-	1	-	-	1	-	-	1	-	
		Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	<i>pabuli/taichungensis</i>	111	99.8	-	-	-	1	-	1	-	1	-	
	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	<i>saprophyticus subsp. Bovis</i>	151	100	1	-	-	-	-	1	-	-	1		
TOTAL							13	21	16	16	24	28	14	24	42	

^a*A. calcoacticus*, *A. seifertii*, *A. pittii*, *A. oleivorans*. ^b*B. gladioli*, *B. vandii*, *B. plantarii*, *B. caribensis*. ^c*R. lusitanum*, *R. miluonense*, *R. mayense*.

Diversity, richness and abundance of cultivable diazotrophs in sugarcane

Differences between the diazotroph communities associated to sugarcane were measured by the indices of Shannon (H'), richness (J_{1a}) and Berger-Parker dominance (d), estimated according to the number of different phylotypes as defined by 16S rRNA gene sequence analysis (Table 3). Even though the cultivation methods could bias the description of structure and composition of the diazotrophs communities, it is assumed that the introduced bias was horizontal allowing comparisons between samples. The comparisons for a given variable were based on the ratio between the number of different phylotypes and total number of isolates (H'), the number of different phylotypes (J_{1a}) and the dominance of species (d). Species diversity (H') were similar between soil, washed roots and leaves and these all differed from the sugarcane stem which present the higher diversity and species richness (J_{1a}). Different sugarcane varieties also differed in relation to the diversity of diazotrophs communities, with the RB845210, RB867515 and RB855156 presenting the higher values for H' and J_{1a} . No difference for H' was observed between the geographic origin of samples or to the semi-solid N-free culture media. H' indicates that plant physiology is the main factor in shaping the composition of associative diazotroph community in sugarcane.

Table 3 Diversity indexes based on the number of phylotypes determined by the analysis of partial 16S rRNA gene sequences from putative diazotrophs associated with sugarcane.

Variables		Diversity Indexes		
		H'	J _{1a}	d
1. Habitat	Soil	2.81 bc	8	0.23
	Washed roots	2.42 c	7	0.38
	Stem	3.38 a	11	0.13
	Leaves	2.83 b	8	0.25
2. Varieties	RB72454	2.00 c	4	0.25
	RB845210	2.66 a	7	0.27
	RB855156	2.24 ab	5	0.29
	RB855546	1.91 c	4	0.38
	RB867515	2.5 ab	6	0.25
3. Geographic Origin	Londrina-PR	3.15 a	11	0.20
	Paranavaí-PR	3.18 a	13	0.26
4. N-free Medium	NFB	2.92 a	9	0.21
	LGI	2.73 a	8	0.33
	LGI-p	2.58 a	10	0.44

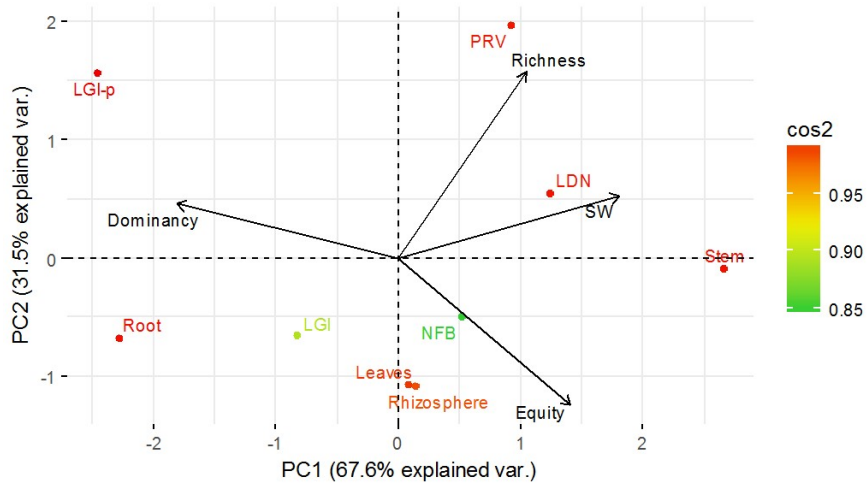
Significant difference according to Student t-test (5% level of significance). H', Shannon diversity index; J_{1a}, richness; d, Berger-Parker dominance.

The Principal component analysis (PCA) was performed to determine the correspondence between variations on the diazotroph communities and the variables habitat, geographic origin and semi-solid N-free culture medium (Figure 4). PCA analysis for sugarcane varieties was made in separate from the other variables because only varieties collected in Paranavaí could be identified. Both PCA showed high proportion of total variance explained by the first two PCs. Dissimilarities between the diazotrophic communities were evident in relation to the habitat and sugarcane varieties, while semi-solid N-free culture media contributed less to the total variance observed except for LGI-p medium and the geographic origin of samples was shown to not differ in great extent. In relation to the diversity indexes, the geographic origin of samples had greater influence on H' and J_{1a} values, whilst Eq_J was promoted by the use of semi-solid NFB medium and decreased by the use of LGI-p. The influence of sugarcane genotype on the associate diazotrophic community was evidenced, with the variety RB72454 inducing high Eq_J values, the

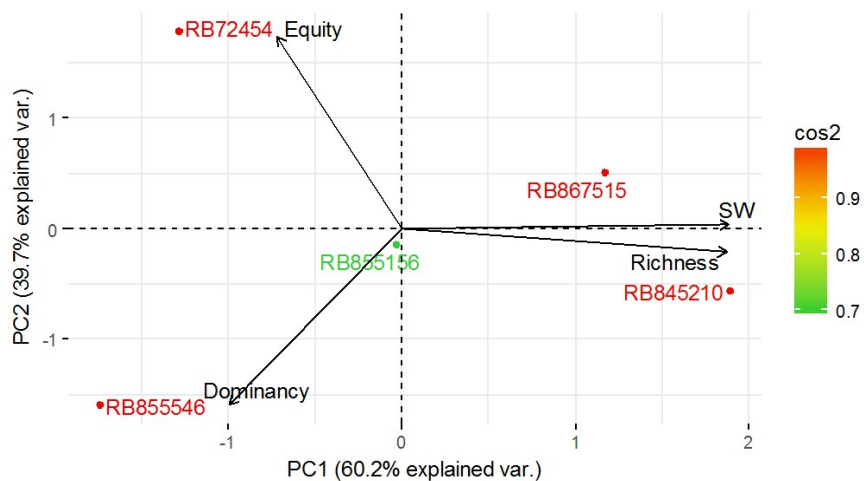
variety RB855546 associated with dominance and the varieties RB845210 and RB867515 presenting the higher diversity and species richness.

Figure 4 Principal Component Analysis (PCA) of diversity indices as influenced by the habitat, geographic origin of samples and semi-solid N-free culture media **(A)**. PCA analysis of diversity indices as affected by the sugarcane genotype **(B)**. The data were normalized by the square root and the equity data were multiplied by -1 to result in positive values.

A)



B)



Genotyping of representative diazotrophic bacteria associated with sugarcane

The genetic diversity of diazotrophic strains isolated from sugarcane was determined by BOX-PCR fingerprinting, except for the isolates *B. flexus*/*B. megaterium* strain 114 and *Acinetobacter* sp. strain 116, which fingerprinting were represented by only few polymorphic bands. The genotyping was carried out at class

level, resulting in 4 dendrograms that evidenced the high genetic diversity of diazotrophs isolated (Figures S17 to S20), with no clonal fingerprinting profiles produced. Genotypic profiles from Gammaproteobacteria (Figure 4) reinforced that similar bacterial genotypes were identified colonizing different habitats (*Enterobacter* sp. strains 21 and 61, respectively isolated from washed roots and soil samples from Londrina) or isolated from samples of different geographic origin (*Pseudomonas* sp. strains 117 and 121, isolated from sugarcane leaves collected in Londrina and soil collected in Paranavaí, respectively). Betaproteobacteria representatives with similar genotypes were represented by *Burkholderia* sp. strains 130 and 162, respectively isolated from soil and stem samples from different sugarcane varieties grown in Paranavaí.

Discussion

Microbial diversity associated with sugarcane have been demonstrated to be interestingly wide, regardless the application of isolation techniques target for specific groups or application of culture-independent methods (ANTONIO et al., 2016; ANTUNES et al., 2017; ARMANHI et al., 2016; BENEDUZI et al., 2013a; DE SOUZA et al., 2016; DONG et al., 2018; KRUSUWAN; THAMCHAIPENET, 2016; MAGNANI et al., 2010, 2013; PISA et al., 2011; TAULÉ et al., 2011; YEOH et al., 2016). Here we report the phylogenetic diversity of diazotrophs in association with different habitats provided by the sugarcane plants, based on samples collected in two geographic sites from different plant genotypes. Most of the isolates obtained in the present study were identified as belonging to the phylum Proteobacteria, comprising the classes Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria and Alphaproteobacteria, in addition to the less abundant (about 15% of total isolates) representatives of Firmicutes from the Bacilli class, in agreement with other previous studies based on culturing techniques (TAULÉ et al., 2011; PISA et al., 2011; BENEDUZI et al., 2013; KRUSUWAN and THAMCHAIPENET 2016). None of the strains showed identical profiles in the Box-PCR analysis, indicating high genetic diversity within the isolates. The diazotrophs isolated in the present work encompasses 44 species from 17 different genera, with a high representativeness of *Burkholderia* (14.5% of total isolates) as previously noted in other isolation studies in sugarcane (MENDES et al., 2007; BENEDUZI et al., 2013; DE SOUZA et al., 2016).

Literature data reporting bacterial phylotypes found in association with sugarcane was tracked to identify the representativeness of the diazotrophic phylotypes isolated and described in this study, in relation to the microbiome of this plant. The information already published about the bacterial phylotypes (at genus level) constituting the sugarcane microbiome, accessed through both culture dependent and metagenomic approaches, is presented in the supplementary material Table S2. To date, 262 different bacterial genera were described in association to the rhizosphere, roots, stems and leaves of sugarcane, from which 35 genera (13.4% of total) could be identified by culture-dependent as well as culture-independent methods (Figure 5). In respect to the phylotypes described in the present work, all the identified genera, except for *Neoasaia* that is reported for the first time in association with sugarcane, are already known as part of the sugarcane microbiome (Figure 6). In addition, the genera *Dyella*, *Pseudoxanthomonas* and *Serratia* were previously reported as part of sugarcane microbiome only through culture-independent studies, and interestingly, *Gluconacetobacter* had been described exclusively by culture-dependent studies (BENEDUZI et al., 2013; DE SOUZA ANTONIO et al., 2016). The need to apply culture-based approaches to isolate *Gluconacetobacter* strains, which has been routinely accessed from sugarcane samples by the use of semi-solid N-free culture medium LGI-p, indicates that culture-dependent studies may not be disregarded in microbial ecology studies (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1999; MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2003; MUTHUKUMARASAMY; REVATHI; LAKSHMINARASIMHAN, 1999; OLIVEIRA et al., 2008; REIS JUNIOR et al., 2000a, 2000b). Although the phylotypes coverage are characteristically lower when using culture media to access representatives of microbiomes as compared to culture-independent methods, the first allows to physically obtain bacterial isolates to explore its genomic potentials, phylogenetic relationships and industrial applications.

Figure 5 Veen diagram illustrating the overlaps of bacterial genera identified in association with sugarcane based on literature data (culture-dependent and independent approaches) and the present study. (a) Number of bacterial genera identified using metagenomics approaches. (b) Number of bacterial genera identified using culture-dependent approaches. (c) Number of bacterial genera identified in the present study. Details can be found in the supplementary Table S2.

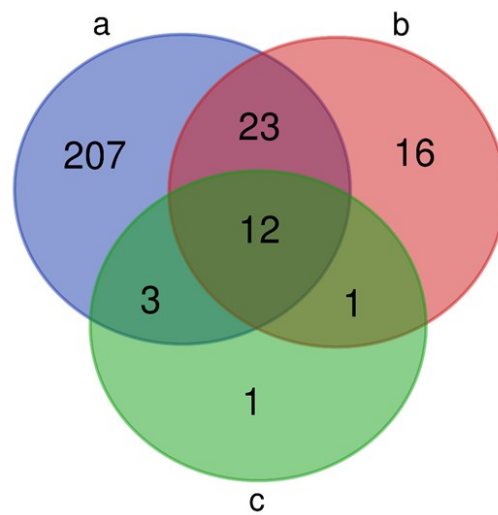


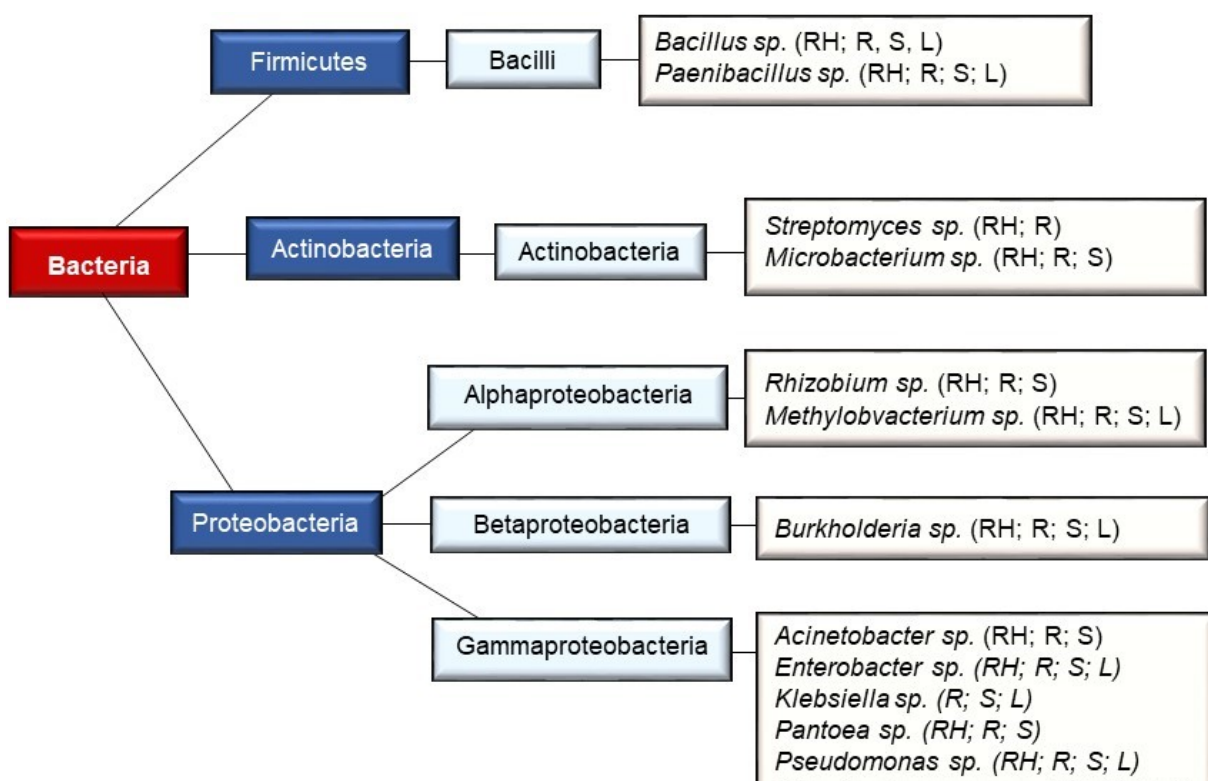
Figure 6 Overlapping of bacterial genera described in association with sugarcane according to the method used to diversity access. Red-dotted square indicates bacterial genera identified by culture-independent methods and found in more than one study. Blue-dotted square presents the bacterial genera identified by culture-dependent approaches. Middle square presents the bacterial genera found in the present study that were previously reported by culture-independent (shown in red), culture-independent (shown in blue) or both methods (shown in purple). Details can be found in the supplementary Table S2.



According to the literature data, we suggest that the microbiome core of sugarcane mostly comprises the following genera, which were identified in six or more studies: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Methylobacterium* and *Microbacterium* (Figure 7). The class Gammaproteobacteria is more represented with six genera which were all identified among the isolates described in the present study. In addition, the phylotypes identified in higher frequency in this study (three or more isolates) are all components of the suggested sugarcane core microbiome, even considering that the isolation of sugarcane-associative bacteria is thought to depend on the crop supply with N-fertilizers, plant genotype, crop cycle and habitat (rhizosphere, roots, stem or leaves) (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1999; MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2003; MUTHUKUMARASAMY; REVATHI; LAKSHMINARASIMHAN, 1999; REIS JUNIOR et al., 2000a, 2000b). Representative phylotypes of bacterial genera suggested as

the core of sugarcane microbiome have been also reported in association with other grasses such as maize, wheat, rice and sorghum, with several strains presenting important plant growth-promoting properties (ARRUDA et al., 2013; BERTANI et al., 2016; MONTAÑEZ et al., 2012; MOREIRA et al., 2016; PEREIRA et al., 2011; RODRÍGUEZ-BLANCO; SICARDI; FRIONI, 2015). Nonetheless, is worth to note that the sugarcane-associated diazotrophs identified in the present study includes species with potential pathogenicity to humans and plants, highlighting the need for a better comprehension of functioning and structuring of microbiomes in nutrient-rich environments, such as those provided by sugarcane plants (BERG et al., 2005).

Figure 7 Suggested core sugarcane microbiome based on the most frequent genera identified by bacterial diversity studies published in the literature. Details can be found in the supplementary Table S2. Letters in parentheses denote the isolation sites: RH (rhizosphere); R (root); S (stem); L (leaves).



The plant-associated habitats are known as dynamic environments in which microbial communities structure, composition and functioning are shaped in response to availability of nutrients made available by the plant, especially those carbon-rich (HAICHR et al., 2008). The diazotrophic community in association with sugarcane described in this study was found heterogeneous in relation to the habitat, the geographic origin, the culture medium and the sugarcane varieties. A higher number of bacterial isolates were retrieved from washed roots, reflecting phylotypes able to colonize the rhizosphere, rhizoplane and the internal root tissues of sugarcane and suggesting that bacterial populations were higher in these samples as compared to other habitats (soil, stems and leaves). Nevertheless, the greatest diversity (H' index) and species richness (J_{1a} index) were related to stem samples, which reflected the endophytic bacterial community of this tissue since isolation was performed from the cortex and vascular bundles (MILANI et al., 2011). This suggests that belowground diazotrophic communities associated with sugarcane may be differently structured as compared to its counterparts from aboveground tissues, that is indeed reinforced by the heat map of distribution of identified genera between different habitats. The lower bacterial diversity in the washed roots can be related to the selection of bacterial populations ruled by the rhizosphere effect (HILTNER et al., 1904; BAIS et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2014), while increased diversity of diazotrophs in the stem tissues can be a consequence of vertical transmission of bacterial communities throughout vegetative propagation of sugarcane.

Similar results were found by Beneduzi et al. (2013) that isolated bacteria in selective medium and also found greater numbers of isolates in roots and rhizosphere of sugarcane as compared to the stem. However, Rodrigues et al. (2016) observed a different trend, reporting higher number of isolates retrieved from sugarcane leaves, followed by the roots, rhizosphere and stem. Lopes et al. (2016) found quantitative and qualitative differences between bacterial communities associated to the soil and rhizosphere of sugarcane and suggested that D-galacturonic acid released from the roots plays major role in bacterial selection, demonstrating that the microbial communities from different rhizosphere samples were more similar in function as compared to the different soil samples. In the present work, diazotrophic communities from soil and washed root samples showed dominance of *Burkholderia* and *Enterobacter* phylotypes, although such genera were far less abundant among isolates from stem and leaf samples. There is a common

belief that endophytic microbial communities originate from soil and rhizosphere (BAIS et al., 2006; DE SOUZA et al., 2016; MENDES et al., 2007), but the results presented in this work evidenced the prevalence of different bacterial phylotypes in samples from belowground in comparison to aboveground samples. Comparative sequence analysis of 16S rRNA gene from four sugarcane varieties cropped in Australia have shown that 50% of OTUs are shared between aerial tissues and rhizosphere soil, in addition to 16% of OTUs only detected in leaves and stems (HAMONTS et al., 2018). In parallel to the results presented in this study, such findings allow to hypothesize that sugarcane actively recruit representative phylotypes from the bulk soil community to compose its rhizosphere bacterial community, but only part of recruited phylotypes would have competence to reach the endophytic habitat, and even less phylotypes could disperse and colonize the aerial tissues. Vertical transference of microbial communities would hence be an important source of phylotypes diversity in composing the diazotrophic community of plant stems.

Phylotypes described in the present study were isolated by using different semi-solid N-free culture media, representing a fraction of the actual diazotrophic bacterial diversity found in association with sugarcane. Although different culture media had enlarged the spectrum of putative target isolates, no significant difference related to the biodiversity indexes was observed. Nevertheless, the use of LGI-p and LGI medium favored the isolation of *Burkholderia* and *Pantoea* representative phylotypes, respectively. The high frequency of *Burkholderia* isolation using LGI-p medium, as well as the exclusive isolation of *Pantoea* using LGI medium was not expected, since LGI-P was designed to isolation of *Gluconacetobacter* species and LGI was designed to the isolation of *Nitrospirillum amazonense* (former *Azospirillum amazonense*) (BALDANI et al. 2014). In fact, representative phylotypes from *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Bacillus* and *Pseudomonas* could be isolated irrespective the culture media used, emphasizing the metabolic versatility of such microbial groups. Regardless the diversity accessed by different culture media have shown to be similar, the phylotypes retrieved differed in great extent reflecting the differences in the carbon source, osmolarity and pH and indicating the representativeness of the isolates collection obtained, in accordance with other isolation studies performed with sugarcane (TAULÉ et al., 2011; BENEDUZI et al., 2013; DE SOUZA ANTONIO et al., 2016).

The genera *Burkholderia*, *Klebsiella* and *Bacillus* were isolated from samples of all evaluated habitats, indicating the ubiquity of this bacterial groups in agricultural environments, as demonstrated previously (ANTUNES et al., 2017; ARMANHI et al., 2016; BENEDUZI et al., 2013a; DE SOUZA et al., 2016; DE SOUZA ANTONIO et al., 2016; DONG et al., 2018; DOS-SANTOS et al., 2017; KRUSUWAN; THAMCHAIPENET, 2016; MAGNANI et al., 2010, 2013; MENDES et al., 2007; PISA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2016; YEOH et al., 2016). *Pseudomonas* and *Pantoea* were also isolated in higher frequency than other genera, mainly from the leaves. *Pseudomonas* encompasses phylotypes of great metabolic versatility, and such trait may be related to its ability to metabolize the complex plant compounds released by leaf tissues (MÜLLER et al., 2016), resulting in increased isolation frequency. Magnani et al. (2010) also found high abundance of *Pseudomonas* in sugarcane leaves, and differently from the present study they reported a predominance of *Enterobacter* in the stem samples.

The comparative microbiome study of sugarcane and *Arabidopsis thaliana* carried out by Yeoh et al. (2016) described a common group of 18 bacterial families colonizing the roots of both plant species, and proposes that some bacterial families have developed evolutionary relationships with plants. In addition, Dong et al. (2018) propose a core microbiome for sugarcane based on the composition of the bacterial community found in the roots of different sugarcane genotypes. The bacterial phylotypes isolated from samples of washed roots described in our study overlaps the phylogenetic groups identified in the studies cited above, regardless the application of a different approach based on bacterial culturing. In addition, there is strong evidence that plant genotype, among other factors, influences the composition of its associated microbial communities as previously reported for sugarcane cropped in Brazil (DE SOUZA ANTONIO et al., 2016) and China (DONG et al., 2018). Such finding was also observed in the present study, where sugarcane varieties RB845210 and RB867515 showed increased diversity than varieties RB72454, RB855156 and RB855546, in addition to a higher isolation frequency of *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Enterobacter*.

The results presented here describe the diversity of diazotrophs colonizing sugarcane plants cropped in the south of Brazil, suggesting that the composition and source of these phylotypes differ in relation to plant tissues, where belowground phylotypes are recruited from the soil microbial community and aboveground

phylotypes are vertically transferred by vegetative propagation. Several factors that are involved in shaping microbial communities associated to plants, such as the genotype, geographic site of cropping and habitat were verified in this work. Most of the bacterial phylotypes identified in the present study are reported as plant growth-promoters, but further studies are needed to confirm the potential use of such strains as agricultural inputs for sugarcane. The application of culture-based studies is of great relevance to identify and characterize native bacterial strains of biotechnological interest and may be the main strategy to access bacterial groups such as *Gluconacetobacter*, that has not been found by the use of culture-independent methods.

References

- ANTONIO, C. DE SOUZA et al. Diazotrophic bacteria associated to sugarcane varieties cropped at Northeast Region of Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 4, p. 272–280, 2016.
- ANTUNES, J. E. L. et al. Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 2017.
- ARMANHI, J. S. L. et al. Multiplex amplicon sequencing for microbe identification in community-based culture collections. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–9, 2016.
- ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15–22, 2013.
- BAIS, H. P. et al. the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 233–266, 2006.
- BALDANI, J. I. et al. Review: A brief story of nitrogen fixation in sugarcane — reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 29, n. 4, p. 417, 2002.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media : a practical guide for microbiologists. p. 413–431, 2014.

- BASHA, S. A. et al. Performance of Native Fluorescent *Pseudomonas* on in vitro Seed Germination and Seedling Vigour of *Sorghum bicolor* (L .) Moench. **International Journal of Bio-resource and Stress Management**, v. 4, n. 4, p. 487–491, 2013.
- BASHAN, Y. INOCULANTS OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA FOR USE IN AGRICULTURE. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729–770, 1998.
- BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 1886, 19 nov. 2013.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. Azospirillum-plant relationships : physiological , molecular , agricultural , and environmental advances (1997 – 2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521–577, 2004.
- BENEDUZI, A. et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94–104, 2013a.
- BENEDUZI, A. et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94–104, jan. 2013b.
- BERG, G. et al. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 2, p. 215–229, 2005.
- BERTANI, I. et al. Rice bacterial endophytes: Isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. **Environmental Microbiology Reports**, v. 8, n. 3, p. 388–398, 2016.
- BEUKES, C. W. et al. Genome data provides high support for generic boundaries in *Burkholderia sensu lato*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–11, 2017.
- BODDEY, R. M. et al. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: Present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 139–149, 2003.
- BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K. Biofertilizers for Sustainability. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 92, p. 26, 2012.

- BRENNER, J.; KALESINSKAS, L.; PUTONTI, C. Exploring the Diversity of Bacillus whole genome sequencing projects using Peasant, the Prokaryotic Assembly and Annotation Tool. **bioRxiv**, 2017.
- BULGARELLI, D. et al. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807–838, 2013.
- BUTT, A. T.; THOMAS, M. S. Iron Acquisition Mechanisms and Their Role in the Virulence of Burkholderia Species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. November, p. 1–21, 2017.
- CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, n. 1, p. 23–31, 1988.
- CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D. J.; SHARMA, A. Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes From Sugarcane and Their Potential in Promoting Growth of the Host Under Field Conditions. **Experimental Agriculture**, v. 49, n. 1, p. 43–52, 6 nov. 2012.
- CRUZ, L. M. et al. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (Musa spp .) and Pineapple (Ananas 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (Musa spp .) and Pineapple (Ananas comosus (L . **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375–2379, 2001.
- CUESTA, G. et al. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. **Journal of environmental management**, v. 95 Suppl, p. S280-4, mar. 2012.
- DE SOUZA, R. S. C. et al. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–15, 2016.
- DE SOUZA ANTONIO, C. et al. Diazotrophic bacteria associated to sugarcane varieties cropped at Northeast Region of Brazil. **Revista Brasileirade Ciencias Agrarias**, v. 11, n. 4, p. 272–280, 2016.
- DEPOORTER, E. et al. Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100,

n. 12, p. 5215–5229, 2016.

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

DOBRTSA, A. P.; SAMADPOUR, M. Transfer of eleven species of the genus *Burkholderia* to the genus *Paraburkholderia* and proposal of *Caballeronia* gen. nov. to accommodate twelve species of the genera *Burkholderia* and *Paraburkholderia*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 2836–2846, 2016.

DONG, M. et al. Diversity of the bacterial microbiome in the roots of four *Saccharum* species: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, and *S. officinarum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–10, 2018.

DOS-SANTOS, C. M. et al. A Culture-Independent Approach to Enrich Endophytic Bacterial Cells from Sugarcane Stems for Community Characterization. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 2, p. 453–465, 2017.

DOTY, S. L. Functional importance of the plant microbiome: Implications for agriculture, forestry and bioenergy. **Functional Importance of the Plant Microbiome: Implications for Agriculture, Forestry and Bioenergy**, p. 1–111, 2017.

DRECHSEL, M. M. **Antibiose de *Gluconacetobacter diazotrophicus* contra bactérias diazotróficas e fitopatogênica de cana-de- açúcar e caracterização molecular de genes envolvidos na síntese de substâncias antagônicas**. [s.l.: s.n.].

DUFOUR, P. et al. Construction of a composite sorghum genome map and comparison with sugarcane, a related complex polyploid. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, n. 3–4, p. 409–418, 1997.

FRANCO, H. C. J. et al. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, v. 121, n. 1, p. 29–41, fev. 2011.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E. et al. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, n. 2, p. 117–128, 1999.

GALKOVSKIY, T. et al. GiA Roots : software for the high throughput analysis of plant root system architecture. 2012.

GARCÍA-FRAILE, P. et al. Rhizobium promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

GARRIDO-SANZ, D. et al. Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluoresces* complex. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 2016.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 963401, jan. 2012.

GOMILA, M. et al. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–13, 2015.

GONZÁLEZ, A. M.; VICTORIA, D. E.; MERINO, F. C. G. Efficiency of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Sugarcane. **Terra Latinoamericana**, v. 33, n. 4, p. 321–330, 2015.

GOVINDASAMY, V. et al. Functional and phylogenetic diversity of cultivable rhizobacterial endophytes of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 7, p. 925–943, 2017.

HABIBI, S. et al. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. **Plant and Soil**, v. 379, n. 1–2, p. 51–66, 2014.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, p. 95–98, 1999.

HAMONTS, K. et al. Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 124–140, 2018.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859–73, out. 2013.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, n. 347, p.

1–32, 1950.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja**, p. 36, 2011.

HUNGRIA, M.; CAMPOS, R. J.; MENDES, I. C. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO NA CULTURA DA SOJA. **Embrapa Soja**, p. 48, 2001.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V. **Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCRE** Embrapa, 2008.

IDRIS, A.; LABUSCHAGNE, N.; KORSTEN, L. Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. **The Journal of Agricultural Science**, v. 147, n. 1, p. 17, 13 nov. 2008.

JAMES, E. K. et al. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 6, p. 757–766, 1994.

JESUS, J. A. DE. **Jucimara anúncio de Jesus**. [s.l: s.n.].

KHAN, A. L. et al. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 689–695, 2014.

KIMURA, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 1330, p. 111–120, 1980.

KRUASUWAN, W.; THAMCHAIPENET, A. Diversity of Culturable Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes Associated with Sugarcane Roots and Their Effect of Growth by Co-Inoculation of Diazotrophs and Actinomycetes. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 4, p. 1074–1087, 2016.

KUMAR, G. . . et al. Plant Growth Promoting *Pseudomonas* spp . from Diverse Agro-Ecosystems of India for *Sorghum bicolor* L . **Journal of Biofertilizers & Biopesticides**, v. 7, p. 2, 2012.

LAMERS, R. P. et al. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and

refinement of cluster groups based on multilocus data. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, 2012.

LOPES, L. D. et al. Tropical soils are a reservoir for fluorescent *Pseudomonas* spp. biodiversity. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 62–74, 2018.

LOPES, L. D.; PEREIRA E SILVA, M. DE C.; ANDREOTE, F. D. Bacterial abilities and adaptation toward the rhizosphere colonization. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–13, 2016.

LUO, S. et al. Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1745–1753, 2012.

MAGNANI, G. S. et al. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 250–258, 2010.

MAGNANI, G. S. et al. Culture-independent analysis of endophytic bacterial communities associated with Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4549–4558, 2013.

MAREQUE, C. et al. Isolation, characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). p. 1057–1067, 2015.

MENDES, R. et al. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7259–7267, 2007.

MILANI, K. M. L.; MACHINESKI, O.; BALOTA, E. L. OCORRÊNCIA E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, p. 1345–1351, 2011.

MING, R. et al. Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: Comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, v. 150, n. 4, p. 1663–1682, 1998.

MONTAÑEZ, A. et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their

inoculation effects in vitro. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21–28, 2012.

MOREIRA, F. S. et al. Functional abilities of cultivable plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum* L .) crops. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 111–121, 2016.

MOUSAVI, S. A. et al. Phylogeny of the Rhizobium-Allorhizobium-Agrobacterium clade supports the delineation of Neorhizobium gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 208–215, 2014.

MOUSAVI, S. A. et al. Revised phylogeny of Rhizobiaceae: Proposal of the delineation of Pararhizobium gen. nov., and 13 new species combinations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 84–90, 2015.

MÜLLER, D. B. et al. The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. **Annual Review of Genetics**, v. 50, n. 1, p. 211–234, 2016.

MUÑOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. **Microbial Ecology**, v. 46, n. 4, p. 454–464, 2003.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 2, p. 157–164, 1999.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1–2, p. 23–32, jun. 2006.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 106–113, jan. 2008.

OLIVEIRA, A. L. M. DE et al. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 56, 22 set. 2014.

ORMEÑO-ORRILLO, E. et al. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are

used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2012.

PATIL, N. .; SHINDE, S. R. Isolation, molecular characterization and plant growth promoting traits of *Neosasaia Chiangmaiensis* (KD) from banana. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 1, p. 309–319, 2014.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 57, n. October 2017, p. 106–116, 2018.

PEREIRA, P. et al. Analysis of the Bacterial Diversity Associated with the Roots of Maize (*Zea mays* L.) through Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. **ISRN Ecology**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

PISA, G. et al. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 12, p. 1215–1221, dez. 2011.

RADEMAKER, J. L. .; DE BRUIJIN, F. . CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION OF MICROBES BY REP-PCR GENOMIC FINGERPRINTING AND COMPUTER-ASSISTED PATTERN ANALYSIS. **DNA markers: Protocols, Applications and Overviews**, p. 1995–1998, 1996.

REIS JUNIOR, F. et al. Levantamento e quantificação de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 985–994, 2000a.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v. 219, n. 1981, p. 153–159, 2000b.

RODRIGUES, A. A. et al. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane 1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 2, p. 149–158, 2016.

RODRÍGUEZ-BLANCO, A.; SICARDI, M.; FRIONI, L. Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 3, p. 391–402,

2015.

SÁEZ-NIETO, J. A. et al. Paenibacillus spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. **New Microbes and New Infections**, v. 19, p. 19–27, 2017.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method : A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus burkholderia: Proposal for division of this genus into the emended genus burkholderia containing pathogenic organisms and a new genus paraburkholderia gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. NOV, p. 1–22, 2014.

SCHULTZ, N. et al. INOCULATION OF SUGARCANE WITH DIAZOTROPHIC BACTERIA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 6, p. 407–414, 2014.

SCHULTZ, N. et al. Produtividade e diluição isotópica de ¹⁵N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1594–1601, 2016.

SCHULTZ, N. et al. Yield of sugarcane varieties and their sugar quality grown in different soil types and inoculated with a diazotrophic bacteria consortium. **Plant Production Science**, v. 20, n. 4, p. 366–374, 2017.

SILVA, M. F. DA. **Uso de Inoculante Polimérico contendo Bactérias Diazotróficas na Cultura da Cana-de-açúcar**. [s.l: s.n.].

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. et al. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2014.

TAKAHASHI, T.; SATOH, I.; KIKUCHI, N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16s rRNA gene sequence analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 725–728, 1999.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.

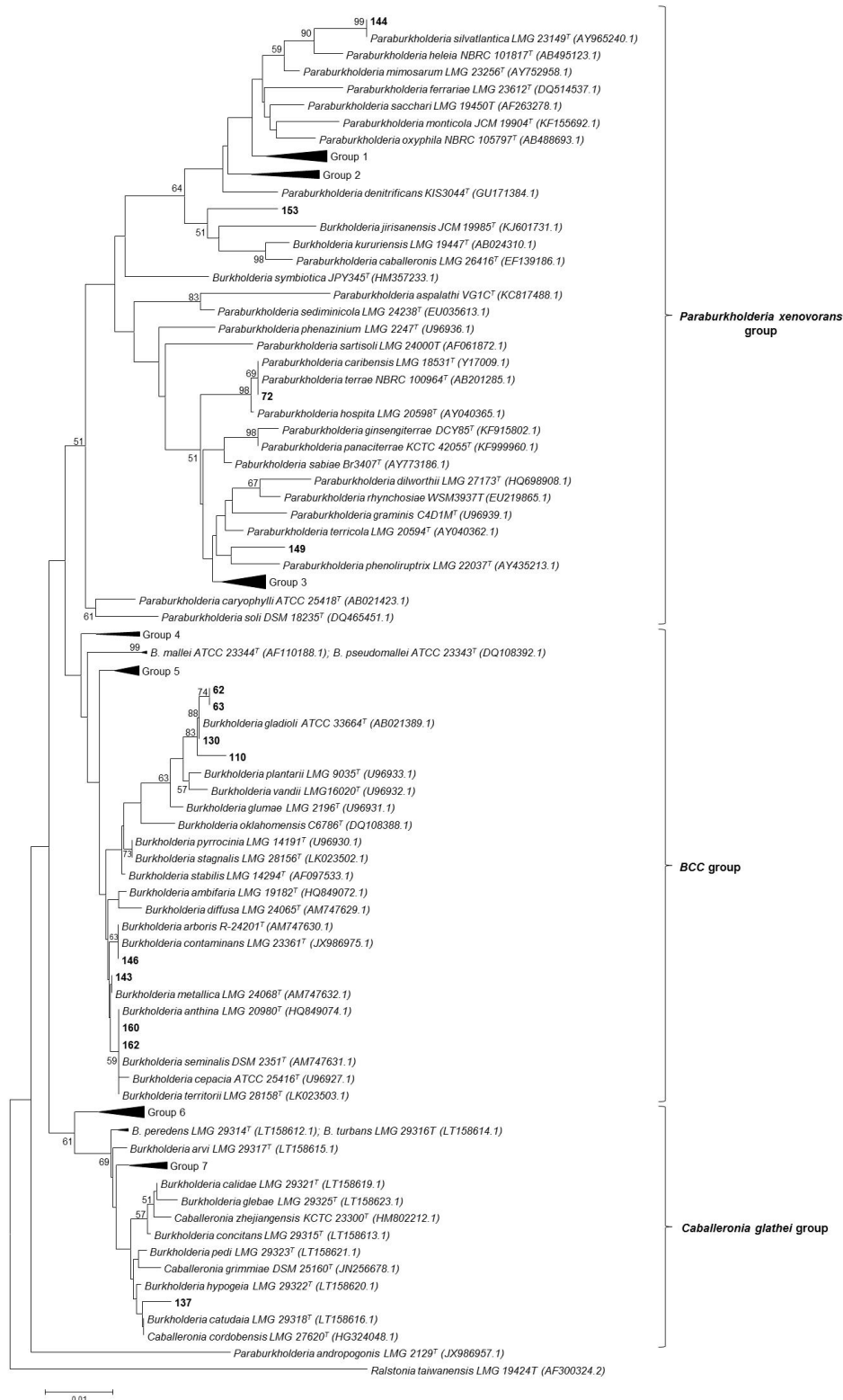
- TAULÉ, C. et al. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 35–49, 26 out. 2011.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting , position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.
- URQUIAGA, S. et al. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 5–21, 22 out. 2011.
- VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 407–438, 1996.
- VERMA, P. et al. Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 44–58, 2016.
- VERSALOVIC, J. et al. **Microbial DNA typing by automated repetitive sequence-based PCR. Methods in Molecular and Cellular Biology**, 1994.
- WANG, A.; ASH, G. J. Whole Genome Phylogeny of *Bacillus* by Feature Frequency Profiles (FFP). **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–14, 2015.
- WANG, J. et al. Microcollinearity between autopolyploid sugarcane and diploid sorghum genomes. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, 2010.
- WANG, Q. et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.
- XIE, J. B. et al. Comparative Genomic Analysis of N₂-Fixing and Non-N₂-Fixing *Paenibacillus* spp.: Organization, Evolution and Expression of the Nitrogen Fixation Genes. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 3, 2014.
- YEOH, Y. K. et al. The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying

nitrogen fertilizer application. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1338–1351, 2016.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the Phototrophic Rhizobium Strain BTail by Polymerase Chain Reaction-Based Sequencing of a 16S rRNA Gene Segment. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2271–2277, 1991.

Supplementary Material

Figure S1 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Burkholderia* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Ralstonia taiwanensis* LMG2129T was used as outgroup. The *Paraburkholderia* groups on the phylogenetic tree were based on the following studies (BEUKES et al., 2017; BUTT; THOMAS, 2017; DEPOORTER et al., 2016; DOBRITSA; SAMADPOUR, 2016; SAWANA; ADEOLU; GUPTA, 2014).



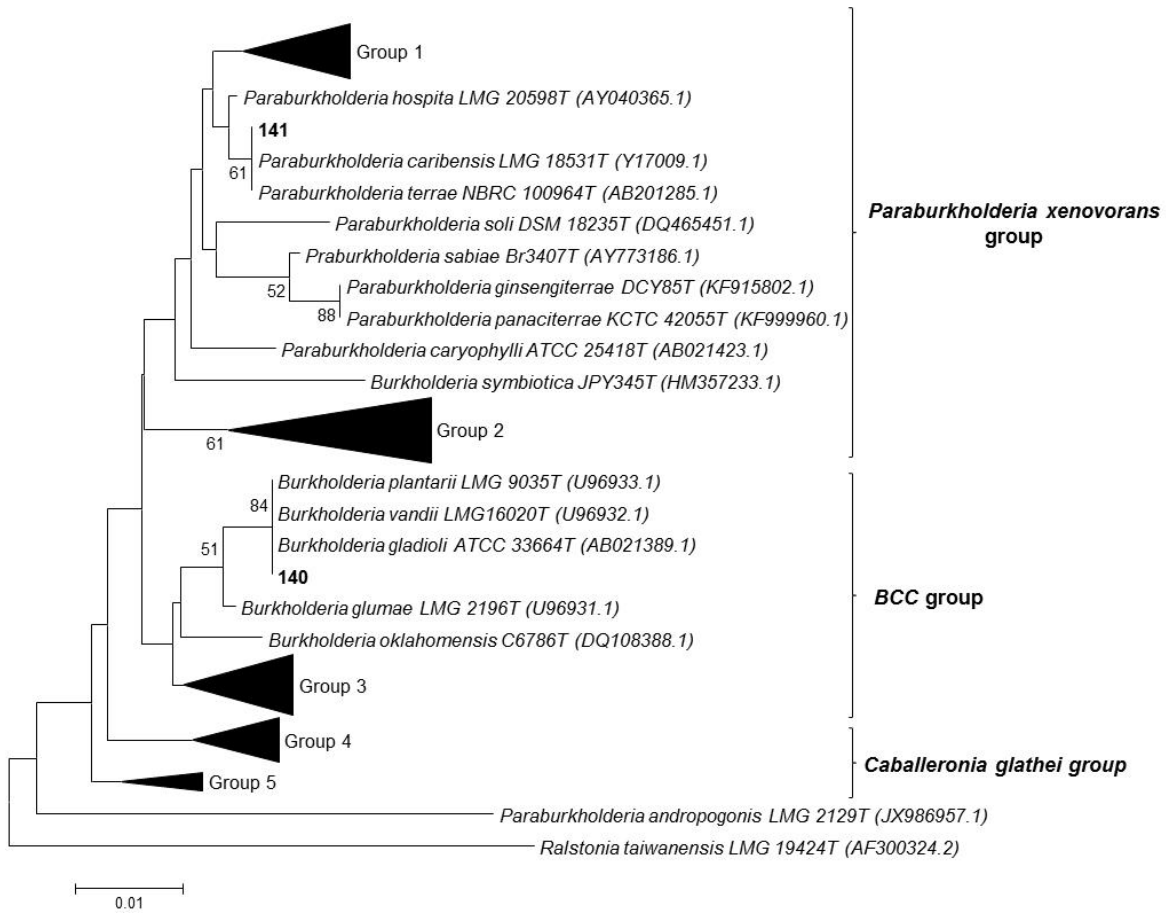
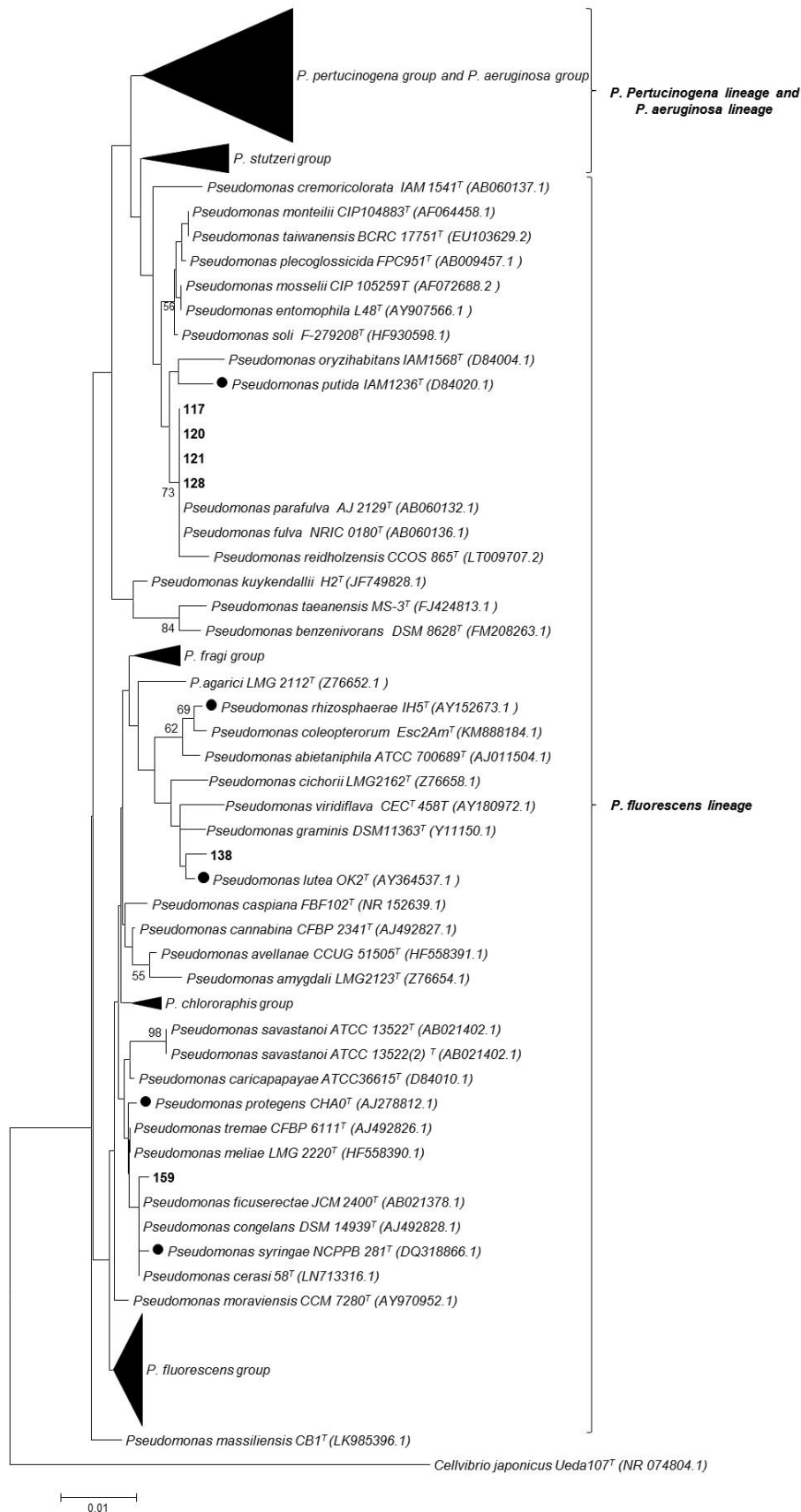


Figure S2 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Pseudomonas* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Cellvibrio japonicum* Ueda107^T and *Acinetobacter baumannii* DSM30007^T was used as outgroup. The pseudomonas groups on the phylogenetic tree were formed based on the following studies: (GARRIDO-SANZ et al., 2016; GOMILA et al., 2015; LOPES et al., 2018; PEIX; RAMÍREZ-BAHENA; VELÁZQUEZ, 2018). The circles in the trees refer to the groups.



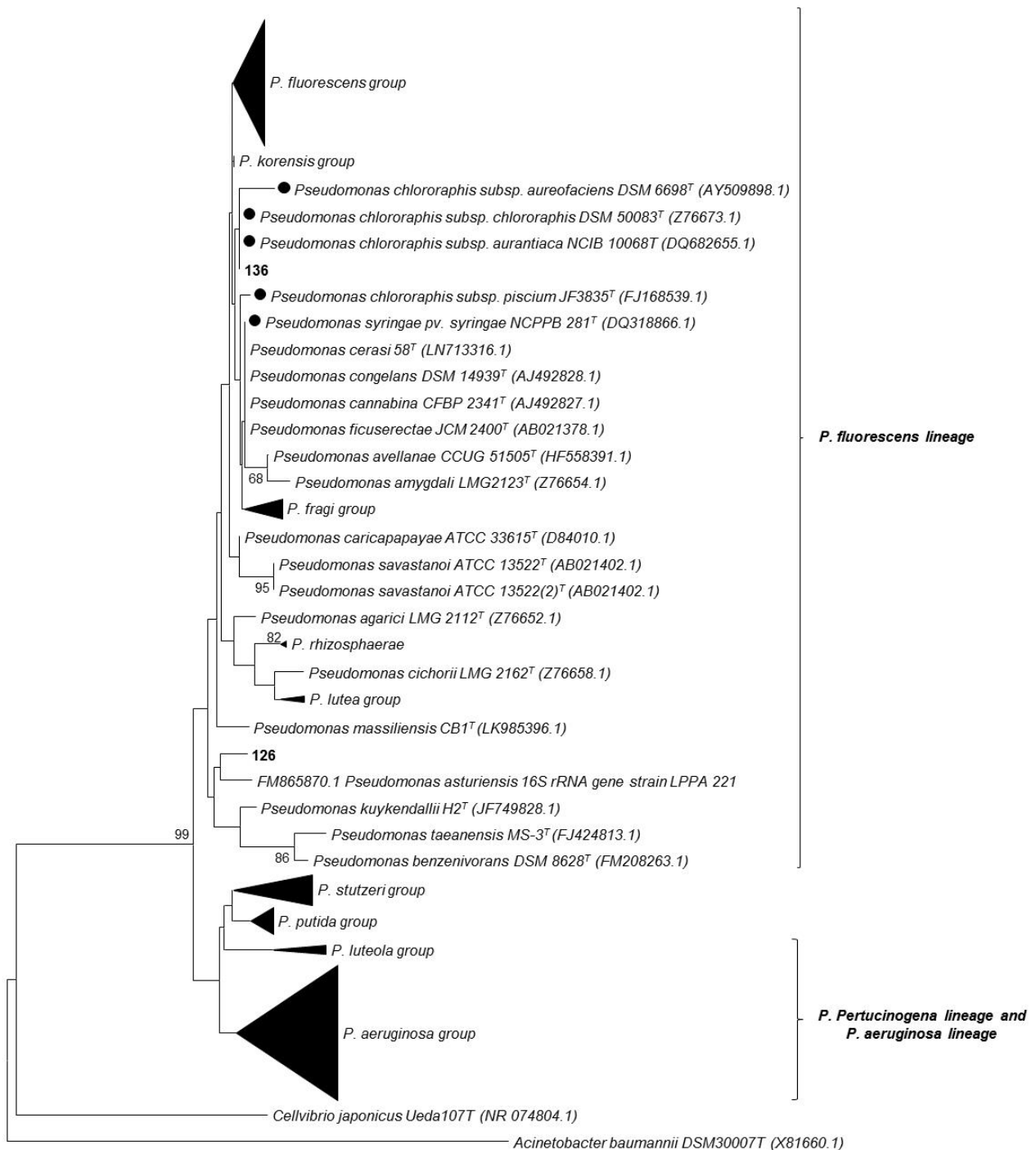
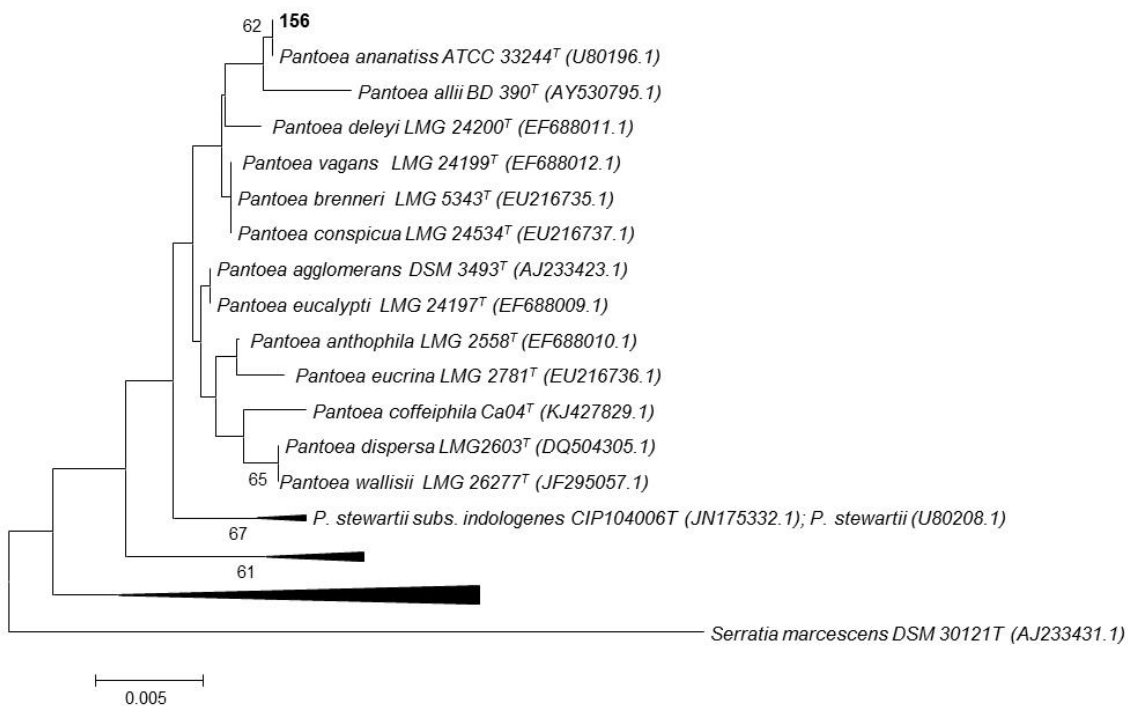
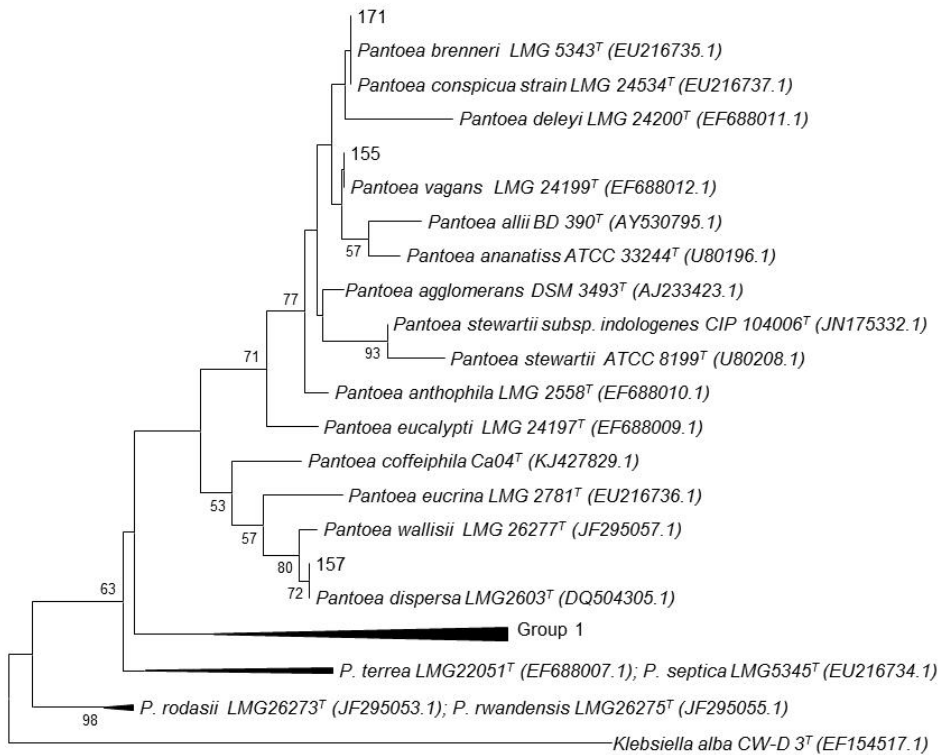


Figure S3 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Pantoea* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Klebsiella alba* CW-D 3 and *Serratia marcescens* DSM 30121 was used as outgroup.



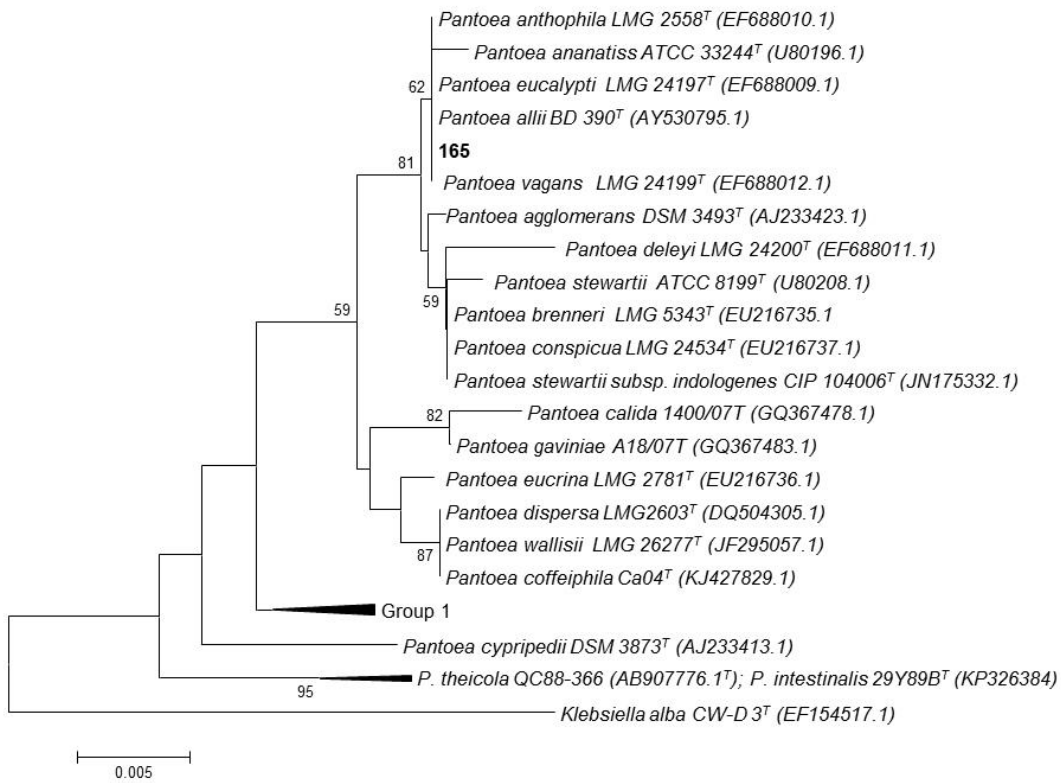
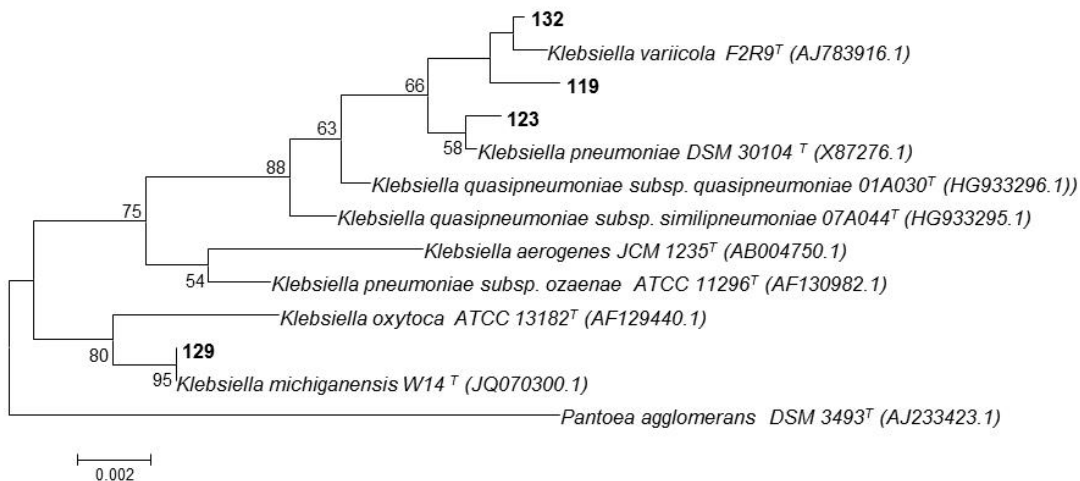


Figure S4 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Klebsiella* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Pantoea agglomerans* DSM 3493^T was used as outgroup.



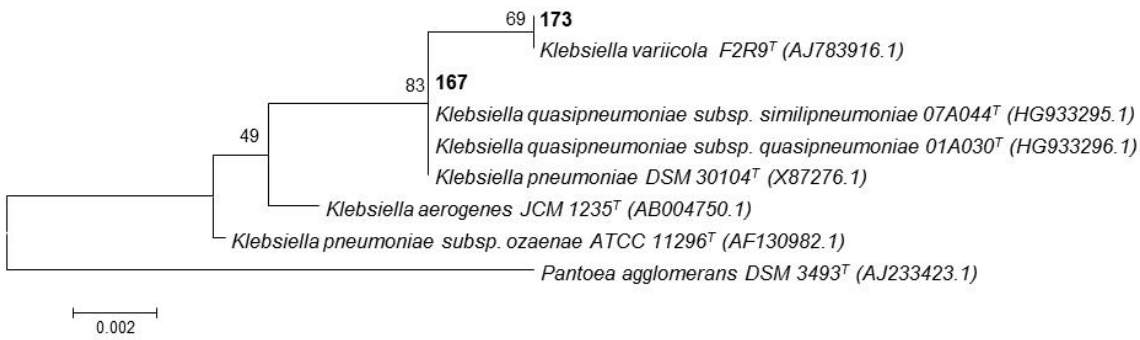


Figure S5 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Enterobacter* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Proteus mirabilis* NCTC 11938^T was used as outgroup.

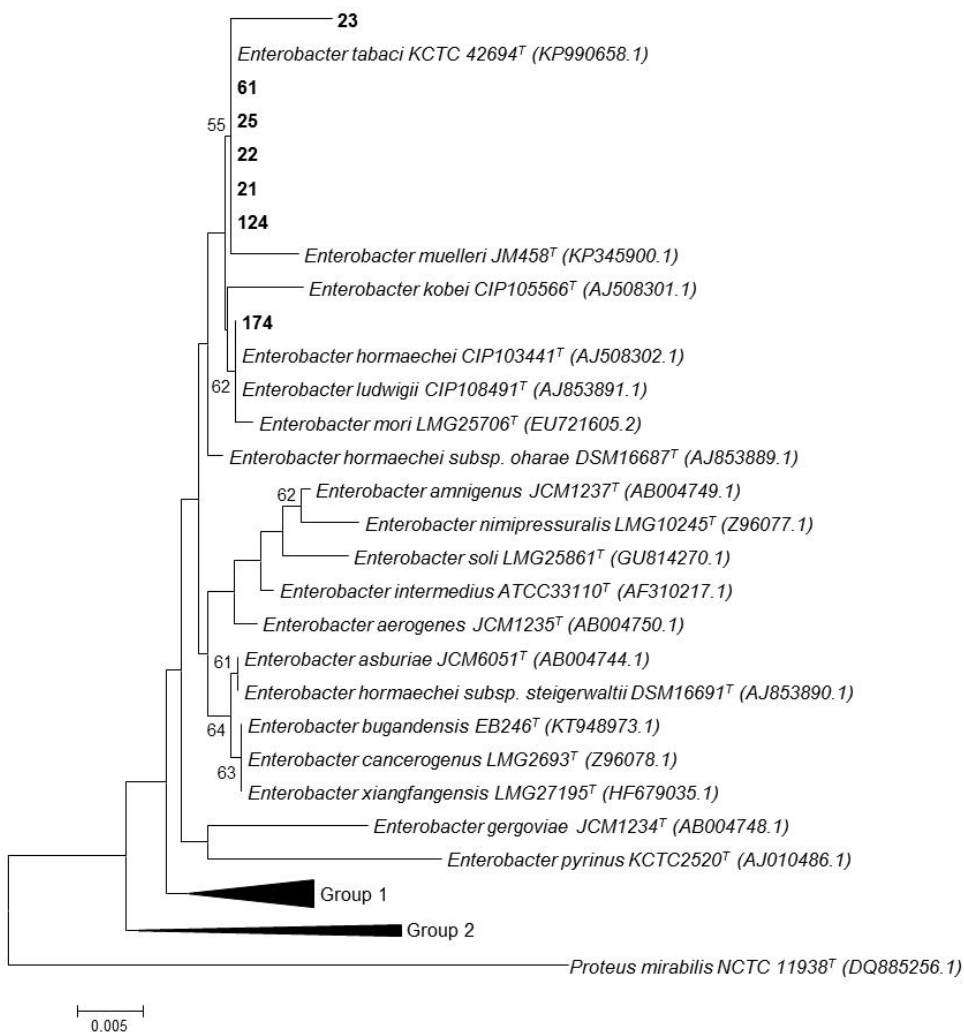


Figure S6 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Serratia* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Proteus mirabilis* NCTC11938^T was used as outgroup.

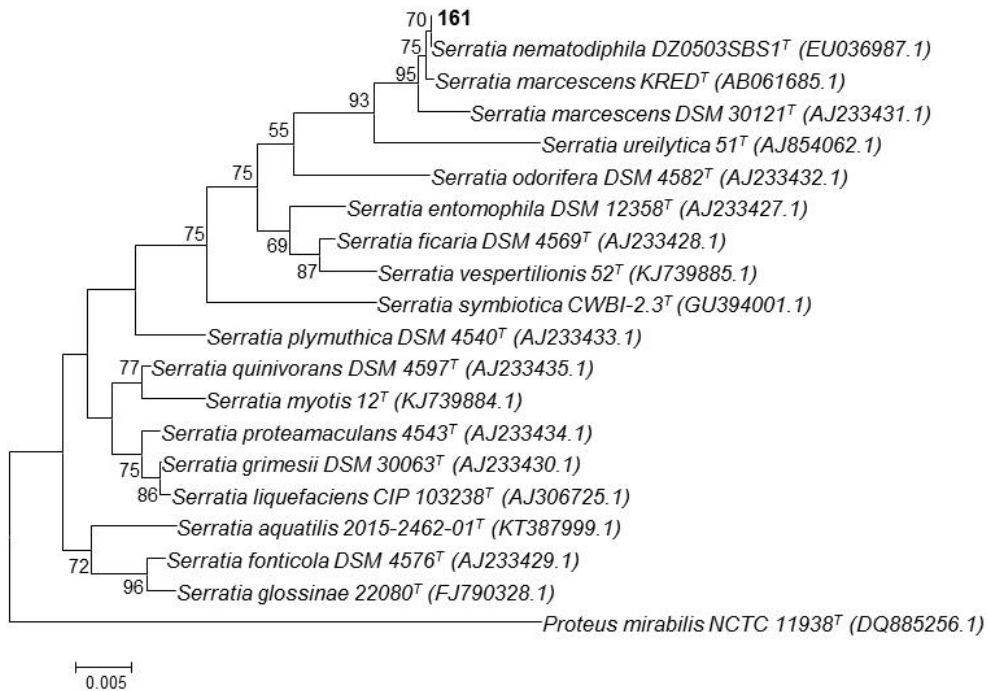


Figure S7 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Dyella* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Rhodanobacter lindanoclasticus* RP5557^T was used as outgroup.

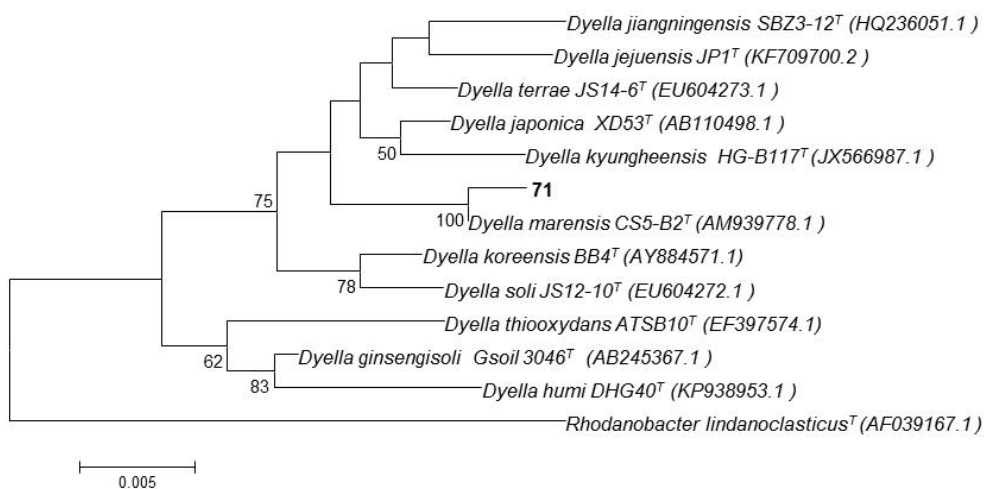


Figure S8 Phylogenetic tree based on the analysis partial sequences of the 16S rRNA gene of *Pseudoxanthomonas* isolates from sugarcane and of reference strains. Distance was calculated by the Kimura's two-parameter model. Phylogenetic tree was generated by neighbour-joining. The significance of each branch is indicated by a bootstrap value (in percentage) calculated for 1000 subsets (only values higher than 50% are indicated). Bar 0,01 substitutions per nucleotide position. *Lysobacter capsici* YC5194^T was used as outgroup.

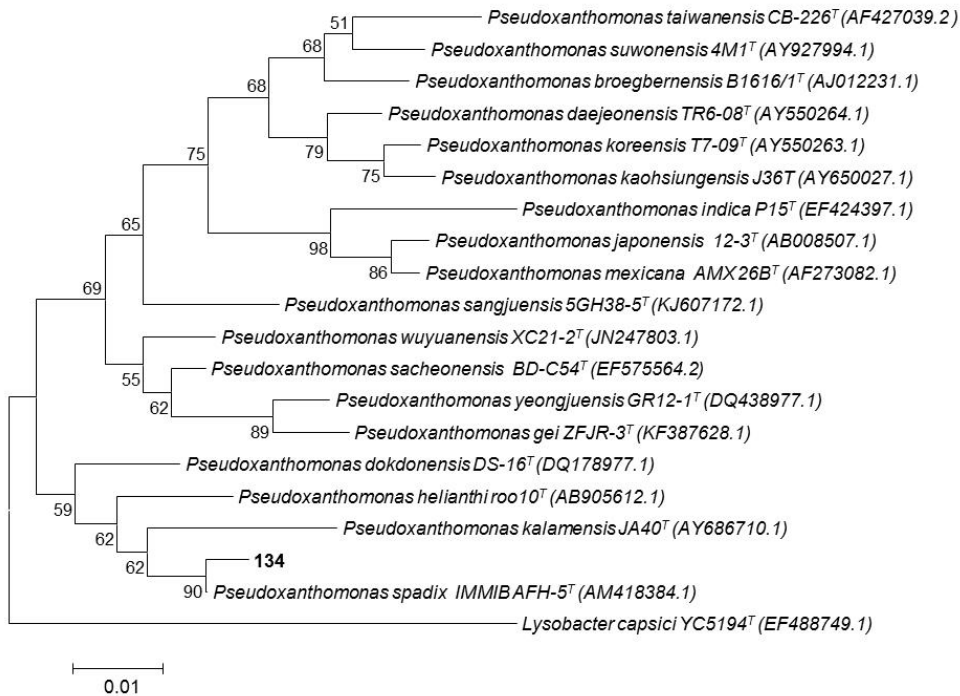


Figure S9 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Stenotrophomonas* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Xylella fastidiosa* ATCC 35879^T was used as outgroup.

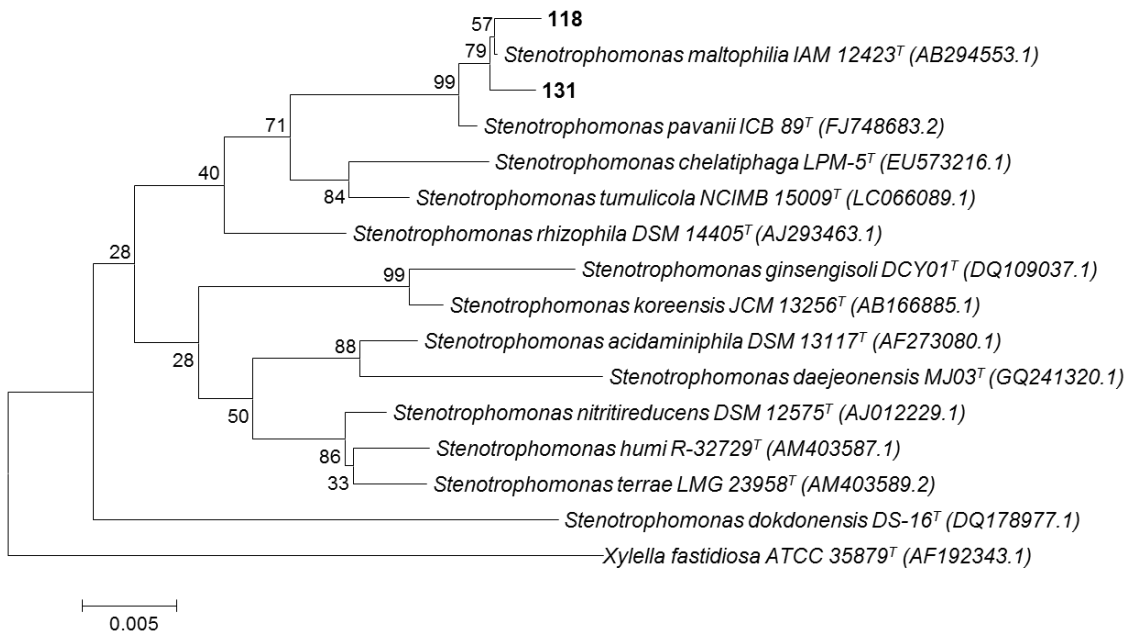


Figure S10 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Acinetobacter* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Psychrobacter cryohalolentis* K5^T was used as outgroup

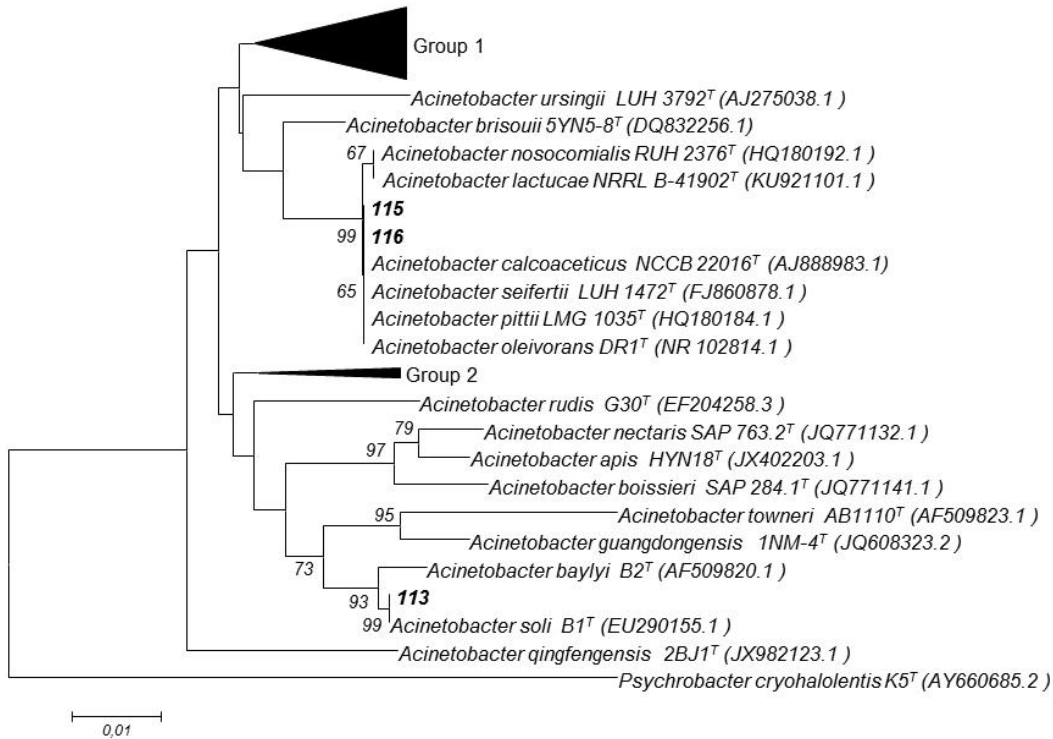
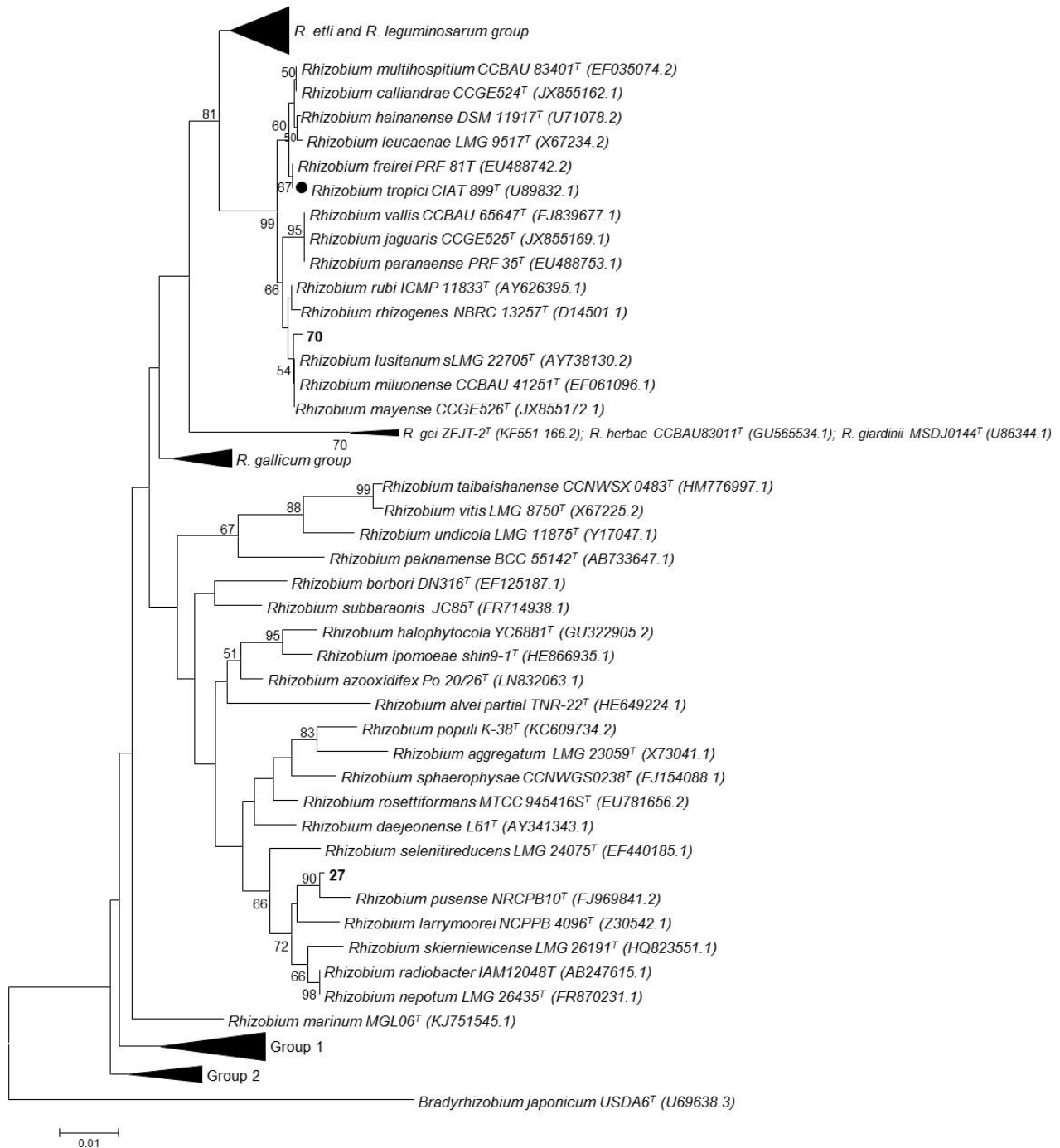


Figure S11 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Rhizobium* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Bradyrhizobium japonicum*^T USDA 6 was used as outgroup. The *Rhizobium* groups on the phylogenetic tree were based on the following studies (MOUSAVI et al., 2014, 2015; ORMEÑO-ORRILLO et al., 2012).



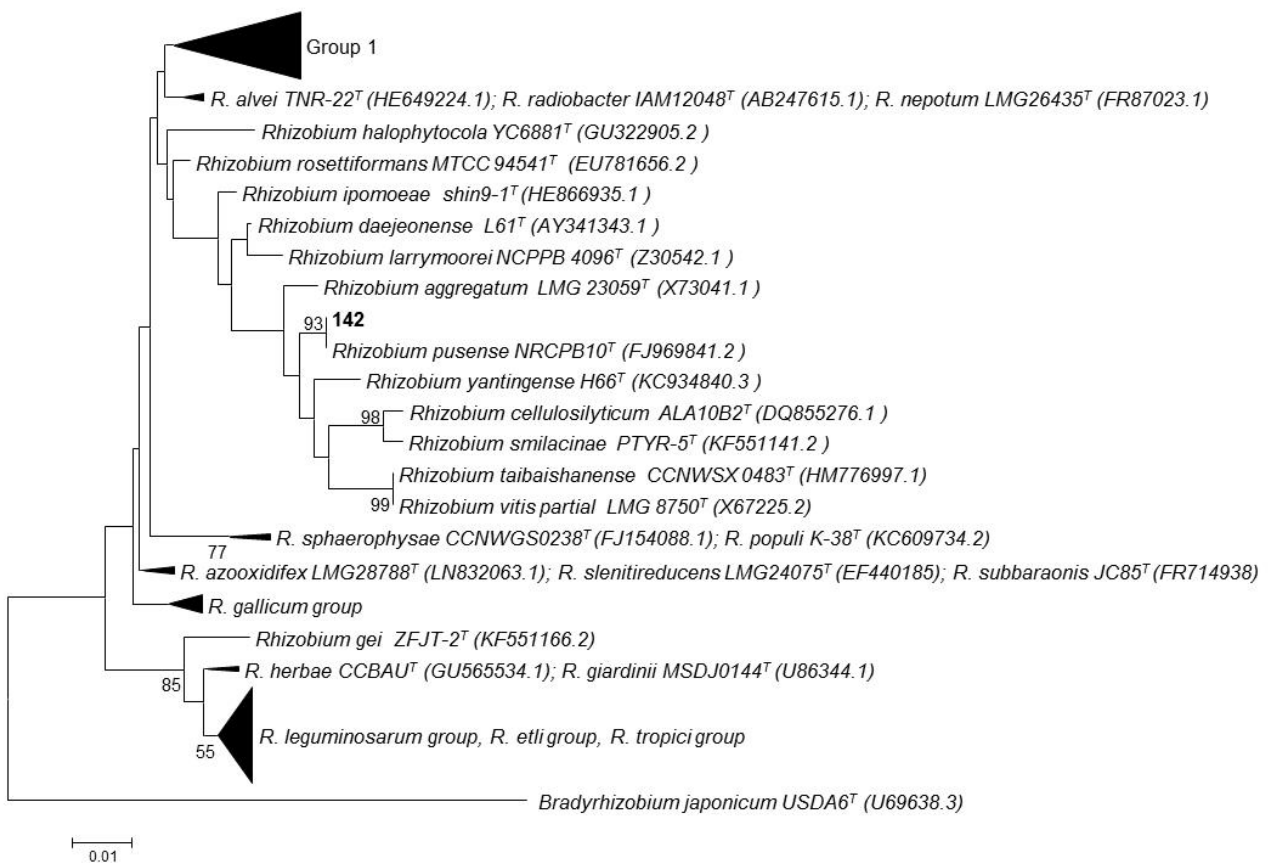


Figure S12 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Sphingomonas* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170^T was used as outgroup.

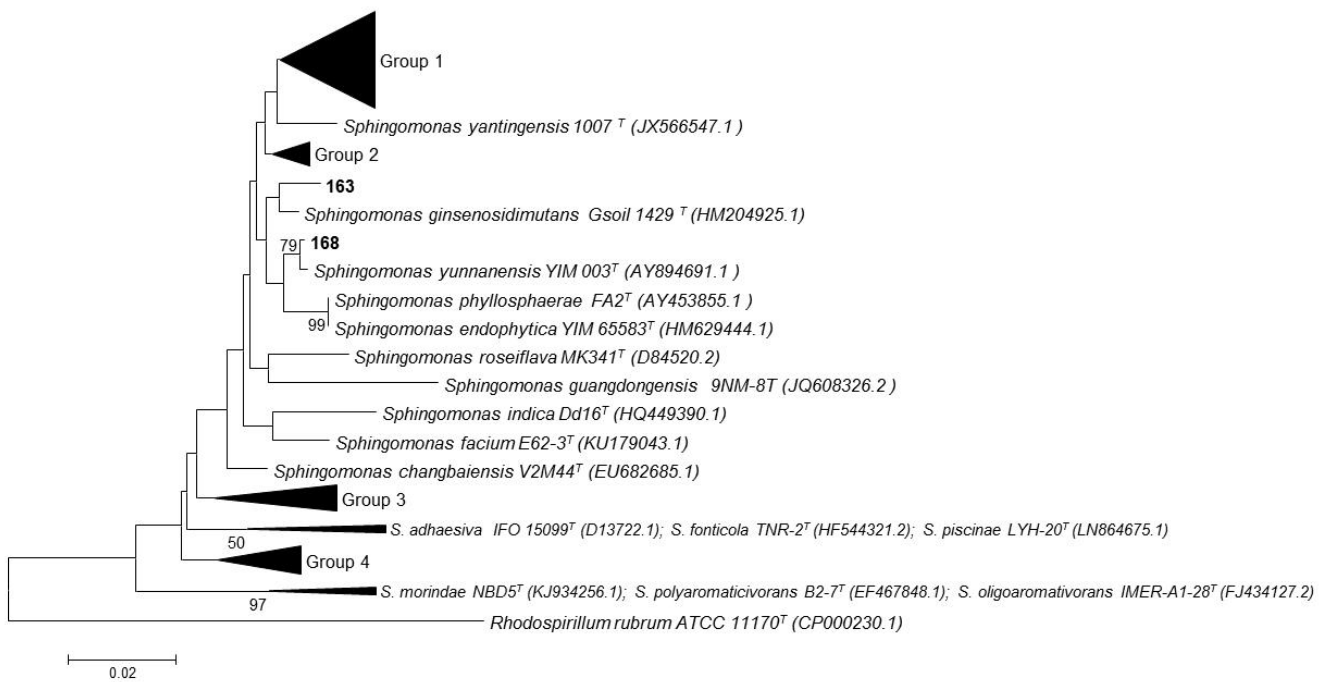


Figure S13 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Gluconacetobacter* and *Neosasaia* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Acetobacter aceti* NCIB8621^T was used as outgroup.

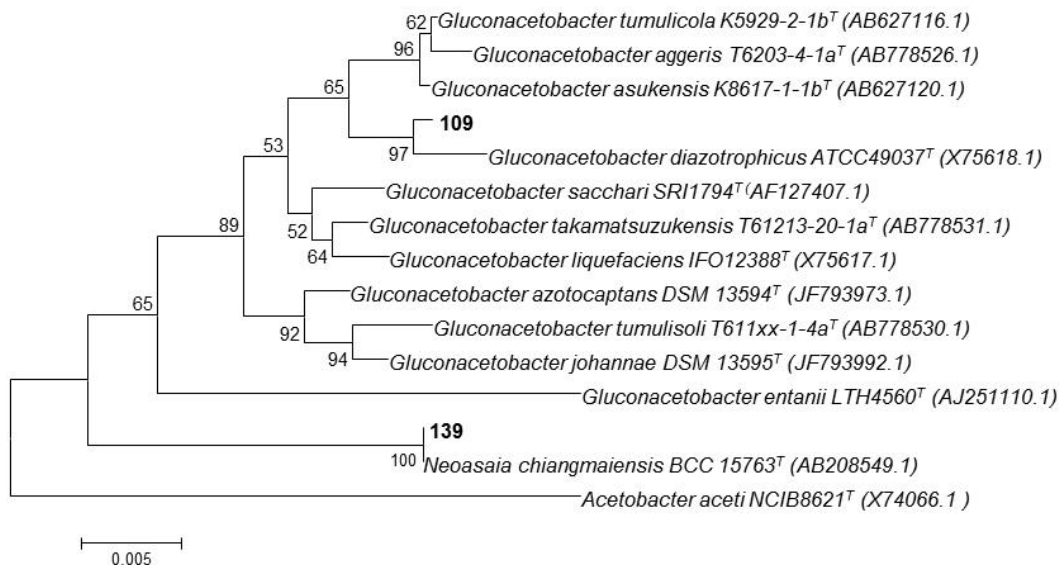


Figure S14 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Bacillus* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Alicyclobacillus acidocaldarius* 104-1A^T was used as outgroup. The *Bacillus* groups on the phylogenetic tree were based on the following studies (BRENNER; KALESINSKAS; PUTONTI, 2017; WANG; ASH, 2015).

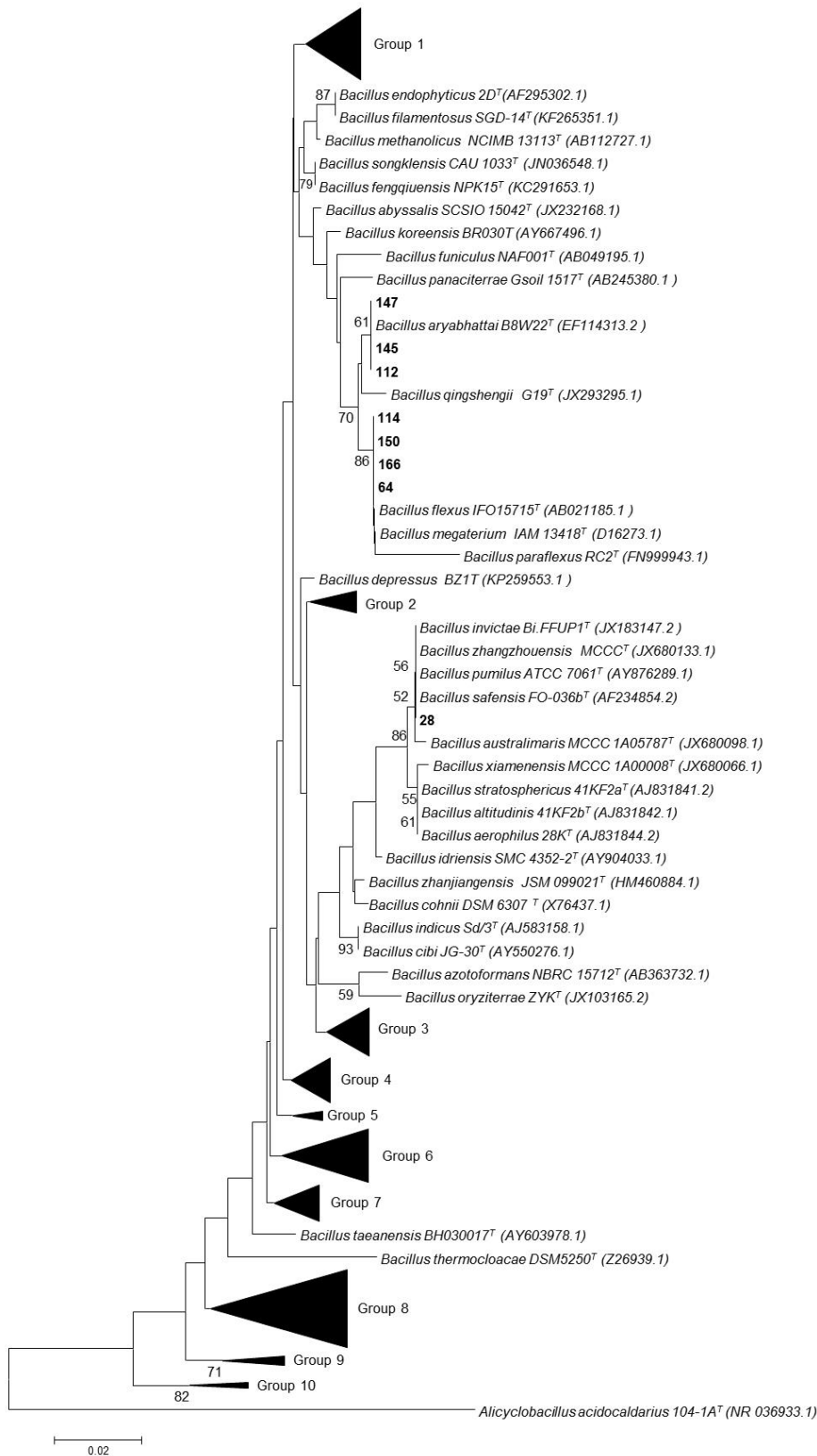


Figure S15 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Paenibacillus* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions. *Alicyclobacillus acidocaldarius* 104-1A^T was used as outgroup. The *Paenibacillus* groups in the phylogenetic tree were divided into nitrogen fixing species and human clinical specimen species (SÁEZ-NIETO et al., 2017; XIE et al., 2014).

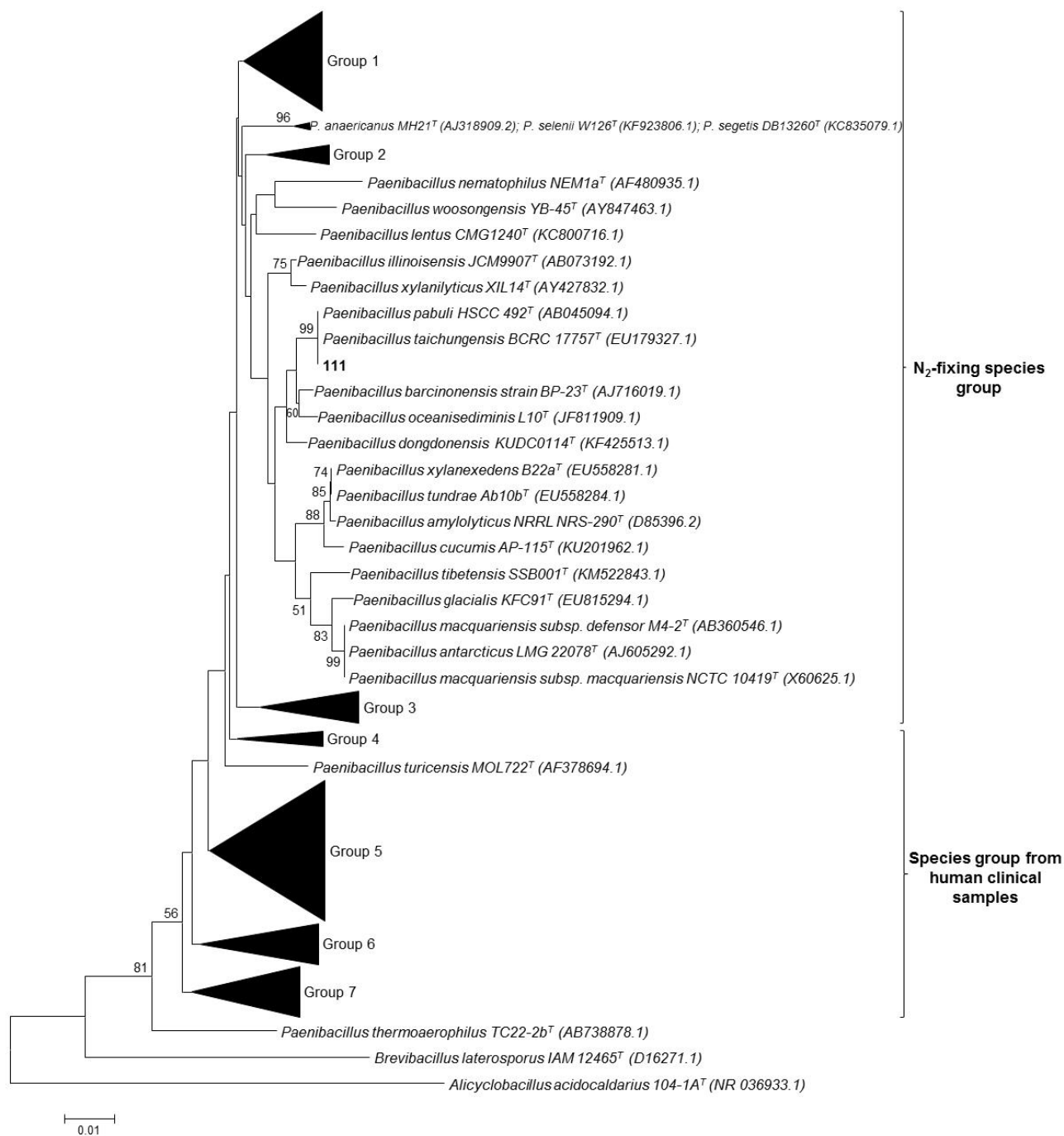


Figure S16 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of *Staphylococcus* isolates from sugarcane and of reference strains. The sequences were aligned using Clustal W and the phylogeny was built with MEGA v.7 by the neighbor-joining method (NJ), using the Kimura 2 Parameter (K2P) and 1000 bootstrap replicates. Support values are shown when $\geq 50\%$. Bar indicates the percentage of nucleotide substitutions *Bacillus subtilis* DSM10^T was used as outgroup. The *Staphylococcus* groups formed on the phylogenetic tree were based on the following studies (LAMERS et al., 2012; TAKAHASHI; SATOH; KIKUCHI, 1999).

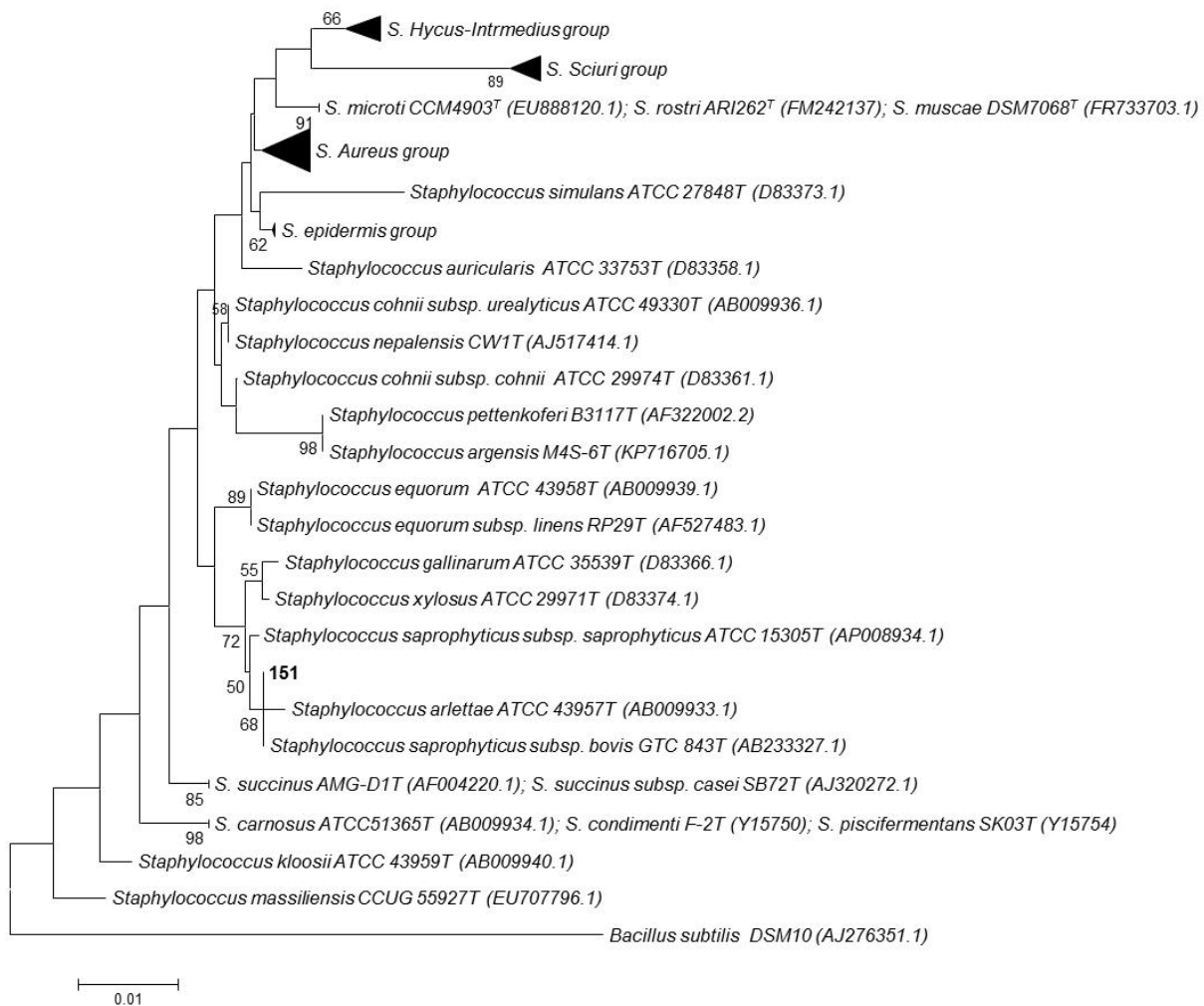
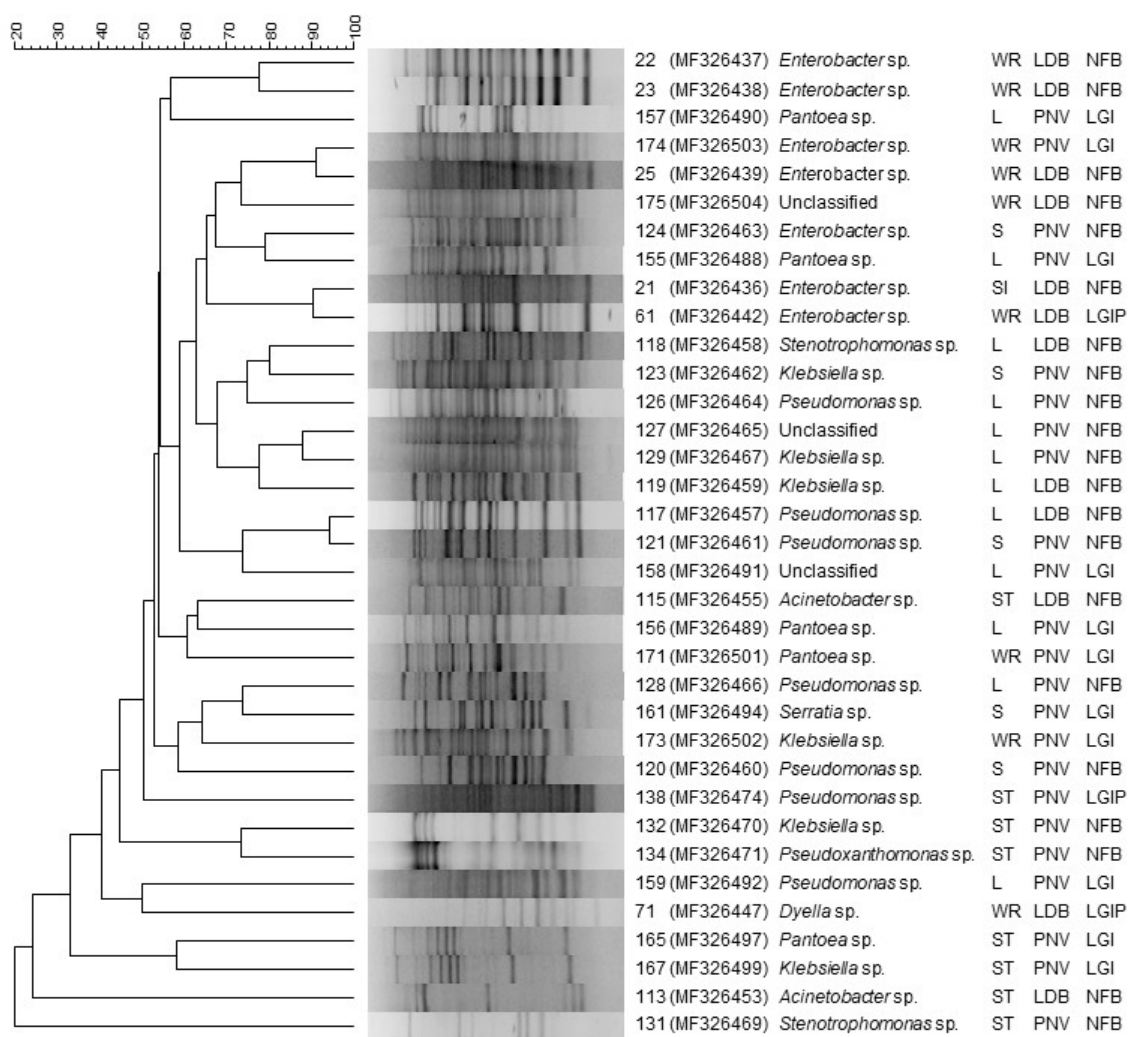
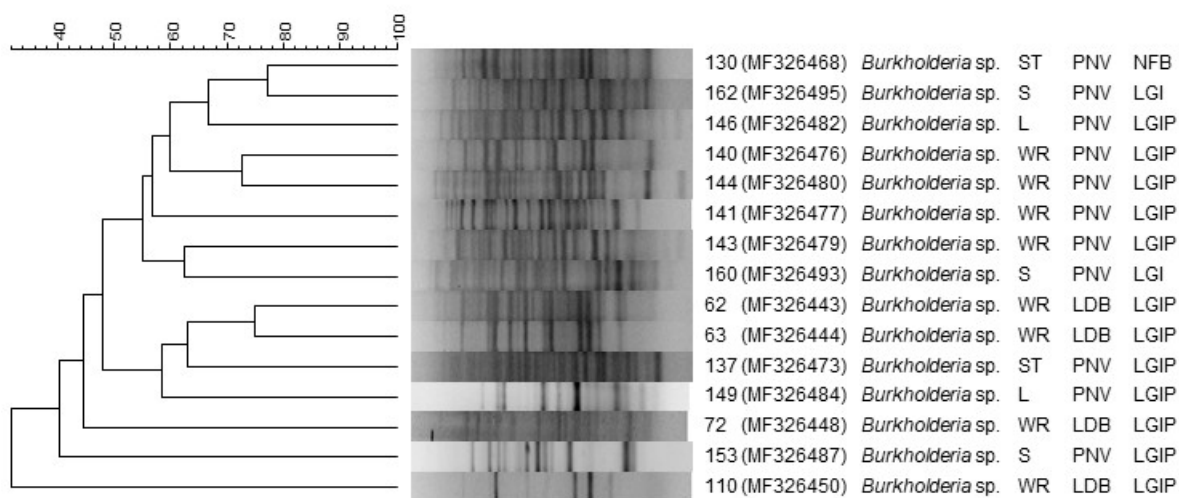


Figure S17 BOX-PCR profiles of Gammaproteobacteria class isolated in this study. Dendrogram was built using the Bionumerics software based on the UPGMA algorithm and the Jaccard coefficient with 2% of tolerance.

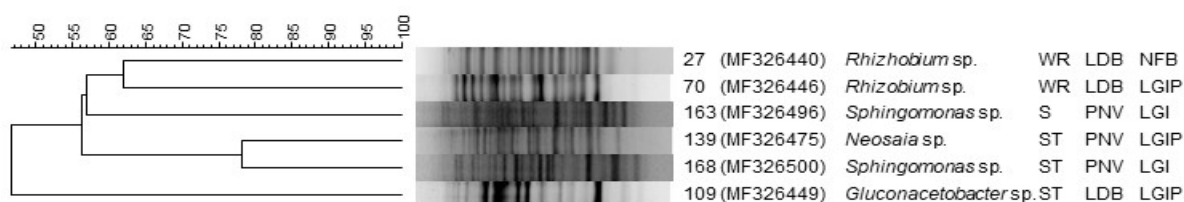


coefficient with 2% of tolerance.



WR (Washed roots); L (Leaves); S (Soil); ST (Stem); LDB (Londrina); PNV (Paranavaí).

Figure S19 BOX-PCR profiles of *Alphaproteobacteria* class isolated in this study. Dendrogram was built using the Bionumerics software based on the UPGMA algorithm and the Jaccard coefficient with 2% of tolerance.



WR (Washed roots); L (Leaves); S (Soil); ST (Stem); LDB (Londrina); PNV (Paranavaí).

Figure S20 BOX-PCR profiles of *Bacilli* class isolated in this study. Dendrogram was built using the Bionumerics software based on the UPGMA algorithm and the Jaccard coefficient with 2% of tolerance.

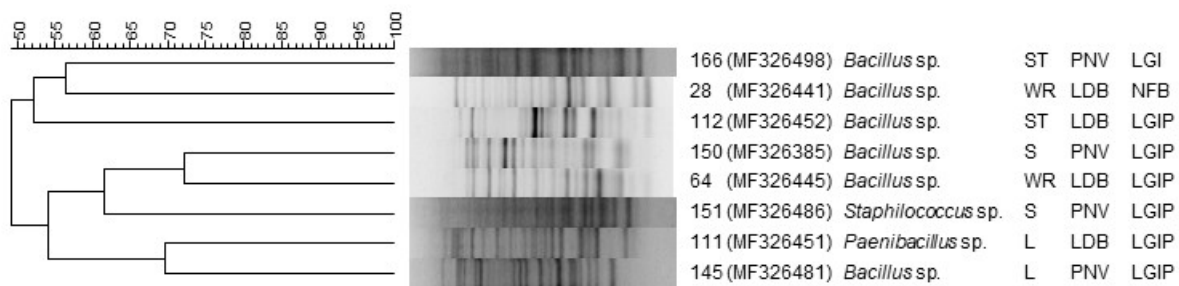


Table S1 GenBank accession numbers for the sequences used in this study.

Isolated	Genus (Identification 16s rRNA)	Accession number
21	<i>Enterobacter sp.</i>	MF326436
22	<i>Enterobacter sp.</i>	MF326437
23	<i>Enterobacter sp.</i>	MF326438
25	<i>Enterobacter sp.</i>	MF326439
27	<i>Rhizobium sp.</i>	MF326440
28	<i>Bacillus sp.</i>	MF326441
61	<i>Enterobacter sp.</i>	MF326442
62	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326443
63	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326444
64	<i>Bacillus sp.</i>	MF326445
70	<i>Rhizobium sp.</i>	MF326446
71	<i>Dyella sp.</i>	MF326447
72	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326448
109	<i>Gluconacetobacter sp.</i>	MF326449
110	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326450
111	<i>Paenibacillus sp.</i>	MF326451
112	<i>Bacillus sp.</i>	MF326452
113	<i>Acinetobacter sp.</i>	MF326453
114	<i>Bacillus sp.</i>	MF326454
115	<i>Acinetobacter sp.</i>	MF326455
116	<i>Acinetobacter sp.</i>	MF326456
117	<i>Pseudomonas sp.</i>	MF326457
118	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	MF326458
119	<i>Klebsiella sp.</i>	MF326459
120	<i>Pseudomonas sp.</i>	MF326460
121	<i>Pseudomonas sp.</i>	MF326461
123	<i>Klebsiella sp.</i>	MF326462
124	<i>Enterobacter sp.</i>	MF326463
126	<i>Pseudomonas sp.</i>	MF326464
127	<i>Klebsiella sp.</i>	MF326465
128	<i>Pseudomonas sp.</i>	MF326466
129	<i>Klebsiella sp.</i>	MF326467
130	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326468
131	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	MF326469
132	<i>Klebsiella sp.</i>	MF326470
134	<i>Pseudoxanthomonas sp.</i>	MF326471
136	<i>Pseudomonas sp.</i>	MF326472
137	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326473
138	<i>Pseudomonas sp.</i>	MF326474
139	<i>Neoasaia sp.</i>	MF326475
140	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326476
141	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326477
142	<i>Rhizobium sp.</i>	MF326478
143	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326479
144	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326480
145	<i>Bacillus sp.</i>	MF326481
146	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326482
147	<i>Bacillus sp.</i>	MF326483
149	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326484
150	<i>Bacillus sp.</i>	MF326485
151	<i>Staphylococcus sp.</i>	MF326486
153	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326487
155	<i>Pantoea sp.</i>	MF326488
156	<i>Pantoea sp.</i>	MF326489
157	<i>Pantoea sp.</i>	MF326490
158	<i>Klebsiella sp.</i>	MF326491
159	<i>Pseudomonas sp.</i>	MF326492
160	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326493
161	<i>Serratia sp.</i>	MF326494
162	<i>Burkholderia sp.</i>	MF326495
163	<i>Sphingomonas sp.</i>	MF326496
165	<i>Pantoea sp.</i>	MF326497
166	<i>Bacillus sp.</i>	MF326498
167	<i>Klebsiella sp.</i>	MF326499
168	<i>Sphingomonas sp.</i>	MF326500
171	<i>Pantoea sp.</i>	MF326501
173	<i>Klebsiella sp.</i>	MF326502
174	<i>Enterobacter sp.</i>	MF326503
175	<i>Enterobacter sp.</i>	MF326504

Table S2. Data collection carried out in the literature about the bacterial community present in the rhizosphere and internal tissues (root, stem and leaf) of different sugarcane varieties, accessed through culture dependent methods and metagenomic approach.

Genus	Samples	Culture-dependent studies	Culture independent studies	Author/publication year
<i>Achromobacter</i>	Stem, Root	X	X	Taulé et al., 2012 (Uruguay); Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Acidovorax</i>	Root		X	Dong et al., 2018 (China); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Acinetobacter</i>	Rhizosphere, Root, Stem	X	X	Taulé et al., 2012 (Uruguay); Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Dong et al., 2018 (China); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Acetobacter</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Acidisoma</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Acidocella</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Actinoallomurus</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Actinomadura</i>	Root	X	X	Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Actinomyces</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Actinoplanes</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Actinopolymorpha</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Aerococcus</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Aeromonas</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Afifella</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Agrobacterium</i>	Stem, Rhizosphere, Root	X	X	Taulé et al., 2012 (Uruguay); Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Alcaligenes</i>	Stem	X		Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Taulé et al., 2012 (Uruguay)
<i>Algoriphagus</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Alicyclobacillus</i>			X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Alishewanella</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Alloiococcus</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Alloprevotella</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Ammoniphilus</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Amycolatopsis</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Anaerococcus</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Anaeromyxobacter</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil)
<i>Aquicella</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Arthrobacter</i>	Rhizosphere, Root, Stem	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Dong et al., 2018 (China); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Arthrospira</i>			X	De Souza et al., 2016 (Brazil)

<i>Asaia</i>	Rhizosphere, Stem	X		Beneduzi et al., 2013 (Brazil)
<i>Asteroleplasma</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Asticcacaulis</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Azoarcus</i>	Rizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Azorhizobium</i>	Rhizosphere, Root, Stem	X		Beneduzi et al., 2013 (Brazil)
<i>Azospirillum</i>	Rhizosphere, Root	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Azovibrio</i>			X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Bacillus</i>	Rhizosphere, Root, Stem, Leaf	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Dong et al., 2018 (China); Yeoh et al., 2016 (Australia); Antonio et al., 2016 (Brazil); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Kruasuwat and Thamchaipenet., 2016 (Thailand); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil); Antunes et al., 2017 (Brazil)
<i>Bacteroides</i>	-			Beneduzi et al., 2013 (Brazil)
<i>Balneimonas</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Bdellovibrio</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Beijerinckia</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Belnapia</i>	Rhizosphere		X	Pisa et al., 2011 (Brazil)
<i>Blastochloris</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Blastomonas</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Bordetella</i>	Stem	X		Beneduzi et al., 2013 (Brazil)
<i>Bosea</i>	Rhizosphere, Stem, Root	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Dong et al., 2018 (China); Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Bradyrhizobium</i>	Rhizosphere, Root, Stem	X	X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Pisa et al., 2011 (Brazil); Rouws et al., 2014 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Brevibacillus</i>	Stem, Leaf	X		Magnani et al., 2010 (Brazil); Antunes et al., 2017
<i>Brevundimonas</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Brochothrix</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Burkholderia</i>	Rhizosphere, Root, Stem, Leaf	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Australia); Antonio et al., 2016 (Brazil); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Mendes et al., 2007 (Brazil); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil); Antunes et al., 2017 (Brazil)
<i>Candidatus</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Capnocytophaga</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Catellatospora</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Caulobacter</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Cellvibrio</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)

<i>Chitinophaga</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Chondromyces</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Chromobacterium</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Chryseobacterium</i>	Rhizosphere, Root, Stem		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Chryseolinea</i>	Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Chthoniobacter</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Citrobacter</i>	Rhizosphere, Stem	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Magnani et al., 2010 (Brazil); Magnani et al., 2013 (Brazil)
<i>Cloacibacterium</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Clostridium</i>	Rhizosphere, Root	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Cohnella</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Collimonas</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Comamonas</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Conexibacter</i>	Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Corynebacterium</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Crocinitomix</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Cryocola</i>	Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Cupriavidus</i>	Rhizosphere, Root, Stem		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Curtobacterium</i>	Rhizosphere, Root, Stem	X	X	Magnani et al., 2010 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Curvibacter</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Cytophaga</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Dactylosporangium</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Dechloromonas</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Desemzia</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Devosia</i>	Rhizosphere, Root		X	Dong et al., 2018 (China); Yeoh et al., 2016; De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Dietzia</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Dokdonella</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Duganella</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Dyadobacter</i>	Rhizosphere, Root	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Dyella</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Edaphobacter</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Eikenella</i>	Root			Yeoh et al., 2016 (Australia)

<i>Emticicia</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Enhydrobacter</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Ensifer</i>	Rhizosphere, Root		X	Dong et al., 2018 (China); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Enterobacter</i>	Rhizosphere, Root, Stem, Leaf	X	X	Taulé et al., 2012 (Uruguay); Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Australia); Magnani et al., 2010 (Brazil); Magnani et al., 2013 (Brazil); Rodrigues et al., 2016 (Brazil); Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Erwinia</i>	Root, Stem	X	X	Magnani et al., 2010 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Escherichia</i>	Rhizosphere, Root, Stem	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Ferruginibacter</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil)
<i>Filimonas</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Fimbriimonas</i>			X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Flavisolibacter</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Flavobacterium</i>	Rhizosphere, Root, Stem		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Fluviicola</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Frankia</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Frateuria</i>	Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Fusobacterium</i>	Rhizosphere, Root, Stem		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Gemella</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Gemmata</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Gemmatimonas</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil)
<i>Geobacter</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Geodermatophilus</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Geothrix</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Gluconacetobacter</i>	Rhizosphere, Root, Stem, Leaf	X		Beneduzi et al., 2013 (Brazil), Antonio et al., 2016 (Brazil)
<i>Gluconobacter</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Glycomyces</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Gordonia</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Gynumella</i>	Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Haemophilus</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Herbaspirillum</i>	Rhizosphere, Root, Stem	X	X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Antunes et al., 2017
<i>Hydrogenophilus</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Hydrotalea</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)

<i>Hylemonella</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Hyphomicrobium</i>	Rhizosphere, Root		X	Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Iamia</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Inquilinus</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Janibacter</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Janthinobacterium</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Jatrophihabitans</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Kaistia</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Kaistobacter</i>	Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Kibdelosporangium</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Kitasatospora</i>	Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Klebsiella</i>	Root, Stem, Leaf	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Magnani et al., 2010 (Brazil); Magnani et al., 2013 (Brazil); Antonio et al., 2016 (Brazil); Rodrigues et al., 2016 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Kosakonia</i>	Root, Leaf	X		Antonio et al., 2016 (Brazil); Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand)
<i>Kribbella</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Ktedonobacter</i>	Rhizosphere		X	Pisa et al., 2011 (Brazil)
<i>Kurthia</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Labrys</i>	Rhizosphere, Root, Stem		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Lactobacillus</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Lactococcus</i>	Stem	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Lechevalieria</i>	Rhizosphere		X	Pisa et al., 2011 (Brazil)
<i>Legionella</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Lentzea</i>	Root		X	Dong et al., 2018 (China)
<i>Leptothrix</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Leuconostoc</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Listeria</i>	Stem	X		Beneduzi et al., 2013 (Brazil)
<i>Luteibacter</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Luteimonas</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Luteolibacter</i>	Root		X	Dong et al., 2018 (China); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Lysinibacillus</i>	Root	X		Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand)
<i>Lysobacter</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Massilia</i>	Rhizosphere, Root, Stem		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Pisa et al., 2011 (Brazil)
<i>Mesorhizobium</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)

<i>Methylibium</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Methylobacterium</i>	Rhizosphere, Root, Stem, Leaf	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Austrália); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Antunes et al., 2017
<i>Methylocella</i>	Root, Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Microbacterium</i>	Rhizosphere, Root, Stem	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Austrália); Mendes et al., 2007 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Microbispora</i>	Root	X		Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand)
<i>Micrococcus</i>	Root	X		Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand)
<i>Micromonospora</i>	Root	X		Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand)
<i>Mucilaginibacter</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Mycobacterium</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Mycoplana</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Mycoplasma</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Neisseria</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Neorhizobium</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Nevskia</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Niastella</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Nitrospira</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Nocardia</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Nocardioides</i>	Rhizosphere, Root, Stem		X	Dong et al., 2018 (China); Yeoh et al., 2016 (Australia); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Novosphingobium</i>	Rhizosphere, Root, Stem	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Austrália); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Ochrobactrum</i>	Rhizosphere, Stem, Leaf	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil), Antonio et al., 2016 (Brazil); Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Odontella</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Ohtaekwangia</i>	Root		X	Dong et al., 2018 (China); Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Opitutus</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Pantoea</i>	Rhizosphere, Root, Stem	X	X	Taulé et al., 2012 (Uruguay); Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Australia); Magnani et al., 2010 (Brazil); Magnani et al., 2013 (Brazil); Rodrigues et al., 2016 (Brazil); Mendes et al., 2007 (Brazil); Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand)

<i>Paenibacillus</i>	Rhizosphere, Root, Stem, Leaf	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Australia), Antonio et al., 2016 (Brazil); Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil); Antunes et al., 2017 (Brazil)
<i>Pandoraea</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Paracoccus</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Parvibaculum</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Pedobacter</i>	Rhizosphere, Root, Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Pedomicrobium</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Pedosphaera</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Pelomonas</i>	Root		X	Dong et al., 2018 (China)
<i>Peptoniphilus</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Phaeosporillum</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Phenylobacterium</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Phyllobacterium</i>	-		X	Dos-Santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Pigmentiphaga</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Pilimelia</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Pimelobacter</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Pirellula</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Planctomyces</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Plesiocystis</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Polaromonas</i>	Root, Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Pontibacter</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Prevotella</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Promicromonospora</i>	-		X	Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Propionibacterium</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Prostheco bacter</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Pseudolabrys</i>	Rhizosphere		X	Pisa et al., 2011 (Brazil)
<i>Pseudomonas</i>	Rhizosphere, Root, Stem, Leaf	X	X	Taulé et al., 2012 (Uruguay); Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Dong et al., 2018 (China); Yeoh et al., 2016 (Australia); Magnani et al., 2010 (Brazil); Magnani et al., 2013 (Brazil); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Mendes et al., 2007 (Brazil); Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil); Antunes et al., 2017
<i>Pseudonocardia</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Pseudoxanthomonas</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Ralstonia</i>	Rhizosphere, Root, Stem		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Ramlibacter</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et

				al., 2011 (Brazil)
<i>Rathayibacter</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Rhanelia</i>	Stem	X		Taulé et al., 2012 (Uruguay)
<i>Rheinheimera</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Rhizobium</i>	Rhizosphere, Root, Stem	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Dong et al., 2018 (China); Yeoh et al., 2016 (Australia); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Rhodanobacter</i>	Root	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil)
<i>Rhodoferax</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Rhodoplanes</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Rhodopseudomonas</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Rickettsia</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Rickettsiella</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Roseateles</i>	Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Rothia</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Rubrivivax</i>	Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Rubroacter</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Saccharibacteria</i>	Root		X	Dong et al., 2018 (China)
<i>Saccharopolyspora</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Salinibacterium</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Salinispora</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Salmonella</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Sediminibacterium</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Serratia</i>	Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Shewanella</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Shinella</i>	Stem	X	X	Taulé et al., 2012 (Uruguay); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Sinomonas</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil)
<i>Sinorhizobium</i>	Rhizosphere	X		Beneduzi et al., 2013 (Brazil)
<i>Solirubrobacter</i>			X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Sphingobacterium</i>	Rhizosphere	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Sphingobium</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Sphingomonas</i>	Rhizosphere, Root, Stem	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Dong et al., 2018 (China); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Sphingopyxis</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Spirochaeta</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Spirosoma</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Sporocytophaga</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)

<i>Sporosarcina</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Staphylococcus</i>	Root, Stem	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Magnani et al., 2010 (Brazil); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Stenotrophomonas</i>	Rhizosphere, Root, Stem, Leaf	X	X	Taulé et al., 2012 (Uruguay); Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Dong et al., 2018 (China), Antonio et al., 2016 (Brazil); Dos santos et al., 2017 (Brazil); Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Steroidobacter</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Streptococcus</i>	Rhizosphere, Root, Stem		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Dos santos et al., 2017 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Streptomyces</i>	Rhizosphere, Root	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil); Dong et al., 2018 (China); Yeoh et al., 2016 (Australia); Kruasuwan and Thamchaipenet., 2016 (Thailand); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Streptophyta</i>	Root		X	Dong et al., 2018 (China)
<i>Sulfurovum</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Swaminathania</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Telmatospirillum</i>	Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Terriglobus</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Terrimonas</i>	Rhizosphere		X	Pisa et al., 2011 (Brazil)
<i>Thermomonas</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Tumebacillus</i>	Rhizosphere		X	Pisa et al., 2011 (Brazil)
<i>Turneriella</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Uliginosibacterium</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Undibacterium</i>	Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia)
<i>Vagococcus</i>	Stem			Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Variovorax</i>	Rhizosphere, Root		X	Yeoh et al., 2016 (Australia); Pisa et al., 2011 (Brazil); De Souza et al., 2016 (Brazil); Armanhi et al., 2016 (Brazil)
<i>Veillonella</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Verrucomicrobia</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Vibrio</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Wolbachia</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)
<i>Xanthobacter</i>	Root, Stem	X	X	Beneduzi et al., 2013 (Brazil);
<i>Xanthomonas</i>	Stem	X		Taulé et al., 2012 (Uruguay); Beneduzi et al., 2013 (Brazil)
<i>Yersinia</i>	Stem		X	Dos santos et al., 2017 (Brazil)
<i>Yonghaparkia</i>	-		X	De Souza et al., 2016 (Brazil)

**CAPÍTULO 2 – SELEÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO
PARA APLICAÇÃO EM CULTIVOS DE CANA-DE-AÇÚCAR**

1 INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira apresenta um alto consumo de fertilizantes, sendo o quarto maior consumidor mundial. O país permanece dependente da disponibilidade e dos preços do mercado internacional, uma vez que a produção nacional de fertilizantes supre aproximadamente 38,1% do mercado (ANDA, 2012). Além dos aspectos econômicos, problemas ambientais podem ser parcialmente atribuídos ao uso indiscriminado de fertilizantes industrializados como a contaminação da água e do solo, a diminuição da biodiversidade nos agroecossistemas, o aparecimento de problemas fitossanitários, entre outros. Neste sentido, o setor agropecuário brasileiro pode sofrer grande impacto em médio prazo, pela continuidade da dependência de grandes quantidades de insumos importados e produzidos como base na cadeia do petróleo (DIAS, 2009). A alternativa a este cenário é o desenvolvimento de tecnologias adaptadas ao ambiente de produção nacional, que busquem a diminuição e/ou o aumento da eficiência do uso destes insumos.

Neste contexto, a utilização de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) em ambientes agrícolas se apresenta como uma alternativa frente ao uso de fertilizantes químicos, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável e de menor impacto ambiental (HERRMANN; LESUEUR, 2013). Essas bactérias se associam a diferentes espécies de plantas em ambientes naturais, e sua principal característica é favorecer o desenvolvimento vegetal por meio de mecanismos tais como: a fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de fitormônios, solubilização de fósforo, o controle biológico de fitopatógenos (DOBELARE; VANDERLEYDERN; OKON, 2003), entre outros. Incrementos de produtividade e de acúmulo de nutrientes em plantas que receberam inoculação com BPCVs são vastamente relatados pela literatura (OLIVEIRA et al., 2006; ADESEMOYE et al., 2008; TAULE et al., 2012; SAIKIA et al., 2012).

Dentre as culturas que se beneficiam com a inoculação de BPCV, a cana-de-açúcar apresenta respostas positivas à interação com esses microrganismos. Estudos demonstram que bactérias inoculadas em cana-de-açúcar podem estimular o crescimento das plantas e aumentar a produtividade das culturas devido às diferentes propriedades de promoção do crescimento (OLIVEIRA et al., 2006; TAULÉ et al., 2011; SCHULTZ et al., 2016, 2017). Tem sido relatado, por exemplo, que as bactérias associadas à cana-de-açúcar podem fornecer até 70% de nitrogênio via FBN (URQUIAGA et al., 2011). Considerando a inserção da tecnologia

de inoculação ao sistema de produção de cana-de-açúcar, a inoculação com essas bactérias pode diminuir em até 50 mil toneladas o uso de fertilizante nitrogenado aplicado anualmente nesta cultura (UNICA, 2009). A redução do uso de fertilizantes minerais, associada a uma maior eficiência na absorção dos nutrientes pelas plantas cultivadas, são metas possíveis de serem atingidas pela exploração e utilização de microrganismos eficientes na promoção do desenvolvimento de plantas (DOBBELAERE et al., 2003; LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009).

A introdução de BPCV em sistemas agrícolas é realizada pela aplicação de inoculantes e para a comercialização deste produto no Brasil estes precisam ser registrados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Uma formulação inoculante de excelente qualidade é o resultado de um processo polifásico e multidisciplinar que requer várias etapas até a obtenção de um produto comercial. A seleção de estirpes eficientes é feita com base em estudos *in vitro*, que permitem a identificação e caracterização preliminar das bactérias, bem como ensaios de eficiência agrônômica em casa de vegetação e campo, para validação das estirpes como BPCVs (SINGH et al., 2017).

Neste contexto, este estudo tem como objetivo caracterizar os isolados de BPCV provenientes da coleção de cultura do laboratório de bioquímica molecular da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil, e avaliar a eficiência agrônômica destes por meio de ensaios de inoculação em diferentes variedades de cana-de-açúcar visando à obtenção de estirpes com alto potencial biotecnológico para o desenvolvimento de biofertilizantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Eficiência das bactérias na promoção do crescimento radicular do Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench)

O objetivo desse ensaio foi selecionar as bactérias que possuem maior potencial em atuar na promoção do crescimento vegetal, por meio de experimentos de inoculação *in vivo*. O ensaio foi realizado seguindo as prescrições existentes nas regras para a análise de sementes (BRASIL, 1992), com modificações.

A identificação taxonômica dos isolados (capítulo 1) permitiu excluir alguns gêneros de bactérias controversos quanto ao uso seguro como produto biotecnológico. Dessa forma, foram utilizados 10 gêneros bacterianos (32 estirpes) para essa etapa do trabalho (Tabela 1). Devido à dificuldade de utilizar a cana-de-açúcar em testes sob condições de laboratório, foram utilizadas duas cultivares de sorgo (Podium - silageiro e SHS 410 - granífero) para a seleção inicial das bactérias. O sorgo foi escolhido por ser uma planta de pequeno porte, da mesma família (Poaceae) da cana-de-açúcar e ainda, por ser uma espécie vegetal filogeneticamente próxima à cana-de-açúcar.

Tabela 1. Codificação e gêneros das bactérias utilizadas no experimento.

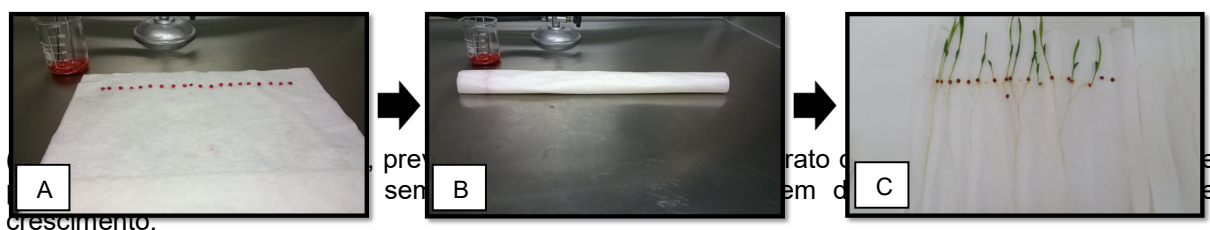
Gêneros selecionados	Isolados	Código
<i>Acinetobacter</i> sp.	3	113 - 115 - 116
<i>Bacillus</i> sp.	7	28 - 112 - 114 - 145 - 150 - 166
<i>Gluconacetobacter</i> sp.	1	109
<i>Paenibacillus</i> sp.	1	111
<i>Pantoea</i> sp.	5	155 - 156 - 157 - 165 - 171
<i>Pseudomonas</i> sp.	8	117 - 120 - 121 - 126 - 128 - 136 - 138 - 159
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	1	134
<i>Rhizobium</i> sp.	3	27 - 70 - 142
<i>Sphingomonas</i> sp.	2	163 - 168
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	1	118

Para o ensaio, as sementes foram superficialmente desinfestadas por imersão em solução de etanol 70% (v/v) por 30 seg, seguida de imersão em solução de H₂O₂ 1% (v/v) por 3 min e finalmente lavadas por seis vezes com água deionizada estéril.

Os isolados foram crescidos individualmente em meio DYGS líquido (RODRIGUES NETO et al., 1986) por 24 h em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C ± 2°C. A densidade final de células foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. Em seguida, as bactérias foram inoculadas sobre as sementes de sorgo na concentração de 1×10^6 células por semente. As sementes inoculadas foram distribuídas em substrato de papel “germitest”, previamente umedecidos com água deionizada estéril, formando 4 unidades experimentais com 20 sementes para cada repetição. Os tratamentos foram acondicionados em saco plástico de polipropileno e deixados em câmara de germinação a 28 °C ± 2°C, com fotoperíodo de 16 h e 8 h. Como controle, foram utilizadas sementes que não receberam inoculação.

Após sete dias foram realizadas as seguintes avaliações para determinação dos efeitos promotores de crescimento, tomando a raiz como parâmetro: diâmetro, profundidade, número máximo, área radicular, perímetro, comprimento específico, área superficial, comprimento médio, volume, massa seca. As medidas foram avaliadas utilizando-se o software GiA Roots (GALKOVSKIY et al., 2012). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F, seguido do teste de Scott-Knott para comparação de médias ($p \leq 0,05$). Também foi realizada análise de componentes principais (Principal Component Analysis - PCA). As análises estatísticas foram realizadas no programa R versão 3.2.1.

Figura 1. Esquema do experimento para avaliar o desenvolvimento inicial de plântulas de sorgo inoculadas com bactérias, tomando a raiz como parâmetro.



2.2 Experimento em Casa-de-Vegetação I: efeito dos isolados sobre o desenvolvimento de cana-de-açúcar

Os isolados com potencial para o desenvolvimento de um inoculante foram avaliados quanto aos efeitos sobre o desenvolvimento de cana-de-açúcar. As bactérias utilizadas neste experimento foram previamente selecionadas com base

nos resultados de desenvolvimento inicial de raízes de sorgo inoculadas com diferentes estirpes (tópico 2.1).

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação da UEL-Londrina/PR (23° 20' 31" S, 51° 12' 38" W), no período de dezembro de 2015 a fevereiro de 2016 sob delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos pela inoculação de 20 bactérias, três estirpes padrões, controle sem inoculação com aplicação de N (controle 2 – C2), e controle sem inoculação com restrição de N (controle 1 – C1) (Tabela 2). As diferentes doses de nitrogênio foram obtidas pela aplicação semanal de solução nutritiva completa de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950). Todos os tratamentos inoculados e o controle C1 receberam solução nutritiva com limitação de nitrogênio (0,1 mg.L⁻¹ N), enquanto que o C2 recebeu a solução nutritiva completa (1 mg.L⁻¹ N). A variedade de cana-de-açúcar utilizada no ensaio foi RB 966928, cedida pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético- RIDESA – UFPR. Foram utilizados toletes de 10 cm de comprimento contendo apenas uma gema.

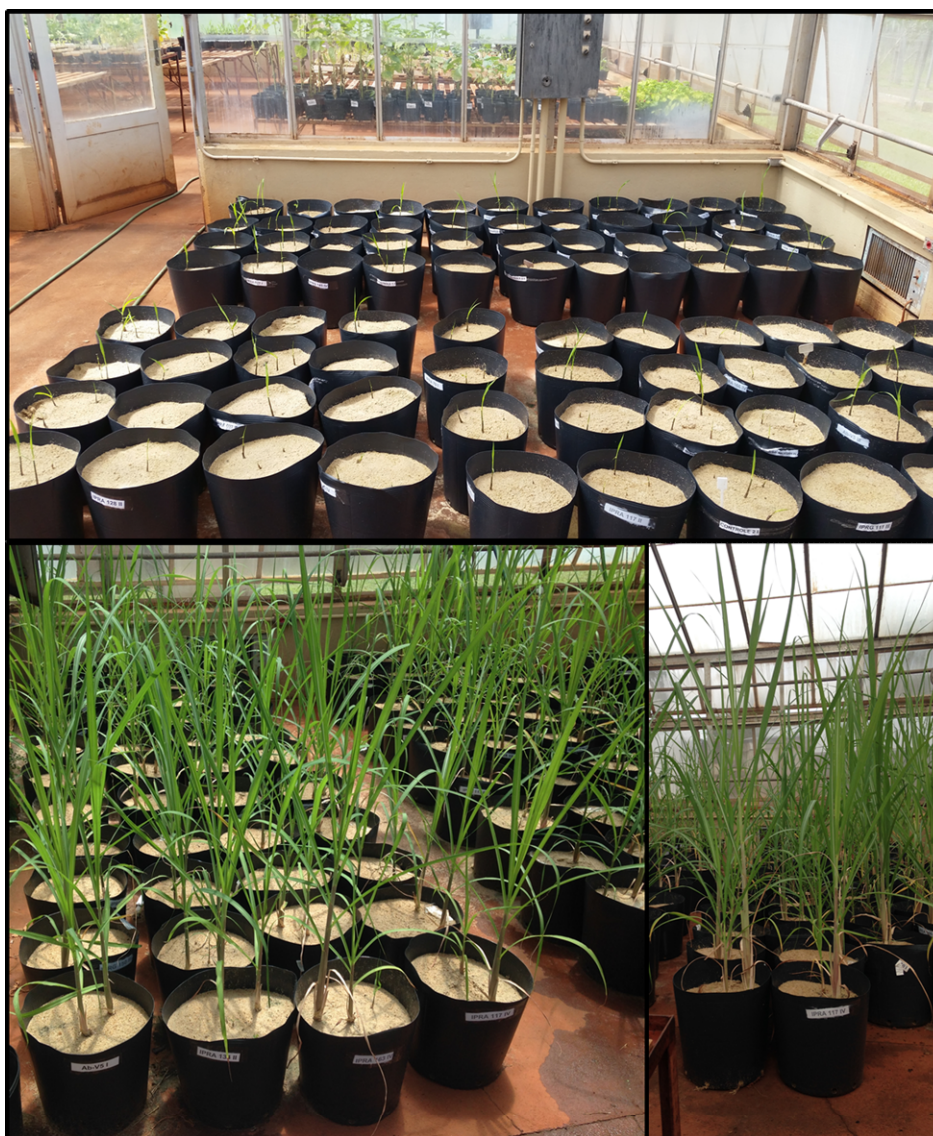
O ensaio foi conduzido em vasos de 12 kg utilizando apenas areia lavada como substrato. Para a obtenção do inóculo, as bactérias foram cultivadas individualmente em meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) líquido por 24 – 48 h horas sob agitação constante (180 rpm) a 28 °C ± 2°C. A densidade final de células em cada cultivo foi ajustada à DO (densidade óptica) de 0,4 em espectrofotômetro (600 nm). No momento do plantio, foram distribuídos cinco toletes por vaso procedendo a inoculação de 1 mL do inóculo, respectivo para cada bactéria, em cada gema. Após 15 dias da implantação do experimento, foi realizado desbaste deixando apenas duas plantas por vaso.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos utilizados no experimento.

	Tratamentos	Doses de N aplicadas como solução nutritiva
Estirpes inoculadas individualmente	<i>Acinetobacter sp.</i> (113, 116)	Solução com restrição de N*
	<i>Bacillus sp.</i> (114, 145, 150, 166)	
	<i>Gluconacetobacter sp.</i> (109)	
	<i>Paenibacillus sp.</i> (111)	
	<i>Pantoea sp.</i> (155)	
	<i>Pseudomonas sp.</i> (117, 120, 121, 128, 136, 138)	
	<i>Pseudoxanthomonas sp.</i> (134)	
	<i>Rhizobium sp.</i> (27, 70, 142)	
	<i>Sphingomonas sp.</i> (163)	
Estirpes padrões	<i>G. diazotrophicus</i> (BR 11281)	Solução com restrição de N*
	<i>A. brasilense</i> (Ab-V5)	
	<i>H. seropedicae</i>	
Controles sem inoculação	Controle 1 (C1)	Solução com restrição de N*
	Controle 2 (C2)	Solução completa**

*0,1 mg.L⁻¹ de N; **1 mg.L⁻¹ de N.

Figura 2. Imagens dos vasos durante a condução do experimento.



2.2.1 Avaliações

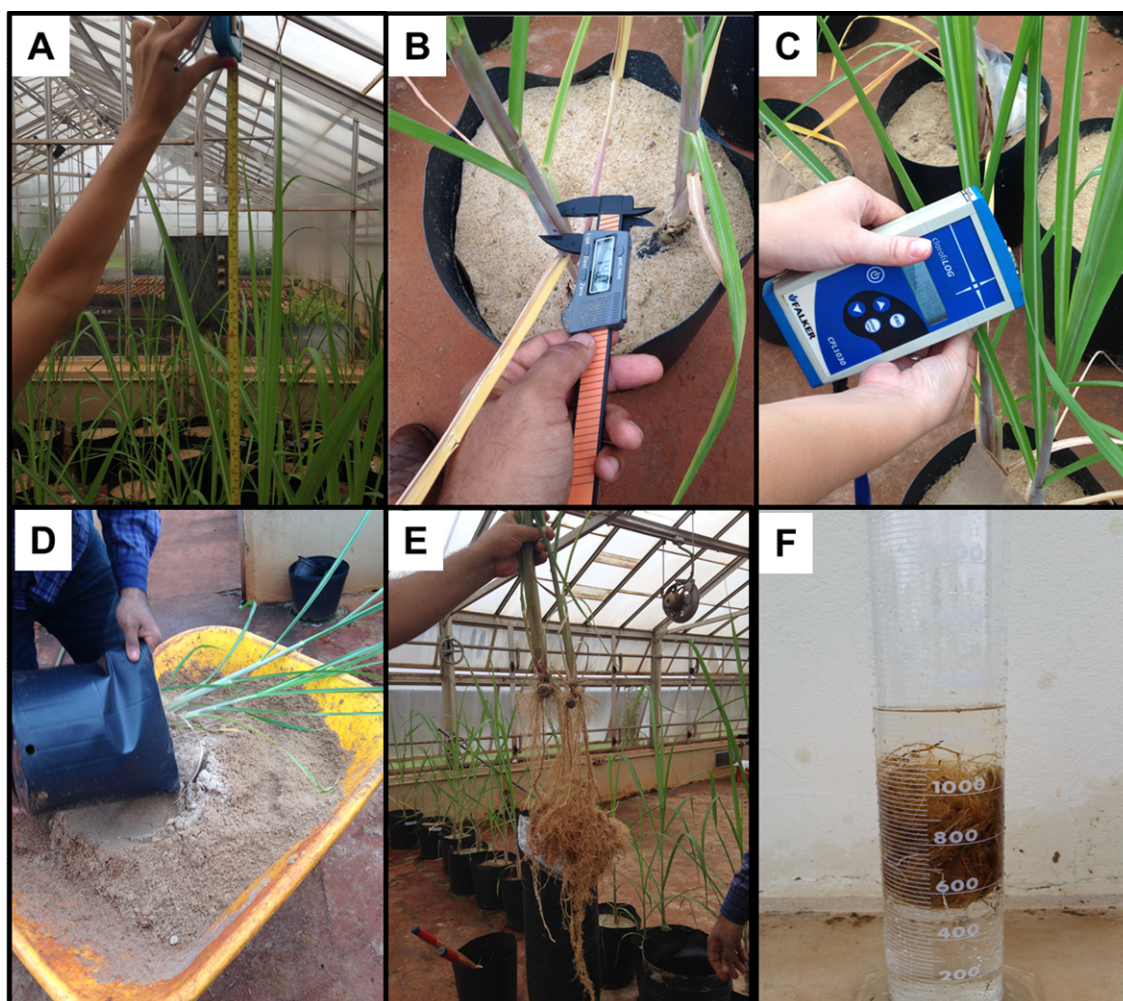
As coletas foram realizadas 90 dias após o plantio e os parâmetros avaliados foram: altura da planta, diâmetro de colmos, teor de clorofila (a e b), volume da raiz (Figura 3), massa seca e teor de nitrogênio da parte aérea e raiz. No momento da coleta, foi avaliada a altura das plantas utilizando-se uma trena (cm). O diâmetro foi mensurado no terço médio do colmo com auxílio de um paquímetro digital (cm) e os teores de clorofila (a e b) foram determinados com o medidor eletrônico ClorofilOG CFL 1030, Faker- Brasil. As raízes foram lavadas em água corrente e seu volume foi determinado por deslocamento de água em proveta de 2 L.

Os tecidos vegetais (parte aérea e raiz) foram secos em estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para determinação da massa de material seco. Posteriormente, as amostras foram

moídas e submetidas à digestão sulfúrica, seguida de destilação e titulação pelo método de semi-micro Kjeldahl (TEDESCO et al., 1995) para determinação do N total. O teor de N nos tecidos foi expresso em mg g^{-1} de massa seca.

Os dados foram submetidos à análise de variância com aplicação do teste F, e caso significativo foi realizado o teste de Scott-Knott para comparação de médias ($p \leq 0,05$). Também foi realizada uma análise de componentes principais (Principal Component Analysis - PCA). As análises foram realizadas utilizando o programa R versão 3.2.1.

Figura 3. Imagens da desinstalação do experimento em casa-de-vegetação e respectivas avaliações. (A) altura das plantas; (B) diâmetro do colmo; (C) teor de clorofila; (D) coleta da parte aérea e raízes; (E) raízes; (F) volume de raízes.



2.3 Caracterização bioquímica

Durante o período de condução do experimento em casa-de-vegetação (tópico 1.2), realizou-se a caracterização bioquímica das bactérias que foram inoculadas em cana-de-açúcar (Tabela 2). A caracterização bioquímica foi realizada para identificar os potenciais mecanismos de promoção do crescimento vegetal e associá-los com os resultados dos ensaios de inoculação em cana-de-açúcar.

2.3.1 Produção de compostos indólicos

A produção de compostos indólicos foi determinada por colorimetria segundo Gordon e Weber (1951), modificado por Minamisawa et al. (1991). Para o ensaio, os isolados foram crescidos individualmente em meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) líquido por 24 - 48 h em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C ± 2°C. Após esse período, os cultivos foram ajustados a uma DO de 0,3 a 600 nm, e alíquotas de 200 µL foram inoculadas em 10 mL de meio (DYGS) na ausência e presença de 100 µg.mL⁻¹ de L-triptofano (precursor da biossíntese de AIA), em triplicata. Os frascos inoculados foram incubados por 72 h sob agitação a 180 rpm e 28 °C ± 2°C. Após o cultivo, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 min a 4 °C, e o extrato livre de células (ELC) foi utilizado para quantificação de compostos indólicos. Para a reação, foram adicionadas duas partes do reagente de Salkowski (FeCl₃ 0,01 mol L⁻¹, em 35% de HClO₄) para uma parte do ELC e após 25 min em ambiente escuro foram realizadas as leituras de absorvância em espectrofotômetro a 530 nm. A quantificação de compostos indólicos no ELC de cada isolado foi determinada a partir de uma curva padrão preparada com concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 µg.mL⁻¹ de AIA sintético.

2.3.1.1 Determinação de proteínas

O teor de proteínas foi determinado com o objetivo de normalizar as leituras de produção de AIA. Para determinação de proteínas, a biomassa bacteriana no precipitado foi lavada três vezes em solução salina (0,85 % p/v), posteriormente ressuspensa em 2 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹ para a lise das células, seguindo incubação em banho maria a 90 °C ± 2 °C por 30 minutos. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976) utilizando-se 0,1 mL do lisado. A curva padrão foi previamente preparada com concentrações de 0 a 250 µg.mL⁻¹ de soroalbumina bovina.

2.3.2 Solubilização de fosfato inorgânico

Foi avaliada a capacidade dos isolados em solubilizar os fosfatos inorgânicos de ferro ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e de alumínio (AlPO_4) usando o meio de cultura líquido NBRIP (METHA; NAUTIYAL, 2001). Para o ensaio, o meio de cultura foi suplementado com $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ou AlPO_4 na concentração final de 1% (m/v) de fósforo (P). O pré-inóculo de cada bactéria foi preparado em meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) líquido com crescimento por 24 - 48 h em agitador orbital a 180 rpm e $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Após esse período, os cultivos foram ajustados a uma DO de 0,3 a 600 nm e alíquotas de 200 μL foram inoculadas em 10 mL do meio NBRIP suplementado com 1% de fósforo (P), em triplicata. O meio NBRIP sem inoculação foi utilizado como controle negativo. Os tubos foram incubados a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 7 dias com agitação constante de 180 rpm. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 9.000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo e posteriormente utilizado para medir o pH e para a análise quantitativa de fósforo solúvel, usando o método fosfomolibidco descrito por Murphy e Riley (1962) modificado. Em tubo de vidro, 1 mL do sobrenadante filtrado foi misturado com 2 mL de uma solução de molibdato de amônio diluída e 20 μL de uma solução de ácido ascórbico 5% (p/v). Após 30 minutos de reação foi medida a absorbância a 660 nm em espectrofotômetro. As vidrarias utilizadas foram previamente lavadas com água deionizada para retirar íons contaminantes. A curva padrão foi construída a partir de uma solução padrão de KH_2PO_4 (25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de P) com concentrações crescentes de 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de P.

2.4 Teste de compatibilidade Bactéria X Bactéria *in vitro*

A partir dos resultados anteriores (itens 2.2 e 2.3), as bactérias que apresentaram maior potencial biotecnológico foram testadas quanto à compatibilidade entre elas, visando o uso conjunto das estirpes em experimentos de inoculação. Antes de iniciar o ensaio, foram testadas 3 diferentes metodologias para avaliação de compatibilidade entre as bactérias estudadas (CUESTA et al., 2012; DRECHSEL, 2011; JESUS, 2013). Todas as metodologias apresentaram resultados similares, dessa forma, o método de confrontação direta, que consiste no co-cultivo das bactérias em meio de cultura sólido (JESUS, 2013), foi escolhido para realização do experimento.

Um plug de ágar contendo colônias de uma das bactérias testadas, previamente crescida em meio DYGS sólido ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), foi adicionado no centro de uma placa de petri estriada com outra estirpe bacteriana momentos antes de iniciar o co-cultivo. As placas foram incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias e a ocorrência de antagonismo foi verificada pela formação de halo de inibição. As bactérias analisadas, bem como a confrontação das mesmas durante o co-cultivo estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3 Combinação das estirpes bacterianas para o ensaio de compatibilidade.

Bactéria 1		Bactéria 2
<i>Acinetobacter sp.</i> (113)	X	<i>Rhizobium sp</i> (27)
<i>Acinetobacter sp.</i> (113)	X	<i>Pseudomonas sp.</i> (121)
<i>Pseudomonas sp.</i> (121)	X	<i>Rhizobium sp</i> (27)
<i>Gluconacetobacter sp.</i> (109)	X	<i>Acinetobacter sp.</i> (113)
<i>Gluconacetobacter sp.</i> (109)	X	<i>Rhizobium sp</i> (27)
<i>Gluconacetobacter sp.</i> (109)	X	<i>Pseudomonas sp.</i> (121)

2.5 Experimento em Casa-de-Vegetação II: efeito dos isolados sobre o desenvolvimento de cana-de-açúcar

A partir dos resultados de compatibilidade, foram definidas sete combinações de bactérias para a realização deste experimento, visando uma certificação preliminar das estirpes promissoras ao desenvolvimento de um inoculante.

O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação da UEL-Londrina/PR ($23^{\circ} 20' 31''$ S, $51^{\circ} 12' 38''$ W), de novembro de 2016 a janeiro de 2017, sob delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os tratamentos foram constituídos pela inoculação de sete combinações de bactérias, utilização do inoculante comercial AzoTotal, controle sem inoculação com aplicação de solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) limitante de nitrogênio ($0,1\text{ mg.L}^{-1}$ N) (C1), e controle sem inoculação com aplicação de solução nutritiva completa (1 mg.L^{-1} N) (C2) (Tabela 4). Foram utilizadas três variedades de cana-de-açúcar cedidas pela Companhia Melhoramentos Norte do Paraná (CMNP): RB835054,

RB867515 e RB966928. Para o plantio, foram usados toletes de 10 cm de comprimento contendo apenas uma gema.

O ensaio foi conduzido em vasos de 12 Kg utilizando uma mistura de areia e solo (2:1) como substrato. Os inóculos bacterianos foram obtidos a partir do cultivo individual de cada bactéria, conforme os parâmetros de crescimento descritos no item 2.2. A densidade final de células em cada cultivo foi ajustada à D.O de 0,4 em espectrofotômetro (600 nm) e os cultivos foram misturados (1:1) conforme as combinações de bactérias previamente determinadas (Tabela 4). No momento do plantio, foram distribuídos cinco toletes por vaso procedendo a inoculação de 1 mL do inóculo, correspondente a cada tratamento, em cada gema. Durante a condução do ensaio, os vasos receberam aplicação de solução nutritiva de Hoagland semanalmente. Os tratamentos inoculados e o C1 receberam solução nutritiva limitante em N, enquanto que o C2 recebeu a solução nutritiva completa. Após 15 dias da implantação do experimento, foi realizado desbaste deixando-se apenas duas plantas em cada vaso.

Tabela 4. Descrição dos tratamentos utilizados no experimento.

	Tratamentos	Doses de N aplicadas como solução nutritiva
Combinções das estirpes	<i>Gluconacetobacter sp</i> (109) + <i>Acinetobacter sp</i> (113)	
	<i>Gluconacetobacter sp</i> (109) + <i>Rhizobium sp</i> (27)	
	<i>Gluconacetobacter sp</i> (109) + <i>Pseudomonas sp</i> (121)	
	<i>Acinetobacter sp</i> (113) + <i>Rhizobium sp</i> (27)	Solução com restrição de N*
	<i>Acinetobacter sp</i> (113) + <i>Pseudomonas sp</i> (121)	
	<i>Pseudomonas sp</i> (121) + <i>Rhizobium sp</i> (27)	
	Mistura das 4 bactérias	
Inoculante Comercial AzoTotal	<i>Azospirillum brasilense</i> (Ab-V5 + Ab-V6)	Solução com restrição de N*
Controles sem inoculação	Controle 1 (C1)	Solução com restrição de N*
	Controle 2 (C2)	Solução completa**

*0,1 mg.L⁻¹ de N; **1 mg.L⁻¹ de N. O inoculante comercial AzoTotal foi cedido pela empresa Total biotecnologia.

Figura 4. Imagens dos vasos durante a condução do experimento.



2.5.1 Avaliações

As coletas foram realizadas 90 dias após o plantio, e os parâmetros avaliados foram: altura de plantas, diâmetro de colmos, volume de raízes, massa seca da parte aérea e raízes, e teores foliares de nutrientes (N, P e K). Amostras de raízes também foram utilizadas para determinação de N. As análises foram realizadas conforme descritas no item 2.2.1. Em adição, medidas de fluorescência da clorofila a foram realizadas utilizando o fluorômetro OS1p (Opti-Sciences, Hudson, NH, USA). Superfícies adaxiais foliares foram adaptadas ao escuro (20 min) usando cliques FL-DC (Opti-Sciences). Em sequência, a fluorescência mínima (F_0) foi medida usando uma luz fraca modulada, e a fluorescência máxima (F_m) foi determinada após um pulso de luz saturante ($8250 \mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). O rendimento quântico máximo da fotoquímica do fotossistema II foi expresso como $F_v / F_m = (F_m - F_0) / F_m$. As leituras foram realizadas sete dias antes das coletas entre às 8 h e 10 h da manhã.

2.6 Caracterização metabólica das estirpes quanto ao uso de diferentes fontes de carbono

Essa etapa do trabalho teve como objetivo caracterizar a diversidade metabólica das estirpes bacterianas, candidatas ao desenvolvimento de formulações inoculantes, por meio da análise de uso de diferentes fontes de carbono. As estirpes avaliadas foram as mesmas do experimento anterior (item 1.5): *Acinetobacter sp.* (113), *Gluconacetobacter sp.* (109), *Pseudomonas sp.* (121) e *Rhizobium sp.* (27).

A capacidade de uso de diferentes fontes de carbono pelas estirpes foi verificada em meio de cultura líquido BH (BUSHNELL; HASS, 1941) acrescido dos substratos testados. Este meio de cultura é constituído apenas de fonte de nitrogênio e suplementos minerais, possibilitando adicionar fontes específicas de carbono a serem estudadas.

As estirpes foram crescidas individualmente em meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) líquido por 24 - 48 h em agitador orbital a 180 rpm e 28 °C ± 2°C. Após esse período, os cultivos foram ajustados a uma DO de 0,4 a 600 nm, e alíquotas de 1mL foram inoculadas em 100 mL de meio de cultura BH acrescido, separadamente, das fontes de carbono analisadas: glicose, açúcar cristal, maltodextrina, manitol, melação de cana-de-açúcar, ácido málico e glicerol, em triplicata para cada estirpe. Os frascos inoculados foram incubados por 24 horas, em condição de agitação de 180 rpm a 28 °C ± 2°C e ao final do cultivo foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) pelo método da gota (24h após a inoculação) (MILES; MISRA, 1938). Para contagem de UFC, amostras de 1,0 mL dos cultivos foram diluídas em série (1/10, v/v) em solução salina (NaCl 0,85%), e alíquotas de 30 µL das diluições 10⁻⁴ a 10⁻⁷ foram inoculadas em meio DYGS sólido (RODRIGUES NETO et al., 1986). As placas foram divididas em seis setores, utilizando-se dois setores da placa por diluição. Cada diluição foi inoculada em três placas distintas, obtendo-se, seis repetições por diluição, para cada amostra. Após a inoculação, as placas foram incubadas em estufa a 30 ± 2 °C por 24 h, sendo a seguir efetuada a contagem do número de colônias em cada diluição. Os resultados foram expressos em número de unidades formadoras de colônia por mL de cultivo (UFC.mL⁻¹).

Após a avaliação dos resultados de UFC, o experimento foi repetido utilizando apenas as fontes de carbono que proporcionaram maior contagem de células para

cada estirpe avaliada. As condições de cultivo foram as mesmas descritas a cima. Durante o cultivo, foram realizadas leituras de DO em espectrofotômetro a 600 nm e determinações de pH em intervalos de tempo de 6h, 12h e 24h.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Eficiência das bactérias na promoção do crescimento radicular do Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench)

O sorgo foi usado como planta modelo para os ensaios iniciais de seleção das estirpes bacterianas. A escolha do sorgo como planta modelo justifica-se por ser da mesma família da cana-de-açúcar, possuir proximidade filogenética com a mesma e ainda por ser uma planta de pequeno porte, facilitando os estudos em condições de laboratório. Estudos de análise comparativa entre os genomas de sorgo e cana-de-açúcar já demonstraram que os cromossomos dessas espécies apresentam elevada colinearidade (DUFOR et al., 1997; MING et al., 1998; WANG et al., 2010). Wang et al. (2010), por exemplo, verificaram que regiões gênicas de cana-de-açúcar compartilham 95, 2% de identidade de sequência com o sorgo.

Dos 69 isolados sequenciados (Capítulo 1), foram utilizados 32 (10 gêneros) para avaliar a influência de cada um no desenvolvimento inicial das raízes de sorgo. Os gêneros selecionados foram: *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Pantoea* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pseudoxanthomonas* sp., *Rhizobium* sp., *Stenotrophomonas* sp. e *Sphingomonas* sp. Estudos já demonstraram que essas bactérias possuem diferentes mecanismos de promoção do crescimento de plantas e são encontradas em associação com diversas culturas (ARRUDA et al., 2013; BENEDUZI et al., 2013b; BERTANI et al., 2016; GOVINDASAMY et al., 2017; HABIBI et al., 2014; KHAN et al., 2014; KRUASUWAN; THAMCHAIPENET, 2016; MONTAÑEZ et al., 2012; MOREIRA et al., 2016; PATIL; SHINDE, 2014; PEREIRA et al., 2011; VERMA et al., 2016). Embora a maioria dos demais gêneros identificados no presente trabalho (*Burkholderia* sp., *Dyella* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Neospora* sp., *Serratia* sp. e *Staphylococcus* sp.) apresentem espécies promotoras do crescimento de plantas, não são considerados seguros para uso em produtos biológicos, uma vez que essas bactérias também podem causar infecções humanas graves (GARCÍA-FRAILE et al., 2012). Dessa

forma, deve ser dada preferência aos isolados bacterianos pertencentes a grupos filogenéticos que não possuam histórico de patogenicidade (OLIVEIRA et al., 2014).

Os resultados das avaliações biométricas das duas cultivares de Sorgo inoculadas encontram-se nas tabelas 5 (Sorgo Podium) e 6 (Sorgo SHS 410). Algumas bactérias inoculadas apresentaram efeito positivo no desenvolvimento inicial das raízes, enquanto que outras demonstraram influência negativa quando comparadas com o tratamento controle (sem inoculação).

De maneira geral, as bactérias dos gêneros *Paenibacillus* sp. (estirpes 111), *Acinetobacter* sp. (estirpe 113), *Bacillus* sp. (estirpes 114, 147 e 166), *Pseudomonas* sp. (estirpes 136), *Rhizobium* sp. (estirpe 142) e *Pantoea* sp. (estirpes 157 e 171) foram as que apresentaram maiores incrementos no desenvolvimento inicial das raízes do Sorgo Podium (≥ 5 parâmetros avaliados), demonstrando-se superiores aos demais isolados inoculados e ao controle sem inoculação (Tabela 5). A estirpe 142 (*Rhizobium* sp.) foi a que apresentou maior eficiência, proporcionando um aumento significativo de 25% para profundidade média da raiz (PfMR), 30,8% para o máximo número de raiz (MNR), 35% para área radicular (AR), 48% para o comprimento específico da raiz (CRE), 61,6% para o comprimento médio da raiz (CMR) e 10,7% para o volume médio das raízes (VMR), comparado ao controle (sem inoculação).

Com relação à inoculação dos microrganismos na cultivar do Sorgo SHS 410, as bactérias que apresentaram melhores respostas à inoculação foram: *Rhizobium* sp. (estirpes 27, 142), *Stenotrophomonas* sp. (estirpe 118), *Pseudomonas* sp. (estirpes 120, 121, 128, 136, 138), *Pseudoxanthomonas* sp. (estirpe 134) e *Bacillus* sp. (estirpes 145 e 150) e (Tabela 6). As estirpes 120, 121, 128 e 138, todas identificadas como *Pseudomonas* sp, propiciaram o maior desenvolvimento das raízes, diferindo significativamente do controle. Houve um aumento de até 39,8% para a variável PfR (estirpe 138), 47,5% para MNR (estirpe 121), 68% para AR (estirpe 138), 60% para CMR (estirpe 120) e 84% para VMR (estirpe 138), comparado ao controle.

Uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada para melhor verificar a influência das estirpes inoculadas no crescimento radicular das linhagens de Sorgo (Figura 6). As duas primeiras dimensões da PCA para Sorgo Podium explicaram 78,7% da variação total, com o componente 1 responsável por 54,50% e o componente 2 por 24,18% da variância. Para o Sorgo SHS 410, as duas primeiras

dimensões explicaram 73,12% da variação total, com o componente 1 responsável por 53,57% e o componente 2 por 19,55% da variância. É possível verificar que do total de 32 estirpes inoculadas nas linhagens de sorgo PODIUM e SHS410, 18 (56,2%) e 15 (46,9%) foram associadas às variáveis analisadas, respectivamente (Figura 6). Considerando as duas linhagens de sorgo, *Pseudomonas* sp. (estirpes 121, 136 e 138), *Bacillus* sp. (150 e 166), *Paenibacillus* sp (estirpe 111), *Rhizobium* sp (estirpe 142) e *Pseudoxanthomonas* sp. (estirpe 134) apresentaram incrementos nas raízes de ambas (Sorgo podium e Sorgo SHS 410). Já as bactérias 109 (*Gluconacetobacter* sp.), 156 (*Pantoea* sp.) e 159 (*Pseudomonas* sp.) não foram relacionadas aos parâmetros avaliados da raiz em nenhuma das cultivares testadas. Estudos têm demonstrado efeitos benéficos dos gêneros *Bacillus* sp, *Pseudomonas* e *Rhizobium* sp. no crescimento do sorgo (BASHA et al., 2013; IDRIS; LABUSCHAGNE; KORSTEN, 2008; KUMAR et al., 2012; LUO et al., 2012; MAREQUE et al., 2015). Mareque et al. (2015), por exemplo, verificaram que isolados de *Rhizobium* sp. e *Pantoea* sp. proporcionaram aumento na altura do caule e no peso seco (raiz e parte aérea) de plantas de Sorgo comparado ao controle sem inoculação. Idris et al. (2008), avaliando a influência de Rizobactérias na promoção do crescimento de sorgo, verificaram que o isolado identificado como *B. cereus* promoveu aumento significativo no crescimento inicial da planta, e o aumento do comprimento radicular foi correlacionado com a produção de AIA *in vitro*.

Mediante esses resultados, foram selecionadas 17 bactérias consideradas promissoras para promoção de crescimento vegetal: *Acinetobacter* sp. (estirpes 113 e 116); *Bacillus* sp. (estirpes 114, 145, 150 e 166); *Paenibacillus* sp. (estirpe 111); *Pantoea* sp. (estirpe 155); *Pseudomonas* sp. (estirpes 120, 121, 128, 136 e 138); *Pseudoxhantomonas* sp. (estirpe 134); *Rhizobium* sp. (estirpes 27 e 142) e *Sphingomonas* sp. (estirpe 163). Para a seleção dos microrganismos, foram considerados aqueles que apresentaram incrementos no desenvolvimento das raízes das duas cultivares de sorgo testadas. Também foram selecionadas três estirpes que apresentaram pouca influência no desenvolvimento das raízes (*Pseudomonas* sp. estirpe 117, *Rhizobium* sp. estirpe 70 e *Gluconacetobacter* sp. estirpe 109). Apesar do gênero *Gluconacetobacter* sp. não ter apresentado efeitos significativos no sistema radicular do sorgo, essa bactéria possui histórico de associação com a cana-de-açúcar e está entre as principais bactérias estudadas

nesta cultura (BALDANI et al., 2002; BODDEY et al., 2003; CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988; JAMES et al., 1994; MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2003).

Figura 5 Linhagens de Sorgo inoculadas com estirpes bacterianas isoladas de cana-de-açúcar. **(A)** raiz de Sorgo SHS410 sem inoculação; **(B)** raiz de Sorgo SHS410 inoculada com *Rhizobium* sp. (27); **(C)** raiz de Sorgo SHS410 inoculada com *Pseudomonas* sp. (120); **(D)** raiz de Sorgo PODIUM sem inoculação; **(E)** raiz de Sorgo PODIUM inoculada com *Rhizobium* sp. (142); **(F)** raiz de Sorgo PODIUM inoculada com *Pseudomonas* sp. (136).

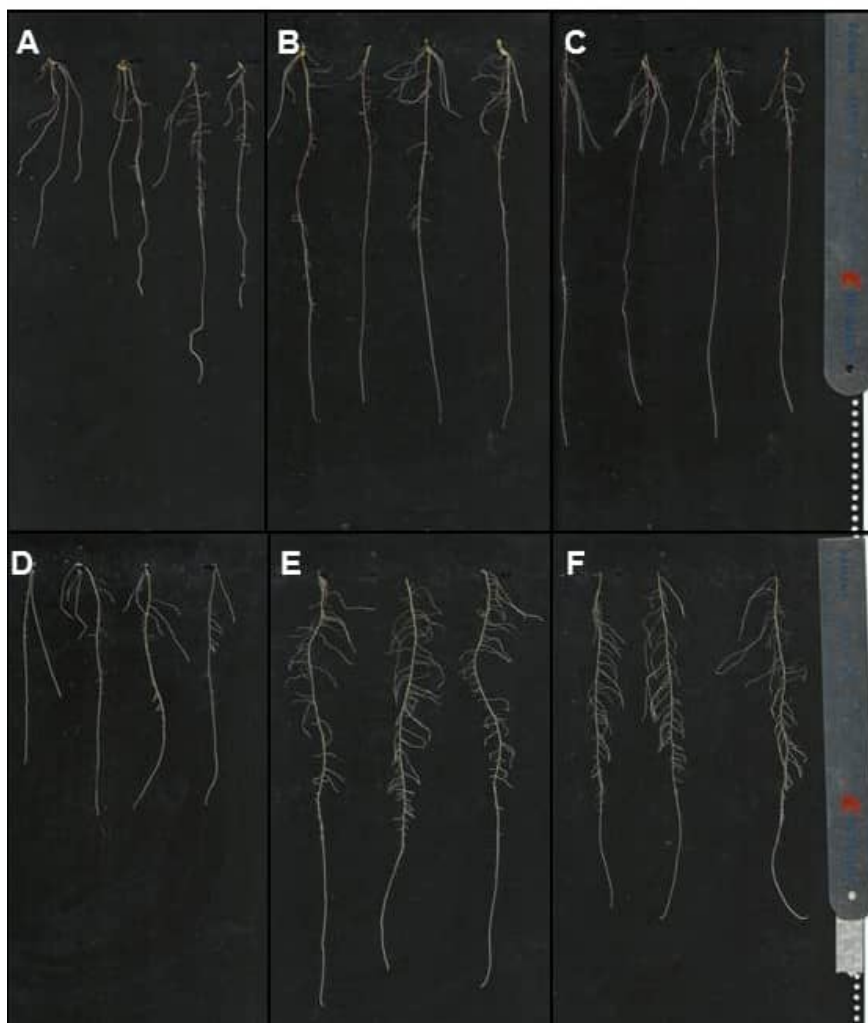


Tabela 5 Avaliação dos efeitos promotores de crescimento de raízes de Sorgo (podium) inoculadas com isolados bacterianos de Cana-de-açúcar.

ISOLADO	GÊNERO	DMR (cm)	PfR (cm)	MNR (n)	AR (cm ²)	PeMR (cm)	CER (cm/cm ³)	ASR (cm ²)	CMR (cm)	VMR (cm ³)	MSR (mg)
27	<i>Rhizobium</i> sp.	0.056 f	14.15 d	2.80 e	1.77 d	76.50 e	351.66 e	6.48 d	38.02 e	0.107 c	34.65 e
28	<i>Bacillus</i> sp.	0.054 d	17.19 a	3.01 e	2.10 c	95.03 d	377.04 e	7.86 c	48.15 d	0.125 b	34.70 e
70	<i>Rhizobium</i> sp.	0.051 b	12.41 f	2.76 e	1.57 d	67.90 e	410.23 d	6.84 d	42.63 e	0.116 b	36.28 e
109	<i>Gluconacetobacter</i> sp.	0.050 a	9.24 g	4.64 a	1.59 d	76.07 e	435.38 d	5.93 d	38.99 e	0.090 c	23.05 e
111	<i>Paenibacillus</i> sp.	0.054 c	15.13 b	3.64 c	2.28 b	96.54 c	366.27 e	8.38 b	49.32 c	0.137 a	46.88 c
112	<i>Bacillus</i> sp.	0.054 b	14.32 d	2.88 e	1.77 d	81.28 e	389.42 e	6.42 d	39.27 e	0.099 c	61.80 a
113	<i>Acinetobacter</i> sp.	0.052 b	17.02 a	3.18 e	2.13 c	100.76 b	411.62 d	7.81 c	49.63 b	0.121 b	48.90 b
114	<i>Bacillus</i> sp.	0.060 g	15.54 a	3.66 b	2.24 c	97.15 b	387.70 e	8.88 a	49.65 b	0.134 b	65.23 a
115	<i>Acinetobacter</i> sp.	0.059 g	13.04 f	2.79 e	1.73 d	74.38 e	347.97 e	6.61 d	36.68 e	0.136 b	41.35 d
116	<i>Acinetobacter</i> sp.	0.055 f	15.05 c	2.84 e	1.83 d	81.94 e	366.86 e	6.70 d	40.25 e	0.107 c	60.80 a
117	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.055 e	13.92 e	1.50 f	1.05 e	45.65 f	384.22 e	3.77 d	22.14 f	0.059 c	28.28 e
118	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	0.052 b	12.83 f	3.01 e	1.48 d	70.03 e	419.81 d	5.38 d	33.90 e	0.081 c	45.83 d
120	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.054 b	13.15 f	1.74 f	1.07 e	48.26 f	391.84 e	3.90 d	23.71 f	0.061 c	35.30 e
121	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.048 a	15.76 a	3.11 e	1.91 c	99.11 b	484.78 c	6.88 d	47.05 d	0.096 c	37.93 e
126	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.045 a	15.74 a	3.67 b	1.87 c	102.66 b	542.48 b	6.73 d	48.83 d	0.089 c	47.80 b
128	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.054 d	13.45 f	3.31 e	1.74 d	79.83 e	395.62 e	6.29 d	38.69 e	0.096 c	56.75 a
134	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	0.046 a	15.62 a	4.14 b	1.92 c	100.96 b	519.60 b	6.97 d	48.95 d	0.101 c	60.48 a
136	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.042 a	15.57 a	4.54 a	2.33 a	141.91 a	634.54 a	8.60 a	69.70 a	0.105 c	40.30 d
138	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.047 a	14.29 d	4.36 a	2.04 c	107.07 b	496.95 c	7.45 c	52.03 b	0.104 c	85.28 a
142	<i>Rhizobium</i> sp.	0.041 a	17.27 a	4.88 a	2.53 a	150.64 a	639.82 a	9.18 a	72.45 a	0.114 b	65.30 a
145	<i>Bacillus</i> sp.	0.050 a	12.06 f	3.79 b	1.66 d	84.89 e	458.47 d	6.05 d	40.99 e	0.087 c	65.80 a
147	<i>Bacillus</i> sp.	0.046 a	14.14 d	4.49 a	2.12 c	119.11 b	544.06 b	7.64 c	56.23 b	0.100 c	69.78 a
150	<i>Bacillus</i> sp.	0.047 a	14.77 c	3.76 b	1.88 c	100.21 b	508.42 b	6.76 d	47.33 d	0.091 c	67.23 a
155	<i>Pantoea</i> sp.	0.049 a	14.59 c	3.99 b	1.94 c	98.81 b	465.21 c	7.12 c	48.23 d	0.102 c	62.03 a
156	<i>Pantoea</i> sp.	0.046 a	9.89 g	3.72 b	1.46 d	79.67 e	530.68 b	5.27 d	37.73 e	0.070 c	34.98 e
157	<i>Pantoea</i> sp.	0.046 a	13.50 f	4.43 a	1.98 c	107.25 b	512.29 b	7.18 c	51.24 b	0.097 c	51.63 a
159	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.049 a	13.30 f	3.17 e	1.59 d	82.11 e	474.72 c	5.72 d	38.65 e	0.079 c	22.33 e
163	<i>Sphingomonas</i> sp.	0.044 a	15.32 a	3.69 b	1.78 d	98.92 b	560.28 b	6.45 d	47.80 d	0.085 c	56.60 a
165	<i>Pantoea</i> sp.	0.046 a	13.38 f	3.77 b	1.80 d	100.41 b	522.18 b	6.59 d	48.44 d	0.089 c	52.00 a
166	<i>Bacillus</i> sp.	0.049 a	13.62 f	5.16 a	2.29 a	117.11 b	479.71 c	8.57 a	58.12 b	0.126 b	70.58 a
168	<i>Sphingomonas</i> sp.	0.049 a	13.80 f	4.08 b	1.66 d	84.84 e	473.53 c	6.00 d	40.68 e	0.085 c	64.00 a
171	<i>Pantoea</i> sp.	0.051 b	16.53 a	3.52 d	2.15 c	102.27 b	414.16 d	7.83 c	50.15 b	0.119 b	46.58 d
	Controle	0.051 b	13.81 f	3.73 b	1.88 c	91.30 d	432.75 d	6.88 d	44.83 d	0.103 c	58.06 a
	C.V	7.12	12.67	15.59	17.93	17.4	8.53	20.94	19.49	28.28	23.43

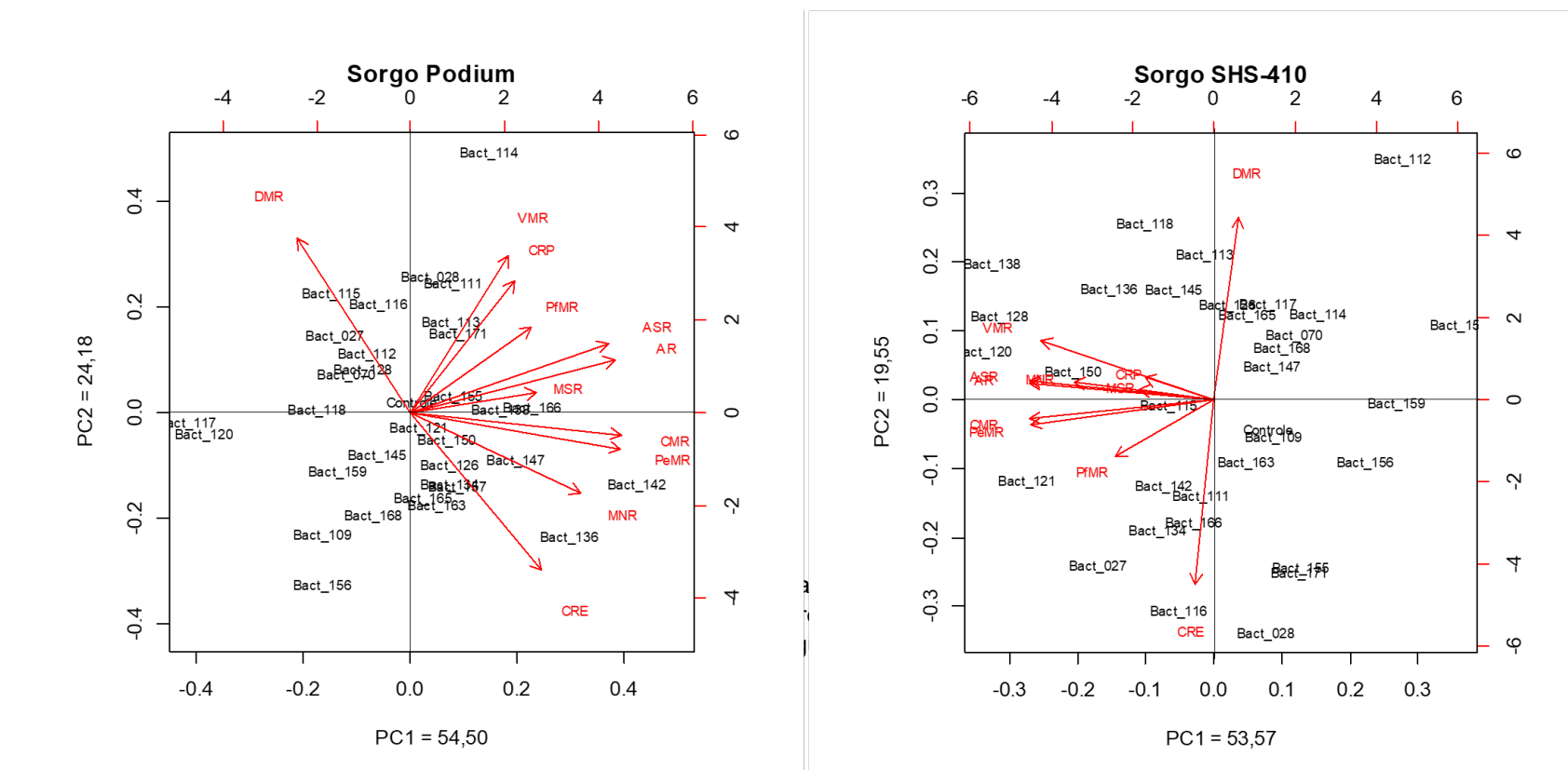
Letras na coluna comparam a médias entre os tratamentos de inoculação pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. DMR (diâmetro médio da raiz), PfMR (profundidade média da raiz), MNR (máximo número de raiz), AR (área radicular), PeMR (perímetro médio da raiz), CER (comprimento específico da raiz), ASR (área superficial da raiz), CMR (comprimento médio da raiz), VMR (volume médio da raiz), MSR (massa seca da raiz).

Tabela 6 Avaliação dos efeitos promotores de crescimento de raízes de Sorgo (SHS 410) inoculadas com isolados bacterianos de Cana-de-açúcar.

ISOLADO	BACTÉRIA	DMR (cm)	PfR (cm)	MNR (n)	AR (cm ²)	PeMR (cm)	CER (cm/cm ³)	ASR (cm ²)	CMR (cm)	VMR (cm ³)	MSR (mg)
27	<i>Rhizobium</i> sp.	0.048 a	17.18 a	3.71 d	2.16 b	101.57 b	467.24 a	8.56 b	56.60 a	0.135 a	86.48 c
28	<i>Bacillus</i> sp.	0.047 a	16.81 a	3.07 f	1.65 c	82.09 e	480.80 a	6.05 c	41.23 d	0.089 b	49.15 d
70	<i>Rhizobium</i> sp.	0.053 b	14.32 c	3.04 f	1.65 c	73.88 g	370.73 d	6.51 c	39.82 d	0.111 b	23.13 d
109	<i>Gluconacetobacter</i> sp.	0.051 a	10.27 e	5.21 a	1.72 c	81.58 e	433.30 c	6.41 c	41.24 d	0.098 b	44.28 d
111	<i>Paenibacillus</i> sp.	0.050 a	11.13 e	4.68 b	1.90 c	92.26 c	459.22 b	7.04 c	46.13 c	0.105 b	90.08 b
112	<i>Bacillus</i> sp.	0.057 d	9.25 e	3.59 d	1.29 c	53.31 h	327.35 d	4.84 c	27.89 g	0.086 b	54.70 d
113	<i>Acinetobacter</i> sp.	0.056 d	13.95 c	3.75 d	2.00 b	87.53 e	366.48 d	7.39 c	44.20 d	0.120 b	62.35 d
114	<i>Bacillus</i> sp.	0.053 b	9.41 e	4.46 c	1.54 c	67.24 h	388.48 d	5.77 c	34.82 f	0.095 b	67.15 c
115	<i>Acinetobacter</i> sp.	0.052 b	16.82 a	3.76 d	2.08 b	94.89 b	403.14 d	7.65 c	48.16 b	0.117 b	50.15 d
116	<i>Acinetobacter</i> sp.	0.048 a	16.69 a	3.66 d	1.94 c	96.44 b	487.09 a	7.33 c	48.90 b	0.110 b	49.25 d
117	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.055 c	15.67 b	3.08 e	1.77 c	74.31 f	371.20 d	6.55 c	38.19 e	0.108 b	53.93 d
118	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	0.055 d	13.27 d	4.21 c	2.05 b	88.46 e	356.30 d	7.98 b	46.67 b	0.138 a	113.70 a
120	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.053 b	16.68 a	4.90 a	2.69 a	126.00 a	400.27 d	10.24 a	64.28 a	0.162 a	78.53 c
121	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.050 a	14.55 c	5.65 a	2.55 a	124.02 a	445.67 c	9.38 a	61.33 a	0.141 a	84.00 c
126	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.054 b	12.75 d	3.81 d	1.88 c	83.07 e	379.61 d	7.07 c	42.35 d	0.118 b	74.60 c
128	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.053 b	17.14 a	4.96 a	2.66 a	119.39 a	380.39 d	10.56 a	63.84 a	0.176 a	55.88 d
134	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	0.049 a	12.96 d	4.81 a	2.02 b	100.21 b	469.32 a	7.37 c	48.87 b	0.105 b	86.25 c
136	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.054 b	14.05 c	4.35 c	2.21 b	96.72 b	391.36 d	8.35 b	49.51 b	0.152 a	75.40 c
138	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.055 d	18.13 a	4.57 c	2.82 a	118.31 a	379.11 d	10.16 a	58.61 a	0.182 a	68.63 c
142	<i>Rhizobium</i> sp.	0.051 a	14.89 c	4.24 c	2.01 b	99.89 b	455.24 c	7.56 c	50.96 b	0.113 b	49.48 d
145	<i>Bacillus</i> sp.	0.054 b	12.32 d	4.92 a	2.16 b	97.84 b	375.57 d	7.93 b	48.62 b	0.125 b	37.88 d
147	<i>Bacillus</i> sp.	0.053 b	14.26 c	3.26 d	1.68 c	74.78 e	393.59 d	6.30 c	38.44 d	0.106 b	66.28 c
150	<i>Bacillus</i> sp.	0.053 b	15.67 c	4.53 c	2.36 b	108.10 b	413.79 d	8.78 b	54.74 a	0.140 a	105.60 a
155	<i>Pantoea</i> sp.	0.049 a	15.35 c	3.19 d	1.61 c	77.69 e	463.32 a	5.86 c	38.43 d	0.084 b	35.48 d
156	<i>Pantoea</i> sp.	0.051 a	14.19 c	2.27 g	1.36 c	63.15 h	424.62 c	4.93 c	31.22 g	0.074 b	105.60 a
157	<i>Pantoea</i> sp.	0.056 d	13.55 d	1.90 g	1.18 c	50.14 h	380.05 d	4.26 c	24.82 g	0.068 b	31.68 d
159	<i>Pseudomonas</i> sp.	0.054 b	14.75 c	2.32 g	1.35 c	60.55 h	408.46 d	4.85 c	29.26 g	0.074 b	35.57 d
163	<i>Sphingomonas</i> sp.	0.050 a	12.40 d	3.89 d	1.72 c	78.12 e	439.00 c	6.72 c	41.79 d	0.109 b	71.55 c
165	<i>Pantoea</i> sp.	0.054 b	12.71 d	3.94 d	1.76 c	77.46 e	384.56 d	6.72 c	40.58 d	0.116 b	68.00 c
166	<i>Bacillus</i> sp.	0.049 a	14.80 c	3.96 d	1.89 c	91.32 d	460.11 a	6.92 c	45.17 d	0.099 b	78.88 c
168	<i>Sphingomonas</i> sp.	0.053 b	12.49 d	3.77 d	1.67 c	75.20 e	394.27 d	6.14 c	37.42 f	0.097 b	77.20 c
171	<i>Pantoea</i> sp.	0.049 a	13.99 c	3.18 d	1.63 c	80.16 e	475.28 a	5.92 c	38.91 d	0.086 b	36.95 d
	Controle	0.051 a	12.97 d	3.77 d	1.68 c	78.48 e	415.94 d	6.27 c	40.17 d	0.099 b	84.56 c
	C.V	5.87	15.89	18.15	18.77	18.18	11.78	20.85	19.85	27.63	26.66

Letras na coluna comparam as médias entre os tratamentos de inoculação pelo teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade. DMR (diâmetro médio da raiz), PfMR (profundidade média da raiz), MNR (máximo número de raiz), AR (área radicular), PeMR (perímetro médio da raiz), CER (comprimento específico da raiz), ASR (área superficial da raiz), CMR (comprimento médio da raiz), VMR (volume médio da raiz), MSR (massa seca da raiz).

Figura 6 Análise de Componentes Principais (PCA) do desenvolvimento inicial de raízes de Sorgo PODIUM e SHS410 inoculados com diferentes gêneros bacterianos.



DMR (diâmetro médio da raiz), PfMR (profundidade média da raiz), RP (raiz profunda), MNR (máximo número de raiz), AR (área radicular), PeMR (perímetro médio da raiz), CRE (comprimento específico da raiz), ARS (área superficial da raiz), CMR (comprimento médio da raiz), VMR (volume médio da raiz), MSR (massa seca da raiz). O gênero de cada bactéria seguido de sua codificação está apresentado nas tabelas 6 e 7.

3.2 Experimento em Casa-de-Vegetação I: efeito dos isolados sobre o desenvolvimento de cana-de-açúcar e caracterização bioquímica das estirpes

O resultado das avaliações de cana-de-açúcar (RB 966928) inoculada com diferentes estirpes bacterianas estão apresentados na tabela 7. Com exceção dos parâmetros diâmetro do colmo e teores de clorofila (dados não apresentados), as demais variáveis apresentaram significância pelo teste F ($p \leq 0,05$) demonstrando influência das bactérias inoculadas sobre a promoção do crescimento da cana-de-açúcar. As bactérias 113, 116 (*Acinetobacter* sp.), 109 (*Gluconacetobacter* sp.), 120 (*Pseudomonas* sp.) 121 (*Pseudomonas* sp.), 27, 70 (*Rhizobium* sp.) e 150 (*Bacillus* sp.) apresentaram maiores incrementos no desenvolvimento da planta, demonstrando-se superiores aos demais tratamentos inoculados e ao controle 1 (C1). Os maiores valores de massa seca total da planta (MSTP) foram encontrados nas plantas inoculadas com as estirpes 109 (*Gluconacetobacter* sp.), 113 (*Acinetobacter* sp.), 117, 120, 121, 128 (*Pseudomonas* sp.) e 27 (*Rhizobium* sp.), apresentando incrementos de 58% (estirpe 117) até 116% (estirpe 121) em comparação ao C1, e não diferindo significativamente do C2. Quanto à variável nitrogênio total da planta (NTP), as bactérias 113 (*Acinetobacter* sp.), 121 (*Pseudomonas* sp.), 27 (*Rhizobium* sp.) e a estirpe padrão BR 11281 foram as que proporcionaram maiores acúmulos de N pela planta com aumento de 108%, 59%, 100% e 137% em relação ao C1, respectivamente, e não apresentaram diferença do C2. Esses resultados indicam o potencial de fixação biológica de nitrogênio por essas bactérias. Diversos estudos já comprovaram que as variedades de cana-de-açúcar plantadas no Brasil podem acumular N proveniente do processo de FBN realizado por bactérias diazotróficas (SCHULTZ et al., 2016; URQUIAGA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2006).

Avaliando os efeitos da inoculação de cada isolado no desenvolvimento da planta, a estirpe 113 do gênero *Acinetobacter* sp. apresentou efeitos significativos em todas as variáveis. Em comparação com o C1, foi observado um aumento de 10% para altura média da planta (AMP), 30% para o volume médio da raiz (VMR), 106% para massa seca da raiz (MSR), 72% para massa seca da parte aérea (MSPA), 179% para nitrogênio total da planta (NTPA), e 96% para nitrogênio total da raiz (NTR). Em adição, o nitrogênio total das raízes inoculadas com a estirpe 113 foi

superior ao valor obtido no tratamento C2, enquanto que as demais variáveis não apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento C2.

Uma análise de componentes principais foi realizada para melhor compreender a influência da inoculação das bactérias nos efeitos promotores do crescimento de cana-de-açúcar. Os dados da análise podem ser visualizados na Figura 7, sendo que, quanto maiores os vetores, maior a influência da variável e, quanto mais agrupadas as variáveis, maior a correlação entre elas. Os dois primeiros componentes foram responsáveis por 85,83% da variabilidade total dos dados, com componente 1 explicando 75,35% da variância total. Os tratamentos B24 (C2) e B03 (*Acinetobacter* sp. estirpe 113) foram associados às variáveis NTP, NTPA e AMP. Enquanto que, B07 (*Pseudomonas* sp. estirpe 120), B01 (*Gluconacetobacter* sp. estirpe 109), B15 (*Bacillus* sp. estirpe 150), B19 (*Rhizobium* sp. estirpe 27), B08 (*Pseudomonas* sp. estirpe 121), B05 (*Acinetobacter* sp. estirpe 116) e B20 (*Rhizobium* sp. estirpe 70) aparecem relacionados as variáveis MSPA, DMP, MSTP, MSR e VMR. Esses resultados permitiram identificar oito bactérias eficientes na promoção do crescimento de cana-de-açúcar, sendo duas do gênero *Acinetobacter* sp. (estirpe 113 e 116), duas *Pseudomonas* sp. (estirpes 120 e 121), uma *Gluconacetobacter* sp. (estirpe 109), 1 *Bacillus* sp. (estirpe 150) e 2 duas de *Rhizobium* sp. (estirpes 27 e 70).

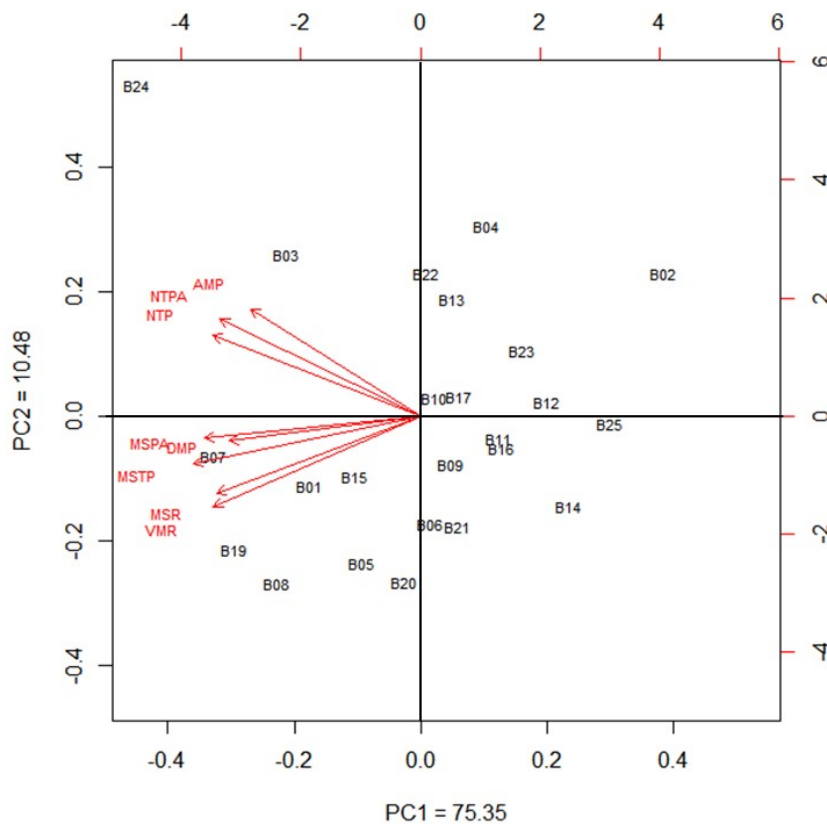
As bactérias que apresentaram melhores efeitos no desenvolvimento das plantas de cana-de-açúcar são representantes dos gêneros *Acinetobacter* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp. e *Bacillus* sp. Essas bactérias são frequentemente encontradas em associação com cana-de-açúcar e estudos de inoculação utilizando esses gêneros bacterianos já demonstraram incrementos positivos na promoção de crescimento dessa cultura (BENEDUZI et al., 2013; CHAUHAN; BAGYARAJ; SHARMA, 2012; SCHULTZ et al., 2014; TAULÉ et al., 2011).

Tabela 7. Avaliação dos efeitos promotores de crescimento de cana-de-açúcar (RB 966928) inoculadas com diferentes com isolados bacterianos de Cana-de-açúcar.

Isolado	Gênero	AMP (cm)	VMR (cm ³)	MSR (g)	MSPA (g)	MSTP (g)	NTPA (mg.g ⁻¹)	NTR (mg.g ⁻¹)	NTP (mg.g ⁻¹)
109	<i>Gluconacetobacter sp.</i>	146.1 a	85.0 a	10.8 a	21.8 a	29.9 a	178.4 c	52.0 a	230.4 b
111	<i>Paenibacillus sp.</i>	135.5 a	32.5 b	1.9 b	5.6 b	7.5 b	59.2 c	8.5 b	67.7 b
113	<i>Acinetobacter sp.</i>	137.5 a	75.0 a	10.3 a	20.9 a	31.2 a	427.4 a	34.8 a	355.4 a
114	<i>Bacillus sp.</i>	132.4 b	53.3 b	7.0 b	16.4 a	21.7 b	192.4 c	25.8 b	205.3 b
116	<i>Acinetobacter sp.</i>	118.9 b	90.0 a	11.9 a	19.4 a	23.5 b	171.0 c	44.9 a	204.7 b
117	<i>Pseudomonas sp.</i>	115.1 b	77.5 a	7.2 b	21.7 a	27.1 a	177.9 c	36.6 a	205.3 b
120	<i>Pseudomonas sp.</i>	131.1 b	80.0 a	8.8 b	25.8 a	34.6 a	262.3 c	22.1 b	213.3 b
121	<i>Pseudomonas sp.</i>	128.4 b	103.3 a	16.6 a	20.5 a	37.1 a	229.3 c	43.2 a	272.5 a
128	<i>Pseudomonas sp.</i>	115.8 b	65.0 b	7.2 b	19.9 a	27.1 a	182.8 c	18.4 b	155.5 b
134	<i>Pseudoxanthomonas sp.</i>	127.9 b	60.0 b	6.0 b	18.4 a	18.2 b	156.0 c	15.0 b	128.3 b
136	<i>Pseudomonas sp.</i>	115.0 b	57.5 b	5.8 b	18.0 a	23.8 b	152.1 c	18.4 b	170.5 b
138	<i>Pseudomonas sp.</i>	111.4 b	46.7 b	5.2 b	14.4 a	19.6 b	131.0 c	17.5 b	148.5 b
142	<i>Rhizobium sp.</i>	126.8 b	50.0 b	6.3 b	15.6 a	18.0 b	161.9 c	16.3 b	137.8 b
145	<i>Bacillus sp.</i>	112.2 b	68.3 b	5.5 b	11.8 a	14.3 b	130.5 c	23.5 b	148.1 b
150	<i>Bacillus sp.</i>	127.6 b	80.0 a	7.7 b	22.3 a	18.9 b	227.1 c	22.9 b	130.8 b
155	<i>Pantoea sp.</i>	118.6 b	70.0 b	4.9 b	18.9 a	22.6 b	120.8 c	26.5 b	134.0 b
163	<i>Sphingomonas sp.</i>	129.5 b	53.3 b	11.3 a	15.2 a	23.6 b	168.5 c	23.9 b	184.4 b
166	<i>Bacillus sp.</i>	154.3 a	70.0 b	6.5 b	16.8 a	17.4 b	93.2 c	19.1 b	60.9 b
27	<i>Rhizobium sp.</i>	126.1 b	106.7 a	16.6 a	24.2 a	36.6 a	316.9 b	25.8 b	342.7 a
70	<i>Rhizobium sp.</i>	123.0 b	87.5 a	13.9 a	16.3 a	22.6 b	137.4 c	42.7 a	180.1 b
Ab-V5	<i>A. brasilense</i>	118.1 b	62.5 b	7.3 b	16.8 a	24.1 b	136.9 c	17.8 b	116.0 b
BR 11281	<i>G. diazotrophicus</i>	114.3 b	73.3 a	7.4 b	15.1 a	20.6 b	376.9 b	29.4 b	406.4 a
SmR1	<i>H. seropedicae</i>	106.0 b	60.0 b	7.0 b	18.4 a	18.7 b	162.2 c	3.8 b	145.8 b
C1	-	125.3 b	57.5 b	5.0 b	12.2 a	17.2 b	153.4 c	17.8 b	171.2 b
C2	-	163.5 a	90.0 a	12.3 a	26.1 a	38.3 a	485.7 a	24.2 b	485.7 a
CV		13.32	29.02	41.33	12.04	40.60	38.93	38.93	48.5

Letras na coluna comparam as médias entre os tratamentos de inoculação pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. AMP (altura média da planta); DM (diâmetro médio da raiz); MSR (massa seca da raiz); MSPA (massa seca da parte aérea); MSTP (massa seca total da planta); NTPA (nitrogênio total da parte aérea); NTR (nitrogênio total da raiz); NTP (nitrogênio total da planta). Os resultados de MSPA não apresentaram normalidade e os dados foram transformados para ln(x).

Figura 7 Análise de Componentes Principais (PCA) com base em atributos relativos ao desenvolvimento de cana-de-açúcar inoculada com diferentes gêneros de BPCV.



produção destes reguladores de crescimento faz parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais, e dentre os fitormônios citados, a auxina (ácido indol-3-acético - AIA) é o mais estudado (BULGARELLI et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014). A produção de AIA pelos microrganismos desempenha papel importante no aumento do sistema radicular das plantas, podendo contribuir para melhor absorção de nutrientes. As bactérias estudadas no presente trabalho apresentaram diferença no seu potencial para produzir AIA, sendo a produção desse composto observada em apenas 8 das 20 estirpes analisadas (Tabela 8). Os valores de produção do fitormônio variaram de 17,73 a 168,31 $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$ proteína para os isolados e 17,12 a 84,95 $\mu\text{g mg}^{-1}$ proteína para as estirpes padrões (Tabela 9). As bactérias 114 e 150, ambas pertencentes ao gênero *Bacillus* sp., apresentaram os maiores valores de produção (149,94 e 168,31 $\mu\text{g AIA mg}^{-1}$ proteína, respectivamente), diferindo significativamente das demais bactérias e das estirpes padrões. Diversos trabalhos demonstraram a capacidade do gênero *Bacillus* sp. em produzir AIA. Verma et al. (2016), estudando os mecanismos de promoção do

crescimento *in vitro* de diferentes espécies de *Bacillus*, encontraram valores de produção de AIA variando de 8,75 a 225,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ proteína. Os isolados 138 (*Pseudomonas* sp.), 142 (*Rhizobium* sp.), 120 (*Pseudomonas* sp.) e 27 produziram valores intermediários de AIA, enquanto que a menor produção foi verificada pelas estirpes 128 (*Pseudomonas* sp) e 134 (*Pseudoxanthomonas* sp).

Considerando os resultados do experimento de inoculação em cana-de-açúcar (Tabela 7), é possível observar que os isolados 27 (*Rhizobium* sp.), 120 (*Pseudomonas* sp.) e 150 (*Bacillus* sp.) estão entre as bactérias que proporcionaram maior volume de raízes, sendo significativamente superior ao controle sem inoculação (C1). Esse aumento no sistema radicular da planta pode estar associado à capacidade dessas bactérias em produzir compostos indólicos, como verificado e confirmado nos testes *in vitro*. No entanto, é importante ressaltar que a produção dos compostos indólicos *in vivo* pode ser influenciada por diversos fatores ambientais. Diferentes concentrações de AIA podem afetar a fisiologia das plantas de maneiras distintas, estimulando ou suprimindo o seu crescimento. As respostas das plantas a este fitormônio podem variar devido ao tipo e tecido, bem como ao seu estágio de desenvolvimento. Em adição, os níveis endógenos de auxinas na planta podem ser alterados pela aquisição dos compostos indólicos que foram secretados pelas bactérias da rizosfera (GLICK, 2012).

Além do AIA, também avaliou-se a capacidade das bactérias em solubilizar os fosfatos inorgânicos de ferro ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e de alumínio (AlPO_4). Os resultados de solubilização estão apresentados na tabela 9. Todas as bactérias foram capazes de solubilizar o fosfato de alumínio, e a quantidade de fósforo solúvel no meio de cultura variou entre 5,7 a 39,0 mg.L^{-1} . A bactéria 109 (*Gluconacetobacter* sp) apresentou maior solubilização de P (38,97 mg.L^{-1} de P), seguido da estirpe padrão BR 11281 (32,26 mg.L^{-1} de P), e da bactéria 142 (*Rhizobium* sp.) (25,57 mg.L^{-1} de P). Após 7 dias de cultivo, o pH do meio diminuiu de 7,0 (pH inicial do meio de cultura) até uma faixa que variou entre 2,64 até 5,12 dependendo do isolado. Foi observada uma correlação negativa ($r = -0.70$) entre a quantidade de AlPO_4 solubilizada e o pH final do meio. Quanto à solubilização do fosfato de ferro, do total de 20 bactérias, 15 foram hábeis em promover sua solubilização (60% do total de bactérias analisadas). Dentre os isolados, *Gluconacetobacter* sp (109) apresentou a maior quantidade de P solúvel no meio de cultivo (32,33 mg.L^{-1} de P), sendo significativamente superior às demais bactérias, porém, inferior ao padrão BR 11281

que solubilizou 166,03 mg. L⁻¹ de P. Assim como ocorreu para solubilização do fosfato de alumínio, após 7 dias do experimento, todos os cultivos contendo fosfato de ferro apresentaram redução no pH. Também foi verificada correlação negativa de $r = -0,42$ entre a quantidade de FePO₄.2H₂O solubilizada e o pH final do meio.

Considerando as duas fontes de fosfatos avaliadas, a bactéria 109, identificada como sendo do gênero *Gluconacetobacter* sp., foi capaz de solubilizar tanto o FePO₄.2H₂O como o AlPO₄ liberando uma quantidade de P no meio de cultivo significativamente superior às outras bactérias.

Os mecanismos utilizados por BPCVs para solubilizar os fosfatos estão relacionados à excreção de ácidos orgânicos, ao aumento da quelatação dos cátions ligados ao P, ou ainda à formação de complexos solúveis com os íons metálicos associados ao fosfato insolúvel (Ca, Al, Fe) (SHARMA et al. 2013). Além disso, as bactérias podem produzir enzimas como fosfatases que facilitam a conversão de formas insolúveis de P para formas disponíveis para as plantas (RICHARDSON et al. 2009). No presente trabalho foi verificada uma correlação negativa entre a quantidade de P solubilizado (ambas fontes de P avaliadas) e o pH final do cultivo. Isso indica que a redução de pH pode ter sido um dos mecanismos envolvidos na solubilização deste tipo de fosfato.

Tabela 8 Produção de compostos indólicos na presença do precursor L-triptofano e solubilização dos fosfatos de ferro (FePO₄.2H₂O) e de alumínio (AlPO₄) por bactérias isoladas de cana-de-açúcar.

Isolado	Bactéria	Produção de AIA			Solubilização de Fosfato			
		AIA $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Proteína mg.mL^{-1}	AIA/proteína $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$	AlPO ₄		FePO ₄	
					P (mg.L^{-1})	ΔpH	P (mg.L^{-1})	ΔpH
27	<i>Rhizobium</i> sp.	15.43 b	0.409 b	37.59 c	9.36 e	5.12	7.70 c	5.45
109	<i>Gluconacetobacter</i> sp.	< 5.00	0.226 d	< 5.00	38.97 a	2.64	32.33 b	3.15
111	<i>Paenibacillus</i> sp.	< 5.00	0.064 e	< 5.00	5.88 e	4.13	5.65 c	4.60
113	<i>Acinetobacter</i> sp.	< 5.00	0.280 c	< 5.00	17.40 d	3.72	3.03 c	5.27
114	<i>Bacillus</i> sp.	22.04 a	0.154 d	149.94 a	7.63 e	4.42	-	5.18
116	<i>Acinetobacter</i> sp.	< 5.00	0.106 e	< 5.00	13.57 d	3.59	6.83 c	5.18
120	<i>Pseudomonas</i> sp.	9.86 c	0.314 c	48.19 c	14.37 d	4.36	13.63 c	5.2
121	<i>Pseudomonas</i> sp.	< 5.00	0.543 a	< 5.00	13.36 d	3.71	13.05 c	5.40
128	<i>Pseudomonas</i> sp.	8.71 c	0.353 b	24.68 d	11.16 d	4.37	4.69 c	5.56
134	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	7.51 c	0.296 c	17.73 d	9.57 e	3.34	-	4.64
136	<i>Pseudomonas</i> sp.	< 5.00	0.483 a	< 5.00	10.36 e	3.37	-	4.62
138	<i>Pseudomonas</i> sp.	21.13 a	0.238 d	91.85 b	12.70 d	3.37	10.37 c	4.69
142	<i>Rhizobium</i> sp.	13.43 c	0.207 d	65.23 c	25.57 c	2.66	9.03 c	3.44
145	<i>Bacillus</i> sp.	< 5.00	0.165 d	< 5.00	6.17 e	4.10	-	4.95
150	<i>Bacillus</i> sp.	16.73 b	0.102 e	168.31 a	6.70 e	4.37	6.20 c	4.64
155	<i>Pantoea</i> sp.	< 5.00	0.019 e	< 5.00	13.59 d	3.47	-	5.13
163	<i>Sphingomonas</i> sp.	< 5.00	0.085 e	< 5.00	5.74 e	4.01	-	5.17
166	<i>Bacillus</i> sp.	< 5.00	0.138 e	< 5.00	7.12 e	3.29	-	4.88
117	<i>Pseudomonas</i> sp.	< 5.00	0.379 b	< 5.00	9.55 e	3.58	-	4.86
70	<i>Rhizobium</i> sp.	< 5.00	0.397 b	< 5.00	11.85 d	4.14	2.59 c	5.20
Ab-V5	<i>A.brasilense</i>	< 5.00	0.233 d	< 5.00	7.37 e	4.21	1.48 c	4.33
BR11335	H.seropedicae	11.27 c	0.456 a	17.12 d	13.82 d	3.89	8.59 c	5.50
BR 11281	<i>G. diazotrophicus</i>	14.23 c	0.181 d	84.95 b	32.26 b	2.68	166.03 a	3.82
CV (%)		34.37	23.52	34.10	20.35		36.77	

Valores menores que 5,00 μg de AIA por mg^{-1} de proteína (< 5,00) não foram quantificados por estarem abaixo da concentração de AIA sintético utilizada na curva padrão.

As características de promoção de crescimento dos isolados que apresentaram maior eficiência no desenvolvimento de cana-de-açúcar, bem como os incrementos proporcionados à planta estão apresentados na tabela 9. Conforme os resultados obtidos, foram selecionadas 4 estirpes bacterianas para as próximas etapas do trabalho: *Acinetobacter* sp. (estirpe 113), *Gluconacetobacter* sp. (estirpe 109), *Pseudomonas* sp. (estirpe 121) e *Rhizobium* sp. (estirpe 27).

Tabela 9 Características bioquímicas dos isolados selecionados e eficiência na promoção do crescimento de cana-de-açúcar.

Isolado	Gênero	Produção de AIA	Solubilização de fosfato		Incrementos no desenvolvimento da planta (%)					
			(AlPO ₄)	(FePO ₄)	AMP (cm)	VMR (cm ³)	MSR (g)	MSPA (g)	NTPA (g)	NTR (g)
27	<i>Rhizobium</i> sp.	Sim	Sim	Sim	1	86	231	99	107	45
70	<i>Rhizobium</i> sp.	Não	Sim	Sim	0	52	177	34	0	140
109	<i>Gluconacetobacter</i> sp.	Não	Sim	Sim	17	48	115	79	16	192
113	<i>Acinetobacter</i> sp.	Não	Sim	Sim	10	30	106	72	179	96
116	<i>Acinetobacter</i> sp.	Não	Sim	Sim	0	57	137	60	11	152
120	<i>Pseudomonas</i> sp.	Sim	Sim	Sim	5	39	75	112	71	24
121	<i>Pseudomonas</i> sp.	Não	Sim	Sim	2	80	232	68	50	143
150	<i>Bacillus</i> sp.	Sim	Sim	Sim	2	39	54	83	48	29

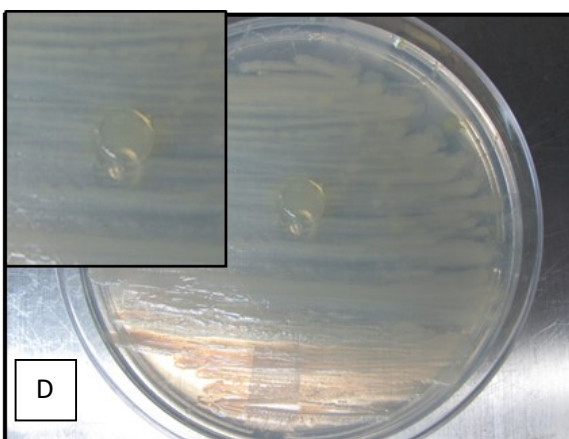
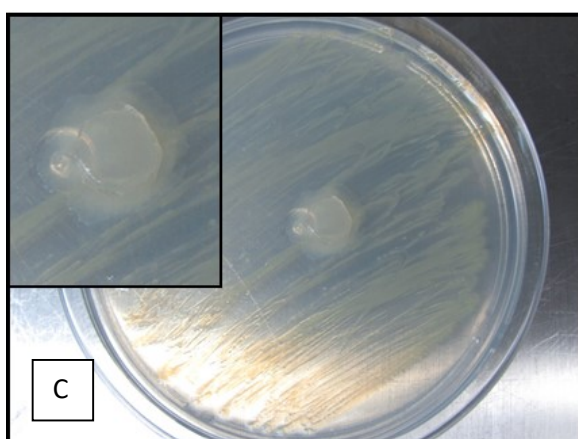
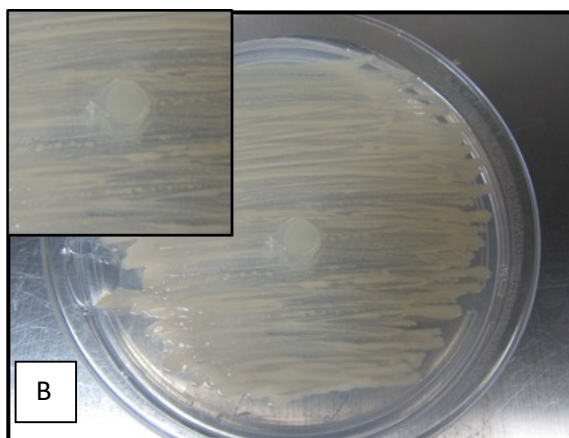
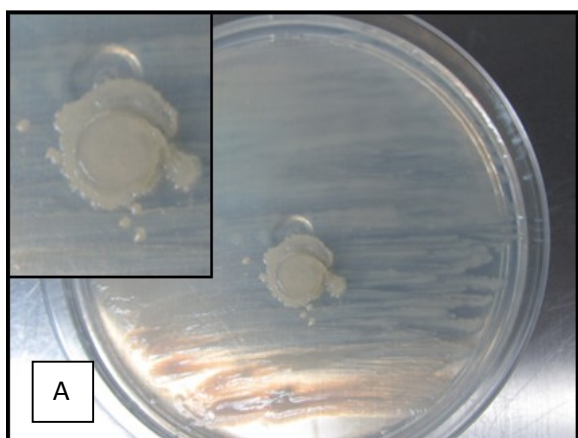
Os incrementos no desenvolvimento da planta (%) são em comparação ao tratamento C1 (controle com limitação de N e sem inoculação).

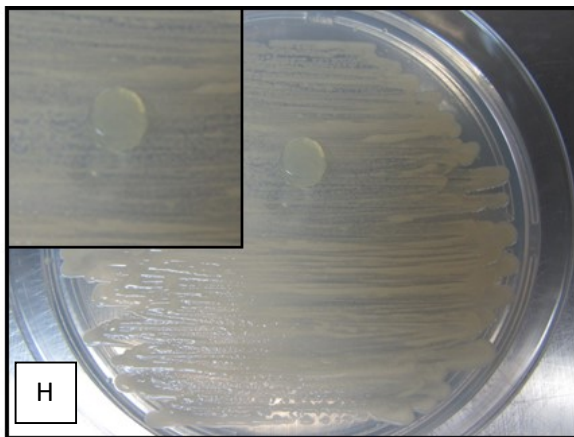
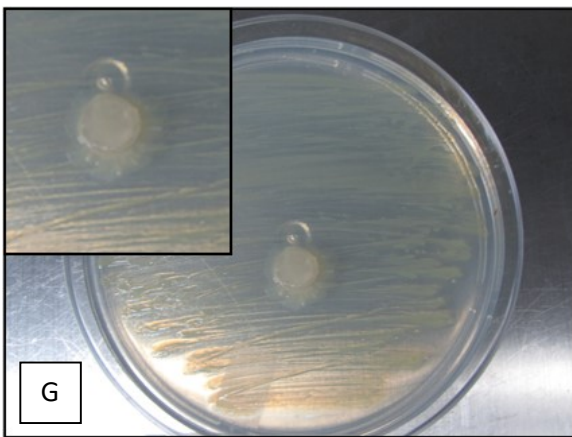
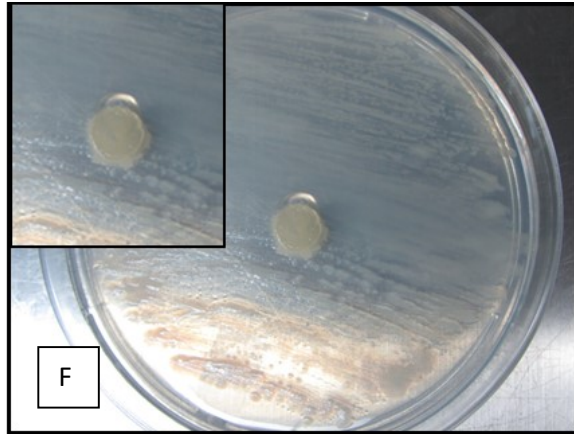
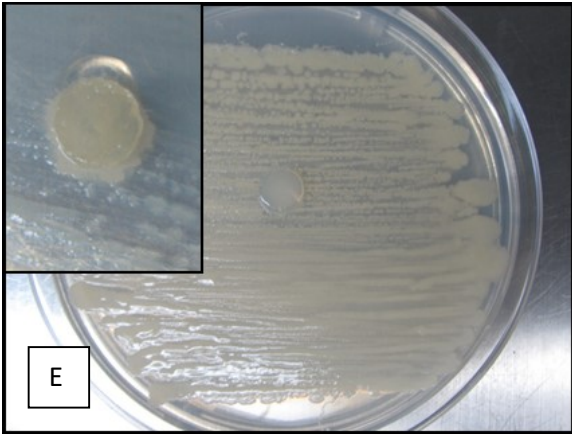
2.4 Teste de Compatibilidade Bactéria X Bactéria *in vitro*

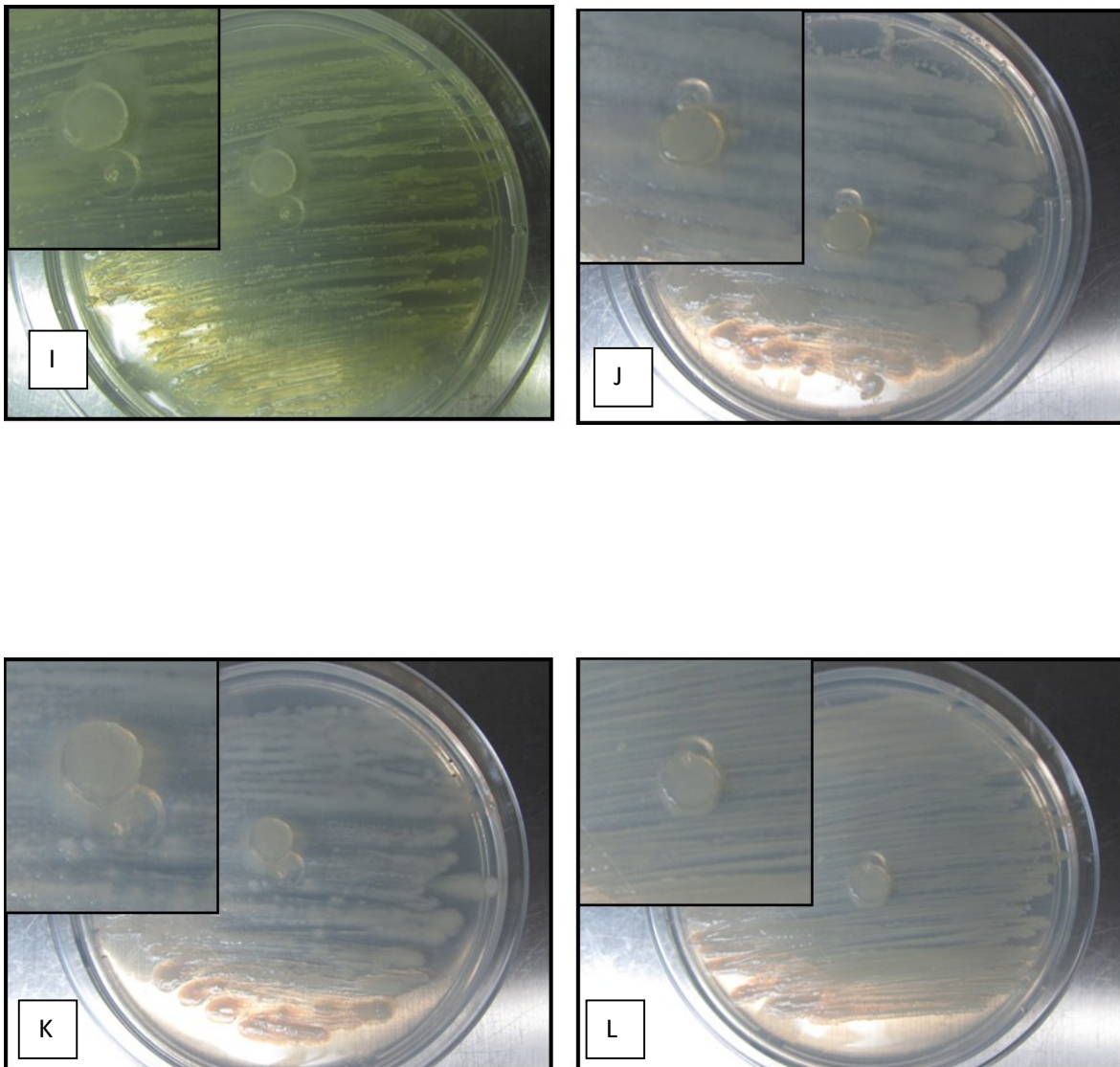
O uso conjunto de bactérias em formulações de inoculantes pode potencializar os efeitos promotores de crescimento, resultando em aumentos significativos no desenvolvimento das plantas. Estudos anteriores reportaram que a utilização de cinco espécies de bactérias combinadas (*G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *A. amazonense*, *B. tropica*) em cana-de-açúcar proporcionou aumento na produtividade de colmos (OLIVEIRA et al., 2006; SCHULTZ et al., 2017). No entanto, avaliar a compatibilidade entre os microrganismos que constituem a formulação é crucial para performance do inoculante. Neste sentido, as bactérias selecionadas anteriormente, que apresentaram maior potencial biotecnológico (estirpes 113, 109, 121 e 27) foram testadas quanto à compatibilidade entre elas visando o desenvolvimento de um inoculante misto para cana-de-açúcar. Imagens do ensaio de compatibilidade entre os isolados de cana-de-açúcar, utilizando o método de confrontação direta, estão apresentadas na Figura 8. Nenhum dos isolados testados apresentou antagonismo durante o co-cultivo. Dessa forma, as estirpes em estudo podem ser utilizadas em combinações para o desenvolvimento de inoculantes.

Figura 8 Ensaio de compatibilidade entre os isolados de cana-de-açúcar, baseado no método de confrontação direta. **(A)** Co-cultivo de *Pseudomonas* sp. (parte inferior) e

Gluconacetobacter sp. (disco superior). **(B)** Co-cultivo de *Gluconacetobacter* sp. (parte inferior) e *Pseudomonas* sp. (disco superior). **(C)** Co-cultivo de *Pseudomonas* sp. (parte inferior) e *Rhizobium* sp (disco superior) **(D)** *Rhizobium* sp (parte inferior) e *Pseudomonas* sp (disco superior). **(E)** *Rhizobium* sp (parte inferior) e *Acinetobacter* sp (disco superior). **(F)** *Acinetobacter* sp (parte inferior) e *Rhizobium* sp (disco superior). **(G)** *Acinetobacter* sp (parte inferior) e *Gluconacetobacter* sp. (disco superior). **(H)** *Gluconacetobacter* sp. (parte inferior) e *Acinetobacter* sp. (disco superior). **(I)** *Pseudomonas* sp. (parte inferior) e *Acinetobacter* sp. (disco superior). **(J)** *Acinetobacter* sp (parte inferior) e e *Pseudomonas* sp (disco superior). **(K)** *Gluconacetobacter* sp. (parte inferior) e *Rhizobium* sp (disco superior). **(L)** *Rhizobium* sp (parte inferior) e *Gluconacetobacter* sp. (disco superior).







3.4 Experimento em Casa-de-Vegetação II: Efeito dos Isolados Sobre o desenvolvimento de Cana-de-açúcar

Uma alternativa para aumentar a eficiência de inoculantes contendo BPCVs é a inoculação de culturas mistas, no qual utilizam-se combinações de isolados promotores do crescimento vegetal com mecanismos de ação complementares (ALAGAWADI e GAUR, 1992; OLIVEIRA et al., 2006; YU et al., 2012). Oliveira et al. (2002, 2006) avaliaram o efeito da inoculação de misturas bacterianas (cinco diferentes espécies) em variedades de cana-de-açúcar e verificaram resposta positiva sobre a FBN, com contribuição média de aproximadamente 30% do N

acumulado pela planta. A combinação de espécies bacterianas em formulações de inoculante é uma estratégia viável para potencializar os efeitos promotores do crescimento e aumentar a produtividade da cultura.

A partir dos resultados de compatibilidade (item 2.4), foram definidas sete combinações de bactérias para a realização do experimento de inoculação: estirpes 109+113 (*Gluconacetobacter* sp. + *Acinetobacter* sp.); estirpes 109+121 (*Gluconacetobacter* sp. + *Pseudomonas* sp.); estirpes 109+27 (*Gluconacetobacter* sp. + *Rhizobium* sp.); estirpes 113+121 (*Acinetobacter* sp. + *Pseudomonas* sp.); estirpes 113+27 (*Acinetobacter* sp. + *Rhizobium* sp.); estirpes 121+27 (*Pseudomonas* sp. + *Rhizobium* sp.) e a misturas das 4 estirpes. As plantas de cana-de-açúcar inoculadas apresentaram diferentes respostas dependendo da variedade utilizada e da combinação das bactérias (Tabela 10). Esses resultados confirmam a influência do genótipo da planta em resposta à inoculação das bactérias, conforme já verificado em outros estudos (OLIVEIRA et al., 2006; MUÑOZ-ROJAS; CABALLERO-MELLADO, 2003). A eficiência da bactéria depende da variedade utilizada ocorre devido à complexa interação genótipo planta X genótipo bactéria. Essa interação pode ser explicada pela secreção diferencial dos exsudatos liberados de cada genótipo o que pode influenciar a colonização das bactérias (FIGUEIREDO et al., 2017). Dessa forma, a seleção da melhor combinação de estirpes bacterianas com diferentes genótipos de plantas deve ser explorada para obter a máxima eficiência após a inoculação.

O gráfico de PCA apresenta a média dos dados de todas as variedades testadas (Figura 9). Os dois primeiros componentes foram responsáveis por 68% da variabilidade total dos dados, com componente principal 1 explicando 42,61% da variância total. Os tratamentos de inoculação provenientes da combinação das estirpes 109+121 (*Gluconacetobacter* sp. + *Pseudomonas* sp.), estirpes 113+121 (*Acinetobacter* sp. + *Pseudomonas* sp.), e estirpes 121+27 (*Pseudomonas* sp. + *Rhizobium* sp.) foram relacionados às variáveis analisadas (Figura 9). A inoculação da mistura contendo as estirpes 109+121 (*Gluconacetobacter* sp. + *Pseudomonas* sp.) proporcionou maior influência nas raízes das plantas de cana-de-açúcar, no diâmetro do caule e nas medidas de fluorescência da clorofila. Em contraste, os outros dois tratamentos (estirpes 113 + 121; estirpes 121 +27) apresentaram maior influência nos parâmetros relacionados à massa seca e nutrientes da parte aérea. É interessante verificar que todas as combinações de bactérias citadas acima

possuem a estirpe 121 pertencente ao gênero *Pseudomonas* sp., indicando o alto potencial dessa bactéria em promover o crescimento das plantas.

Essas bactérias estão sendo testadas em condições de campo para verificar a eficiência agronômica em cultivos de cana-de-açúcar, visando a validação do inoculante para comercialização. Também está sendo realizado uma análise filogenética dessas bactérias utilizando a metodologia de MLSA (Multilocus Sequence Analysis) para confirmação das espécies.

Tabela 10 Avaliação dos efeitos promotores de crescimento de Cana-de-açúcar (RB835054, RB867515 e RB966928) inoculadas com diferentes isolados de BPCVs.

Altura (cm)											
Variedade	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	
RB 835054	134.40 Ca	128.75 Ca	140.20 Ba	142.67 Ba	131.12 Ca	143.50 Ba	138.00 Ba	169.00 Aa	125.17 Ca	128.83 Ca	
RB 867515	114.00 Bb	110.00 Bb	109.87 Bb	111.75 Bb	114.30 Bb	111.00 Bb	117.83 Bb	166.83 Aa	106.60 Bb	111.50 Bb	
RB 966928	118.33 Bb	116.50 Bb	117.62 Bb	116.00 Bb	111.87 Bb	123.00 Bb	118.40 Bb	166.62 Aa	128.50 Ba	105.85 Bb	

Diâmetro (cm)											
Variedade	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	
RB 835054	11.22 Ba	11.49 Ba	11.15 Ba	12.03 Ba	10.62 Ba	11.96 Ba	10.36 Bb	14.12 Aa	9.38 Bc	10.95 Ba	
RB 867515	11.18 Ba	11.75 Ba	11.22 Ba	11.35 Ba	11.40 Ba	10.63 Ba	11.08 Bb	14.11 Aa	11.52 Bb	11.23 Ba	
RB 966928	12.52 Ba	12.48 Ba	12.52 Ba	12.30 Ba	12.20 Ba	12.37 Ba	12.88 Ba	14.83 Aa	14.22 Aa	12.98 Ba	

VMR (cm ³)											
Variedade	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	
RB 835054	46.00 Ba	42.50 Bb	42.00 Ba	50.00 Ba	45.00 Ba	42.50 Ba	40.00 Ba	72.50 Ab	30.00 Bb	46.66 Ba	
RB 867515	53.33 Ba	66.66 Aa	50.00 Ba	50.00 Ba	52.00 Ba	42.50 Ba	40.00 Ba	73.33 Ab	44.00 Ba	54.00 Ba	
RB 966928	46.66 Ba	42.00 Bb	57.50 Ba	42.00 Ba	47.50 Ba	43.33 Ba	52.00 Ba	92.50 Aa	55.00 Ba	45.00 Ba	

MSPA (g)											
Variedade	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	
RB 835054	16.38 Da	15.07 Da	16.71 Db	20.33 Ba	15.85 Da	18.57 Cb	15.72 Db	28.03 Ab	12.35 Eb	17.42 Ca	
RB 867515	17.54 Ba	18.21 Ba	15.03 Db	16.07 Ca	15.05 Da	14.89 Db	16.30 Cb	25.82 Ab	14.67 Db	17.40 Ba	
RB 966928	20.30 Fa	21.91 Ea	22.05 Ea	19.52 Fa	20.88 Fa	25.00 Ca	23.00 Da	46.62 Aa	26.89 Ba	16.41 Ga	

MSR (g)											
Variedade	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	
RB 835054	7.93 Aa	6.55 Ab	8.99 Aa	7.98 Aa	8.19 Aa	9.44 Aa	7.51 Aa	10.95 Ab	6.57 Aa	9.44 Aa	
RB 867515	9.63 Ba	15.32 Aa	7.23 Ba	9.60 Ba	10.29 Ba	8.03 Ba	6.89 Ba	16.23 Aa	8.79 Ba	11.63 Ba	
RB 966928	8.09 Ba	8.03 Bb	8.46 Ba	6.91 Ba	7.42 Ba	6.95 Ba	9.30 Ba	13.80 Aa	7.34 Ba	7.94 Ba	

NTPA (mg.g ⁻¹)											
Variedade	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	
RB 835054	88.74 Ba	73.94 Bb	74.02 Ba	96.23 Ba	98.85 Ba	97.41 Ba	99.14 Ba	243.94 Aa	58.00 Bb	70.92 Ba	
RB 867515	75.68 Ba	85.09 Bb	83.56 Ba	78.52 Ba	72.63 Bb	66.04 Bb	80.46 Ba	255.32 Aa	75.63 Bb	62.32 Ba	
RB 966928	66.11 Ca	123.21 Ba	84.81 Ca	98.46 Ca	115.34 Ba	119.16 Ba	109.58 Ba	252.64 Aa	148.06 Ba	68.26 Ca	

NTR (mg.g ⁻¹)											
Variedade	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	
RB 835054	20.48 Ca	21.60 Cb	38.20 Ba	25.10 Ca	30.32 Ba	31.22 Ba	15.20 Ca	67.14 Ab	18.38 Ca	23.90 Cb	
RB 867515	29.66 Ca	44.60 Ba	19.47 Cb	29.91 Ca	31.43 Ca	29.75 Ca	22.27 Ca	91.55 Aa	25.37 Ca	40.61 Ba	
RB 966928	22.00 Ba	23.57 Bb	22.44 Bb	24.13 Ba	31.07 Ca	19.66 Ba	29.54 Ba	54.17 Ac	21.90 Ba	20.35 Bb	

NTP (mg.g ⁻¹)											
Variedade	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	
RB 835054	109.21 Ba	95.54 Bb	112.22 ba	121.34 Ba	129.17 Ba	104.28 Bb	114.35 Ba	311.09 Aa	76.37 Bb	94.81 Ba	
RB 867515	105.34 Ba	129.69 Ba	103.04 Ba	108.42 Ba	104.06 Ba	95.80 Bb	102.74 Ba	346.88 Aa	101.00 Bb	102.92 Ba	
RB 966928	88.11 Ca	146.79 Ba	84.31 Ca	122.60 Ba	146.42 Ba	138.81 Ba	139.12 Ba	306.82 Aa	169.95 Ba	88.61 Ca	

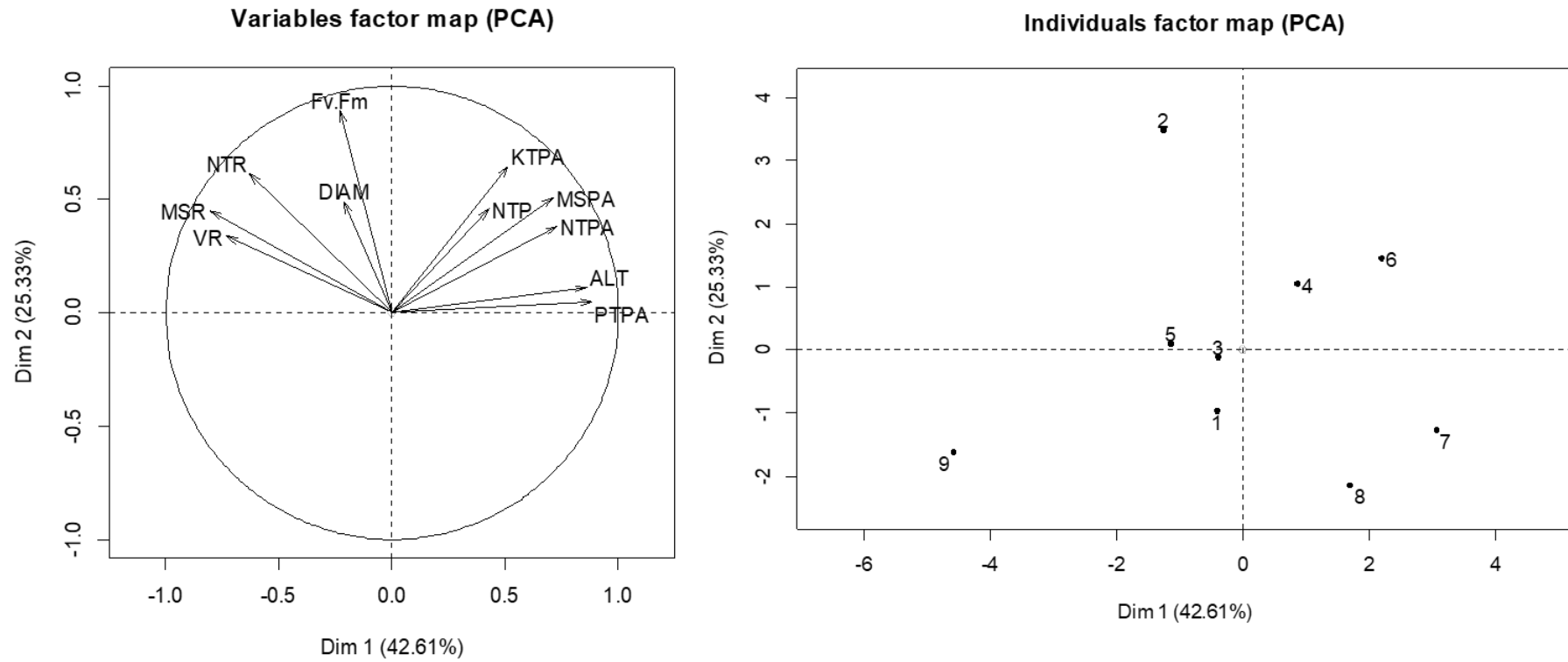
PTPA (mg.g ⁻¹)											
Variedade	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	
RB 835054	11.73 Ba	10.85 Ba	11.60 Ba	12.75 Ba	10.79 Ba	10.67 Ba	11.70 Ba	21.91 Aa	9.15 Bb	11.00 Ba	
RB 867515	11.51 Aa	10.74 Aa	11.04 Aa	9.89 Aa	10.29 Aa	10.91 Aa	12.07 Aa	14.12 Ab	9.92 Ab	11.81 Aa	
RB 966928	12.47 Ba	14.10 Ba	13.09 Ba	12.85 Ba	14.18 Ba	14.00 Ba	14.63 Aa	21.01 Aa	17.50 Aa	8.57 Ca	

KTPA (mg.g ⁻¹)											
Variedade	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	
RB 835054	244.55 Ca	252.30 Cb	289.80 Ca	331.92 Ba	215.95 Cb	265.79 Cb	247.36 Cb	426.74 Ab	180.57 Cb	269.06 Ca	
RB 867515	259.54 Ba	266.70 Bb	240.85 Ba	232.18 Bb	217.40 Bb	212.16 Bb	255.10 Bb	364.11 Ab	222.80 Bb	242.31 Ba	
RB 966928	305.26 Ba	341.25 Ba	311.91 Ba	272.54 Cb	320.02 Ba	366.57 Ba	323.82 Ba	595.50 Aa	383.25 Ba	236.43 Ca	

Letras maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, dentro de cada variável, comparam as médias entre os tratamentos de inoculação pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. VMR (volume médio da raiz); MSPA (massa seca da parte aérea); MSR (massa seca da raiz); NTPA (nitrogênio total

da parte aérea); NTR (nitrogênio total da raiz); NTP (nitrogênio total da planta); PTPA (fósforo total da parte aérea); KTPA (potássio total da parte aérea). T1 (estirpes 109+113); T2 (estirpes 109+121); T3 (estirpes 109+27); T4 (estirpes 113+121); T5 (estirpes 113+27); T6 (estirpes 121+27); T7 (controle 1 – restrição de N); T8 (controle 2 – aplicação de N); T9 (inoculante comercial); T10 (mistura das 4 estirpes).

Figura 9 Análise de Componentes Principais (PCA) com base nos atributos relativos ao desenvolvimento de cana-de-açúcar inoculada com diferentes gêneros de BPCV.



ALT (altura da planta); DIAM (diâmetro); VR (volume da raiz); MSR (massa seca da raiz); MSPA (massa seca da parte aérea); NTPA (nitrogênio total da parte aérea); NTR (nitrogênio total da raiz); NTPA (nitrogênio total da parte aérea); KTPA (potássio total da parte aérea); PTPA (fósforo total da parte aérea). Codificação dos tratamentos: 1 (estirpes 109+113); 2 (estirpes 109+121); 3 (estirpes 109+27); 4 (estirpes 113+121); 5 (estirpes 113+27); 6 (estirpes 121+27); 7 (controle 1 – restrição de N); 8 (inoculante comercial); 9 (mistura das 4 estirpes).

3.6 Caracterização Metabólica das Estirpes

A capacidade de uso de sete fontes de carbono pelas quatro bactérias foi avaliada pelo seu crescimento em meio de cultura líquido por 24 h e o resultado da contagem de UFC mL⁻¹ está apresentado na Figura 10. Todas as bactérias conseguiram crescer na presença das fontes de carbono testadas. No entanto, *Rhizobium* sp. (estirpe 27) apresentou maior crescimento quando comparada às outras três bactérias e, de forma geral, não apresentou elevada variação de crescimento com relação às fontes de carbono avaliadas (1,7x10⁹ a 8,6x10⁹ UFC.mL⁻¹). A bactéria *Gluconacetobacter* sp. (estirpe 109) também apresentou alta população na maioria das fontes de carbono, no entanto, açúcar cristal, maltodextrina e melão foram as fontes melhores utilizadas por esta bactéria (8x10⁸, 2x10⁹ e 3x10⁹ UFC.mL⁻¹, respectivamente). As fontes de carbono que mais favoreceram o crescimento de *Acinetobacter* sp. (estirpe 113) foram maltodextrina, melão e ácido málico (1x10⁸, 1x10⁹ e 3x10⁹ UFC.mL⁻¹, respectivamente). A bactéria *Pseudomonas* sp. (estirpe 121), de forma geral, apresentou menor crescimento quando comparada às outras três bactérias, sendo que as fontes de carbono que permitiram maiores contagens foram glicose, açúcar cristal, maltodextrina, melão e ácido málico (7x10⁷ a 3x10⁸ UFC.mL⁻¹).

A partir dos resultados anteriores, as fontes de carbono que propiciaram maior crescimento das quatro bactérias foram selecionadas para avaliar o crescimento representado pela densidade óptica a 600 nm, assim como o pH (Figura 12). A bactéria *Rhizobium* sp. (Figura 11A) utilizou todas as fontes de carbono avaliadas, porém, após 24 h de incubação, apresentou um maior crescimento na presença de glicose, açúcar, manitol, melão e ácido málico. O pH após 24 h, diminuiu em todas as fontes de carbono, exceto com o ácido málico (Figura 11A). A bactéria *Gluconacetobacter* sp. (Figura 11B) também conseguiu utilizar eficientemente todas as fontes de carbono, porém, apresentou maior crescimento na presença de açúcar cristal, além de redução no pH. Para o crescimento de *Acinetobacter* sp., o ácido málico indicou maior influência, e o pH apresentou um leve aumento na presença desse substrato, após 24h de incubação (Figura 11C). Quanto à estirpe *Pseudomonas* sp., foi observado um baixo crescimento em todas as fontes de carbono s, com densidades ópticas abaixo de 0,1 (Figura 11D).

Figura 10. Contagem de células das bactérias *Rhizobium* sp. (27), *Gluconacetobacter* sp. (109), *Acinetobacter* sp. (113) e *Pseudomonas* sp. (121) cultivadas em diferentes fontes de carbono.

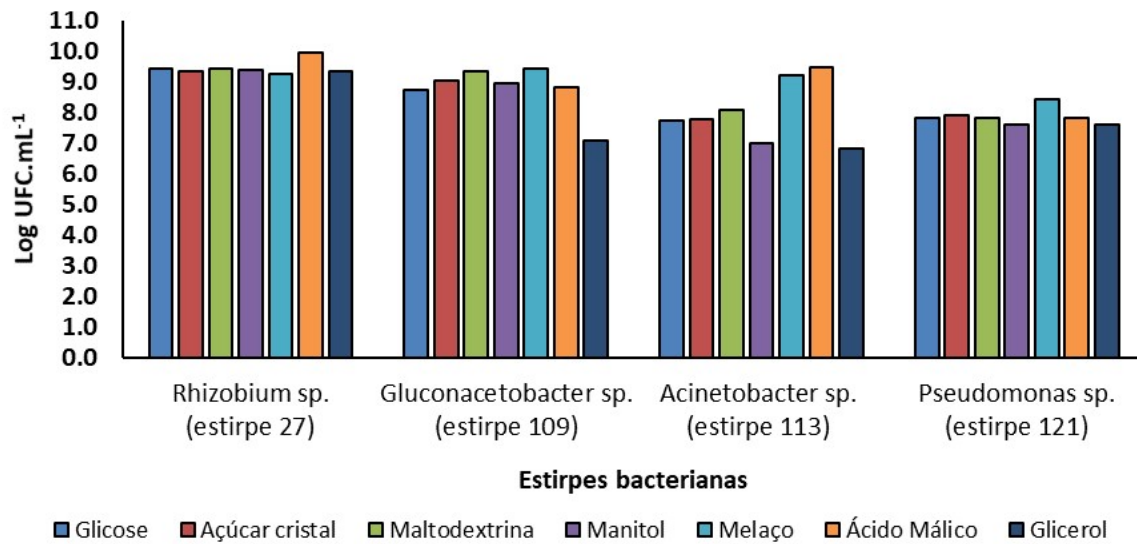
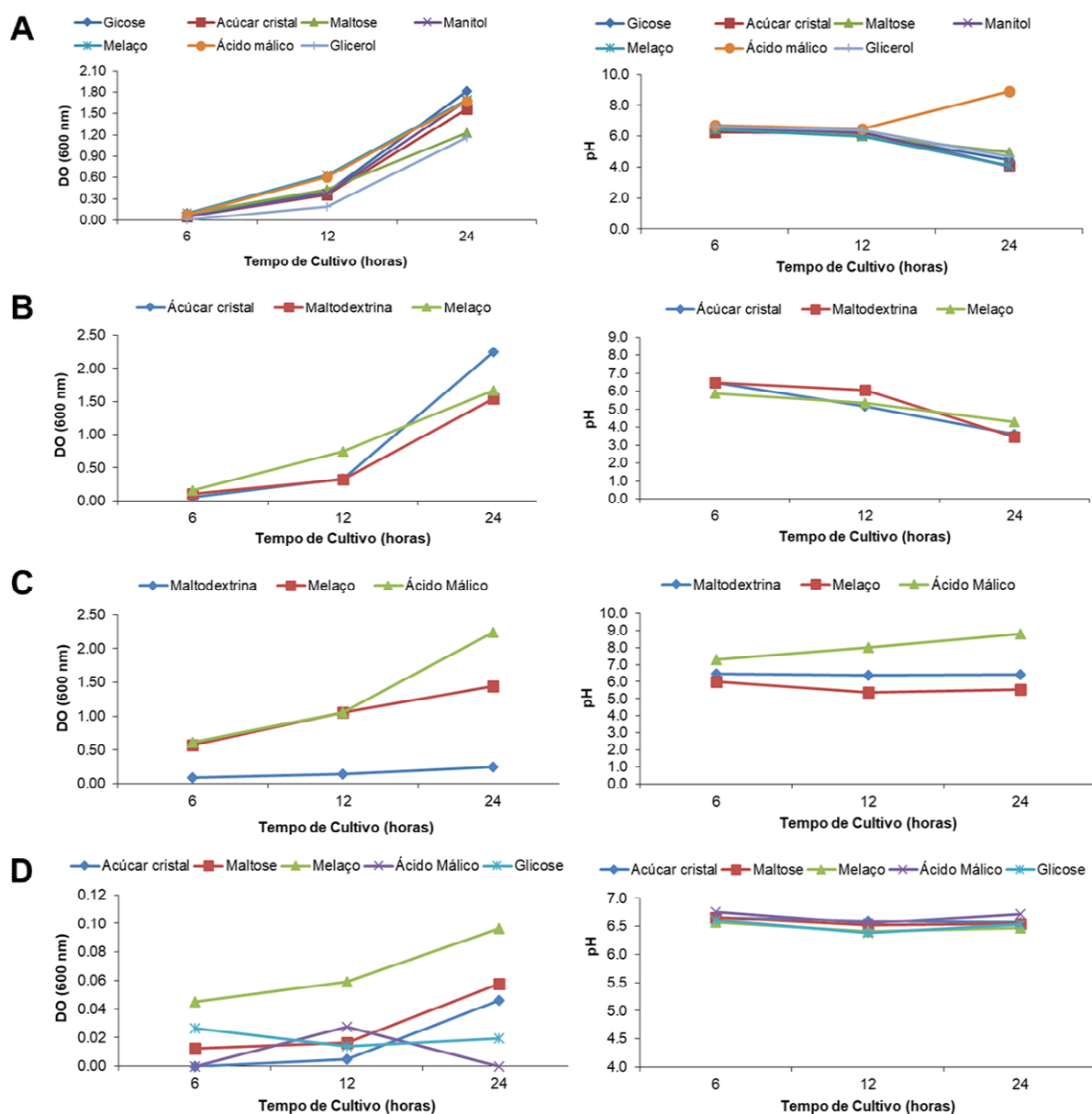


Figura 11. Densidade Óptica (Esquerda) e pH (direita) do meio após 6, 12 e 24 h de crescimento em meio líquido contendo diferentes fontes de carbono. **(A)** *Rhizobium* sp. (27), **(B)**, *Gluconacetobacter* sp. (109), **(C)** *Acinetobacter* sp. (113) e **(D)** *Pseudomonas* sp. (121).



4 CONCLUSÃO

A estratégia para selecionar BPCV candidatas ao desenvolvimento de formulações inoculantes utilizando plantas de sorgo como indicadoras de eficiência associativa à cana-de-açúcar demonstrou-se eficiente. As estirpes de *Gluconacetobacter* sp. (109), *Acinetobacter* sp. (113) *Rhizobium* sp. (27) e *Pseudomonas* sp. (121) foram consideradas promissoras para o desenvolvimento de uma formulação mista de inoculante para cana-de-açúcar.

5 REFERÊNCIAS

- ANTONIO, C. DE SOUZA et al. Diazotrophic bacteria associated to sugarcane varieties cropped at Northeast Region of Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 4, p. 272–280, 2016.
- ANTUNES, J. E. L. et al. Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, 2017.
- ARMANHI, J. S. L. et al. Multiplex amplicon sequencing for microbe identification in community-based culture collections. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–9, 2016.
- ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15–22, 2013.
- BAIS, H. P. et al. the Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions With Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, n. 1, p. 233–266, 2006.
- BALDANI, J. I. et al. Review: A brief story of nitrogen fixation in sugarcane — reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 29, n. 4, p. 417, 2002.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media : a practical guide for microbiologists. p. 413–431, 2014.
- BASHA, S. A. et al. Performance of Native Fluorescent *Pseudomonas* on in vitro Seed Germination and Seedling Vigour of *Sorghum bicolor* (L .) Moench. **International Journal of Bio-resource and Stress Management**, v. 4, n. 4, p. 487–491, 2013.
- BASHAN, Y. INOCULANTS OF PLANT GROWTH-PROMOTING BACTERIA FOR USE IN AGRICULTURE. **Biotechnology Advances**, v. 16, n. 4, p. 729–770, 1998.
- BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant and Soil**, v. 1886, 19 nov. 2013.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. Azospirillum-plant relationships : physiological , molecular , agricultural , and environmental advances (1997 – 2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521–577, 2004.

- BENEDUZI, A. et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94–104, 2013a.
- BENEDUZI, A. et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94–104, jan. 2013b.
- BERG, G. et al. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 2, p. 215–229, 2005.
- BERTANI, I. et al. Rice bacterial endophytes: Isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. **Environmental Microbiology Reports**, v. 8, n. 3, p. 388–398, 2016.
- BEUKES, C. W. et al. Genome data provides high support for generic boundaries in Burkholderia sensu lato. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–11, 2017.
- BODDEY, R. M. et al. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: Present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 139–149, 2003.
- BRAHMAPRAKASH, G. P.; SAHU, P. K. Biofertilizers for Sustainability. **Journal of the Indian Institute of Science**, v. 92, p. 26, 2012.
- BRENNER, J.; KALESINSKAS, L.; PUTONTI, C. Exploring the Diversity of Bacillus whole genome sequencing projects using Peasant, the Prokaryotic Assembly and Annotation Tool. **bioRxiv**, 2017.
- BULGARELLI, D. et al. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807–838, 2013.
- BUTT, A. T.; THOMAS, M. S. Iron Acquisition Mechanisms and Their Role in the Virulence of Burkholderia Species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. November, p. 1–21, 2017.
- CAVALCANTE, V. A.; DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 108, n. 1, p. 23–31, 1988.
- CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D. J.; SHARMA, A. Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes From Sugarcane and Their Potential in Promoting Growth of the Host Under Field Conditions. **Experimental Agriculture**, v. 49, n. 1, p. 43–52, 6 nov. 2012.
- CRUZ, L. M. et al. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (Musa spp .) and Pineapple (Ananas 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (Musa spp .) and Pineapple (Ananas comosus (L . **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375–2379, 2001.
- CUESTA, G. et al. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. **Journal of environmental management**, v. 95 Suppl, p. S280-4, mar. 2012.
- DE SOUZA, R. S. C. et al. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v. 6, n. June, p. 1–15, 2016.
- DE SOUZA ANTONIO, C. et al. Diazotrophic bacteria associated to sugarcane

varieties cropped at Northeast Region of Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 4, p. 272–280, 2016.

DEPOORTER, E. et al. Burkholderia: an update on taxonomy and biotechnological potential as antibiotic producers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5215–5229, 2016.

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

DOBRTSA, A. P.; SAMADPOUR, M. Transfer of eleven species of the genus Burkholderia to the genus Paraburkholderia and proposal of Caballeronia gen. nov. to accommodate twelve species of the genera Burkholderia and Paraburkholderia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 2836–2846, 2016.

DONG, M. et al. Diversity of the bacterial microbiome in the roots of four saccharum species: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, and *S. officinarum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. FEB, p. 1–10, 2018.

DOS-SANTOS, C. M. et al. A Culture-Independent Approach to Enrich Endophytic Bacterial Cells from Sugarcane Stems for Community Characterization. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 2, p. 453–465, 2017.

DOTY, S. L. Functional importance of the plant microbiome: Implications for agriculture, forestry and bioenergy. **Functional Importance of the Plant Microbiome: Implications for Agriculture, Forestry and Bioenergy**, p. 1–111, 2017.

DRECHSEL, M. M. **Antibiose de Gluconacetobacter diazotrophicus contra bactérias diazotróficas e fitopatogênica de cana-de- açúcar e caracterização molecular de genes envolvidos na síntese de substâncias antagônicas**. [s.l.: s.n.].

DUFOUR, P. et al. Construction of a composite sorghum genome map and comparison with sugarcane, a related complex polyploid. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, n. 3–4, p. 409–418, 1997.

FRANCO, H. C. J. et al. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, v. 121, n. 1, p. 29–41, fev. 2011.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E. et al. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, n. 2, p. 117–128, 1999.

GALKOVSKIY, T. et al. GiA Roots : software for the high throughput analysis of plant root system architecture. 2012.

GARCÍA-FRAILE, P. et al. Rhizobium promotes non-legumes growth and quality in several production steps: Towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

GARRIDO-SANZ, D. et al. Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, 2016.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 963401, jan. 2012.

GOMILA, M. et al. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. **Frontiers in**

Microbiology, v. 6, n. MAR, p. 1–13, 2015.

GONZÁLEZ, A. M.; VICTORIA, D. E.; MERINO, F. C. G. Efficiency of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Sugarcane. **Terra Latinoamericana**, v. 33, n. 4, p. 321–330, 2015.

GOVINDASAMY, V. et al. Functional and phylogenetic diversity of cultivable rhizobacterial endophytes of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 7, p. 925–943, 2017.

HABIBI, S. et al. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. **Plant and Soil**, v. 379, n. 1–2, p. 51–66, 2014.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, p. 95–98, 1999.

HAMONTS, K. et al. Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 124–140, 2018.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859–73, out. 2013.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, n. 347, p. 1–32, 1950.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja**, p. 36, 2011.

HUNGRIA, M.; CAMPOS, R. J.; MENDES, I. C. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO NA CULTURA DA SOJA. **Embrapa Soja**, p. 48, 2001.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V. **Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCRE** Embrapa, 2008.

IDRIS, A.; LABUSCHAGNE, N.; KORSTEN, L. Efficacy of rhizobacteria for growth promotion in sorghum under greenhouse conditions and selected modes of action studies. **The Journal of Agricultural Science**, v. 147, n. 1, p. 17, 13 nov. 2008.

JAMES, E. K. et al. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, n. 6, p. 757–766, 1994.

JESUS, J. A. DE. **Jucimara anúncio de Jesus**. [s.l: s.n.].

KHAN, A. L. et al. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 689–695, 2014.

KIMURA, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 1330, p. 111–120, 1980.

KRUASUWAN, W.; THAMCHAIPENET, A. Diversity of Culturable Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes Associated with Sugarcane Roots and Their Effect of Growth by Co-Inoculation of Diazotrophs and Actinomycetes. **Journal of Plant**

Growth Regulation, v. 35, n. 4, p. 1074–1087, 2016.

KUMAR, G. . . et al. Plant Growth Promoting *Pseudomonas* spp . from Diverse Agro-Ecosystems of India for *Sorghum bicolor* L . **Journal of Biofertilizers & Biopesticides**, v. 7, p. 2, 2012.

LAMERS, R. P. et al. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. **BMC Evolutionary Biology**, v. 12, n. 1, 2012.

LOPES, L. D. et al. Tropical soils are a reservoir for fluorescent *Pseudomonas* spp. biodiversity. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 62–74, 2018.

LOPES, L. D.; PEREIRA E SILVA, M. DE C.; ANDREOTE, F. D. Bacterial abilities and adaptation toward the rhizosphere colonization. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–13, 2016.

LUO, S. et al. Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1745–1753, 2012.

MAGNANI, G. S. et al. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 250–258, 2010.

MAGNANI, G. S. et al. Culture-independent analysis of endophytic bacterial communities associated with Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 4549–4558, 2013.

MAREQUE, C. et al. Isolation , characterization and plant growth promotion effects of putative bacterial endophytes associated with sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench). p. 1057–1067, 2015.

MENDES, R. et al. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7259–7267, 2007.

MILANI, K. M. L.; MACHINESKI, O.; BALOTA, E. L. OCORRÊNCIA E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, p. 1345–1351, 2011.

MING, R. et al. Detailed alignment of *Saccharum* and *Sorghum* chromosomes: Comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. **Genetics**, v. 150, n. 4, p. 1663–1682, 1998.

MONTAÑEZ, A. et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21–28, 2012.

MOREIRA, F. S. et al. Functional abilities of cultivable plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum* L .) crops. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 1, p. 111–121, 2016.

MOUSAVI, S. A. et al. Phylogeny of the *Rhizobium*-*Allorhizobium*-*Agrobacterium* clade supports the delineation of *Neorhizobium* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 208–215, 2014.

MOUSAVI, S. A. et al. Revised phylogeny of *Rhizobiaceae*: Proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations.

Systematic and Applied Microbiology, v. 38, n. 2, p. 84–90, 2015.

MÜLLER, D. B. et al. The Plant Microbiota: Systems-Level Insights and Perspectives. **Annual Review of Genetics**, v. 50, n. 1, p. 211–234, 2016.

MUÑOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. **Microbial Ecology**, v. 46, n. 4, p. 454–464, 2003.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 2, p. 157–164, 1999.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, n. 1–2, p. 23–32, jun. 2006.

OLIVEIRA, A. L. M. et al. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 106–113, jan. 2008.

OLIVEIRA, A. L. M. DE et al. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 56, 22 set. 2014.

ORMEÑO-ORRILLO, E. et al. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 1–26, 2012.

PATIL, N. .; SHINDE, S. R. Isolation, molecular characterization and plant growth promoting traits of *Neosasaia Chiangmaiensis* (KD) from banana. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 5, n. 1, p. 309–319, 2014.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E. The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 57, n. October 2017, p. 106–116, 2018.

PEREIRA, P. et al. Analysis of the Bacterial Diversity Associated with the Roots of Maize (*Zea mays* L.) through Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. **ISRN Ecology**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

PISA, G. et al. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 12, p. 1215–1221, dez. 2011.

RADEMAKER, J. L. .; DE BRUIJIN, F. . CHARACTERIZATION AND CLASSIFICATION OF MICROBES BY REP-PCR GENOMIC FINGERPRINTING AND COMPUTER-ASSISTED PATTERN ANALYSIS. **DNA markers: Protocols, Applications and Overviews**, p. 1995–1998, 1996.

REIS JUNIOR, F. et al. Levantamento e quantificação de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 985–994, 2000a.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar

- cane\r(Saccharum spp.). **Plant and Soil**, v. 219, n. 1981, p. 153–159, 2000b.
- RODRIGUES, A. A. et al. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane 1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 2, p. 149–158, 2016.
- RODRÍGUEZ-BLANCO, A.; SICARDI, M.; FRIONI, L. Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, n. 3, p. 391–402, 2015.
- SÁEZ-NIETO, J. A. et al. *Paenibacillus* spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species. **New Microbes and New Infections**, v. 19, p. 19–27, 2017.
- SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method : A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.
- SAWANA, A.; ADEOLU, M.; GUPTA, R. S. Molecular signatures and phylogenomic analysis of the genus burkholderia: Proposal for division of this genus into the emended genus burkholderia containing pathogenic organisms and a new genus paraburkholderia gen. nov. harboring environmental species. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. NOV, p. 1–22, 2014.
- SCHULTZ, N. et al. INOCULATION OF SUGARCANE WITH DIAZOTROPHIC BACTERIA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 6, p. 407–414, 2014.
- SCHULTZ, N. et al. Produtividade e diluição isotópica de ¹⁵N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1594–1601, 2016.
- SCHULTZ, N. et al. Yield of sugarcane varieties and their sugar quality grown in different soil types and inoculated with a diazotrophic bacteria consortium. **Plant Production Science**, v. 20, n. 4, p. 366–374, 2017.
- SILVA, M. F. DA. **Uso de Inoculante Polimérico contendo Bactérias Diazotróficas na Cultura da Cana-de-açúcar**. [s.l: s.n.].
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. et al. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2014.
- TAKAHASHI, T.; SATOH, I.; KIKUCHI, N. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16s rRNA gene sequence analysis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 725–728, 1999.
- TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–2729, 2013.
- TAULÉ, C. et al. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 35–49, 26 out. 2011.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting , position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**,

v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

URQUIAGA, S. et al. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 5–21, 22 out. 2011.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 407–438, 1996.

VERMA, P. et al. Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of Bacilli associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 44–58, 2016.

VERSALOVIC, J. et al. **Microbial DNA typing by automated repetitive sequence-based PCR. Methods in Molecular and Cellular Biology**, 1994.

WANG, A.; ASH, G. J. Whole Genome Phylogeny of *Bacillus* by Feature Frequency Profiles (FFP). **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–14, 2015.

WANG, J. et al. Microcollinearity between autopolyploid sugarcane and diploid sorghum genomes. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, 2010.

WANG, Q. et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

XIE, J. B. et al. Comparative Genomic Analysis of N₂-Fixing and Non-N₂-Fixing *Paenibacillus* spp.: Organization, Evolution and Expression of the Nitrogen Fixation Genes. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 3, 2014.

YEOH, Y. K. et al. The core root microbiome of sugarcanes cultivated under varying nitrogen fertilizer application. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1338–1351, 2016.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the Phototrophic *Rhizobium* Strain BTAil by Polymerase Chain Reaction-Based Sequencing of a 16S rRNA Gene Segment. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 7, p. 2271–2277, 1991.

**CAPÍTULO 3 - EFICIÊNCIA AGRONÔMICA DE INOCULANTES CONTENDO
BACTÉRIAS DO GÊNERO *AZOSPIRILLUM* sp. E *RHIZOBIUM* sp. PARA A
CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR SOB CONDIÇÕES DE CAMPO**

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar possui enorme impacto na economia brasileira, sendo uma cultura de caráter estratégico do ponto de vista econômico, social e energético. Apesar do aumento observado na área ocupada com a cana-de-açúcar, esta expansão é limitada pela saturação das áreas agricultáveis e portanto, existe a necessidade de aumento da produtividade da cultura, garantindo o aumento de sua oferta no mercado a preços compatíveis aos derivados de petróleo. O desenvolvimento contínuo de técnicas de manejo, cultivares, maquinários e a capacitação de produtores, seguindo preceitos globais de sustentabilidade, devem ser considerados uma prioridade para este setor.

O aumento da produtividade para a cultura da cana-de-açúcar é possível através da adoção de tecnologias e técnicas de manejo que possibilitem uma melhor qualidade nutricional e fitossanitária das plantas. Neste sentido, a aplicação de fertilizantes minerais e outros insumos químicos pode aumentar a disponibilização de nutrientes para as plantas e diminuir as perdas relacionadas a problemas fitossanitários, possibilitando o aumento da produtividade da cana-de-açúcar. Por outro lado, o uso indiscriminado de insumos químicos pode levar a um desequilíbrio no balanço energético da cultura e ao aumento no custo de produção, além do potencial em ocasionar problemas ambientais. A utilização de insumos biotecnológicos – como a tecnologia de inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), constitui uma das formas de se alcançar uma maior disponibilidade e eficiência de uso dos nutrientes disponíveis para as plantas em seu ambiente de cultivo. A adoção da tecnologia de inoculação com BPCV pode proporcionar uma diminuição da quantidade de fertilizantes químicos aplicados na cultura da cana-de-açúcar, levando à diminuição dos custos de produção e consequente favorecimento de um balanço energético extremamente positivo para a cultura (URQUIAGA, ALVES, BODDEY, 2005).

Tradicionalmente, a cultura da cana-de-açúcar recebe poucos insumos principalmente nas regiões de plantio do Norte e Nordeste, sendo mais tecnicada nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste. Esta característica explica em parte a baixa produtividade da cana-de-açúcar no Brasil, que se observa estagnada em cerca de 76 toneladas por hectare, há mais de uma década (CONAB). Segundo dados da FIESP, a baixa produtividade observada na última década decorreu da diminuição nos tratamentos culturais, idade avançada dos canaviais, problemas climáticos

e de mecanização agrícola, que começaram a ser revertidos na safra 2013/14. O setor sucroalcooleiro do Brasil conta com uma grande capacidade de investimento em pesquisa, desenvolvimento e inovação, que compreende estruturas públicas e privadas que atuam desde o melhoramento da cana-de-açúcar, ao desenvolvimento de insumos, maquinários e formas de manejo mais adequadas para as diferentes condições edafoclimáticas de cada região de cultivo. Além disso, existe a necessidade de substituição das variedades periodicamente, devido ao declínio decorrente do cultivo continuado ao longo dos anos (CESNIK, 2004).

A utilização de BPCV como insumo biotecnológico para a cultura da cana-de-açúcar vem se tornando uma realidade no Brasil, iniciada a partir dos estudos realizados pelo grupo da pesquisadora Johanna Döbereiner na década de 1970, e culminando com o lançamento de uma formulação inoculante pela Embrapa Agrobiologia (EMBRAPA, 2009), ainda sem registro junto ao MAPA. Os resultados experimentais têm evidenciado o efeito aditivo/sinérgico de diferentes espécies bacterianas sobre a promoção do crescimento da cana-de-açúcar, o que tem levado à escolha de uma mistura de cinco espécies como inoculante (OLIVEIRA et al., 2006). Dado o exposto, e considerando a capacidade associativa de estirpes de *A. brasilense* e seus efeitos comprovados na promoção do crescimento das mais distintas espécies vegetais, sustenta-se a necessidade de estudos de viabilidade de sua aplicação como insumo agrícola – inoculante – na cultura da cana-de-açúcar, por exemplo. Existe registro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o uso e comercialização de inoculantes agrícolas contendo estirpes de *Azospirillum brasilense* para as culturas do milho, trigo e arroz. Com o objetivo de determinar a viabilidade de uso da formulação comercial AzoTotal e Inoculante UEL na cultura da cana-de-açúcar, bem como verificar a melhor forma de aplicação em condições de campo, foi realizado um ensaio agrônomo junto à propriedade da Companhia Melhoramentos Norte do Paraná (Jussara, PR), e avaliados os efeitos sobre os parâmetros de produtividade em cana planta da variedade RB867515.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área e delineamento experimental

O ensaio foi conduzido no município de Jussara, Estado do Paraná, nas dependências da Fazenda Jussara (23° 34' 10" S, 52° 26' 08" W), pertencente à Companhia Melhoramentos Norte do Paraná (CMNP). O solo da área experimental é classificado como Latossolo Vermelho Álico de textura média (LVa3.1). De acordo com a classificação climática de Köppen (1948), o clima local é do tipo Cfa (clima temperado úmido com verão quente). Os meses de dezembro e janeiro possuem os maiores índices de precipitação, sendo que as maiores temperaturas ocorrem no verão (dezembro a março). Os meses com menor índice de precipitação são julho e agosto, e as menores temperaturas são registradas em junho e julho (IAPAR, 2014).

Foi utilizada a variedade de cana-de-açúcar RB867515, a mais cultivada no Brasil. Esta variedade possui como característica o desenvolvimento rápido e crescimento ereto, alto teor de sacarose e alta produtividade, com boa brotação na planta e socas, com recomendação para plantio em ambientes de média fertilidade sendo responsiva em ambientes de produção com fertilidade elevada. Também possui tolerância à escaldadura, mosaico e carvão, sendo resistente à ferrugem marrom (RIDESA, 2010).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com parcelas subdivididas e quatro repetições, em que os tratamentos representaram quatro níveis de inoculação (ausência de inoculação, inoculação no sulco, inoculação em cobertura e inoculação no sulco com reinoculação em cobertura), sob duas doses de fertilizante nitrogenado na forma de ureia (0 e 30 kg ha⁻¹ de N), (Tabela 1). A adubação com P e K foi realizada conforme a análise de solo e aplicada em dose única, 30 dias antes do início do ensaio. A colheita e análise dos parâmetros de produtividade foram realizadas após 13 meses do plantio.

Tabela 1 Descrição dos tratamentos para conduzidos para a determinação da eficiência agrônômica de inoculantes em cana-de-açúcar.

Tratamentos			
Trat.	Codificação	Nível de adubação	Nível inoculação
1	A1T1	0 kg N ha ⁻¹	sem inoculação
2	A1T2	0 kg N ha ⁻¹	inoculante AzoTotal no sulco
3	A1T3	0 kg N ha ⁻¹	inoculante UEL no sulco
4	A1T4	0 kg N ha ⁻¹	inoculante AzoTotal em cobertura
5	A1T5	0 kg N ha ⁻¹	inoculante UEL em cobertura
6	A1T6	0 kg N ha ⁻¹	inoculante AzoTotal no sulco mais cobertura
7	A1T7	0 kg N ha ⁻¹	inoculante UEL no sulco mais cobertura
8	A2T1	30 kg N ha ⁻¹	sem inoculação
9	A2T2	30 kg N ha ⁻¹	inoculante AzoTotal no sulco
10	A2T3	30 kg N ha ⁻¹	inoculante UEL no sulco
11	A2T4	30 kg N ha ⁻¹	inoculante AzoTotal em cobertura
12	A2T5	30 kg N ha ⁻¹	inoculante UEL em cobertura
13	A2T6	30 kg N ha ⁻¹	inoculante AzoTotal no sulco mais cobertura
14	A2T7	30 kg N ha ⁻¹	inoculante UEL no sulco mais cobertura

2.2 Inoculante e inoculação

O inoculante testado neste ensaio consistiu do inoculante comercial AzoTotal, produzido pela empresa Total Biotecnologia S.A. conforme registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O inoculante AzoTotal foi formulado com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 da espécie bacteriana *Azospirillum brasilense*, na concentração de 2×10^8 células bacterianas mL⁻¹ de inoculante. Também avaliamos o inoculante desenvolvido pela UEL, constituído de duas bactérias (*A. brasilense* estirpe Ab-V5 e *Rhizobium* sp). Os inoculantes foram diluídos em água de irrigação proveniente de poço artesiano, em uma proporção de 1:100 (v/v). Posteriormente foram aplicados na dose de 15 mL por metro linear de cultivo em três tratamentos diferentes: 1) inoculação sobre toletes no sulco de plantio, imediatamente antes da cobertura dos sulcos; 2) inoculação em cobertura, aplicado diretamente sobre a base das plantas emergentes 30 dias após a cobertura dos sulcos; 3) inoculação no sulco e reinoculação em cobertura como apresentado para os tratamentos (1) e (2). A dose de inoculante aplicada correspondeu a 1 litro de inoculante diluído em 100 litros de água por hectare. A aplicação dos inoculantes foi realizada com auxílio de

um pulverizador costal manual (10 L volume), adaptado com bico aspersor tipo leque com pressão ajustada para gotas de 200 – 400 μm .

2.3 Colheita e determinações tecnológicas

Após 13 meses de plantio, realizou-se a análise de produtividade e determinações tecnológicas conforme Consecana (2006). Para análise de produtividade foi realizada a colheita da área útil do experimento, que consistiu de 2 linhas de 10 m. Os colmos da área útil de cada parcela foram pesados, em seguida foram coletados 10 colmos ao acaso que foram despontados na altura da gema apical (ponto de quebra) e levados ao laboratório da Fazenda Jussara para análise das características tecnológicas, segundo a metodologia do Sistema de Pagamento de Cana pelo Teor de Sacarose (PCTS). Após a desintegração e homogeneização dos colmos, uma alíquota de 500 g foi submetida à prensa hidráulica, de acordo com o método de Tanimoto (1964), resultando no caldo extraído, que foi utilizado para as determinações químico-tecnológicas conforme descrito abaixo.

1. Pol% caldo: determinado segundo Scheneider (1979).

2. Pol% cana (PC): calculada pela seguinte expressão:

$$PC = S \times (1 - 0,01 F) \times C, \text{ onde:}$$

S = Pol do caldo extraído

F = Fibra industrial % cana

C = fator de transformação da pol do caldo extraído em pol do caldo absoluto.

3. Brix% caldo: determinado por refratometria a 20°C (SCHENEIDER, 1979).

4. Brix% cana: determinado pela seguinte fórmula:

$$B\% C = K \times Bcp \times [(1 - FIB)/100], \text{ onde:}$$

Bcp = brix% caldo primário

FIB = fibra% cana

K = relação entre brix% do caldo absoluto e brix% do caldo primário: (arbitrado em 0,98).

5. Açúcares redutores % da cana (AR): determinado pela Técnica de Somogy, adaptada por Nelson (1944).

6. Pureza aparente da cana (%): segundo FERNANDES (2000), calculado pela seguinte equação:

$$\text{Pureza aparente \% da cana} = (\text{Pol\% cana} / \text{Brix\% cana}) \times 100$$

7. Fibra % cana: determinada segundo Fernander (2000) pela seguinte fórmula:

$$\text{Fpcts} = (0,152 \times \text{PBU} - 8,367), \text{ onde:}$$

PBU = peso úmido (gramas) do bagaço da prensa (resíduo da prensagem de 500 g de cana).

8. Umidade % cana: determinada pela pesagem do bolo úmido, antes e após secagem em estufa a 65°C, por 48 horas (até o peso constante). A umidade foi calculada da seguinte forma:

$$\text{U\%} = [(\text{Pmu} - \text{Pms}) / \text{Pmu}] \times 100, \text{ onde:}$$

U%= umidade em porcentagem

Pmu= peso da massa úmida já descontada o peso do saco

Pms= peso da massa seca já descontado o peso do saco

9. Produtividade de colmos: foi considerada a massa fresca dos colmos obtida na área útil experimental (2 linhas de 10 metros de comprimento), corrigidas para o número provável de colmos para a área de 1 ha.
10. Toneladas de Pol / ha (TPH): Quantidade de pol % cana, calculado conforme Consecana (2006), multiplicado pela produtividade de colmos.
11. Açúcar teórico recuperável, ATR (kg t colmos): calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{ATR (kg t)} = 10 \times \text{PC} \times 1,0526 \times (1 - \text{PI}/100) + 10 \times \text{AR} \times (1 - \text{PI}/100),$$

sendo AR% calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{AR\% cana} = [9,9408 - (0,1049 \times \text{Pureza caldo})] \times [1 - (0,01 \times \text{Fibra\% cana})] \times (1,0313 - 0,00575 \times \text{Fibra\% cana}).$$

PC = pol da cana, que determina a quantidade de sacarose aparente na cana-de-açúcar;

PI = a perda industrial média dos açúcares contidos na cana-de-açúcar em função dos processos industriais e tecnológicos

AR = açúcares redutores, que determina a quantidade conjunta de frutose e glicose contida na cana-de-açúcar.

1,0526 = o fator de cálculo estequiométrico de transformação da sacarose em açúcares redutores.

2.4 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) após a confirmação da distribuição normal dos dados (Shapiro-Wilk), com auxílio do programa estatístico Statistica v. 7 (StatSoft Inc.). A ocorrência de variações significativas entre os tratamentos foi resolvida pela aplicação do teste de Duncan ($\alpha = 0,10$). Os valores para o número de plantas foram corrigidos com auxílio de regressão, obtidas pela tabulação dos valores do número de perfilhos por parcela após 5 meses de plantio, e o número de colmos registrados na área útil das parcelas no momento da coleta do experimento (13 meses após o plantio). O grau de ajuste foi avaliado pelos respectivos coeficientes de determinação e pelas significâncias do coeficiente de regressão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Açúcares redutores do caldo (AR %), pureza do caldo (PC%), fibra da cana (Fib%) e umidade do colmo (UC%)

De maneira geral, os resultados sugerem que a colheita foi realizada antes que as plantas atingissem a maturação completa, o que se reflete nos elevados teores de açúcares redutores em todos os tratamentos (Tabela 2). Além disso, não houve efeito dos tratamentos (níveis de adubação ou tratamentos de inoculação) sobre as variáveis AR% e PC%, enquanto para as variáveis Fib% e UC% foram registradas diferenças significativas relacionadas aos tratamentos de inoculação, não ocorrendo efeito da adubação nitrogenada. O tratamento A2T6 (Azototal aplicado no sulco e reinoculado em cobertura, adicionado de 30 kg ha⁻¹ de N) destacou-se dos demais pelo maior teor de fibras e menor umidade. O teor de fibras, está inversamente relacionado com a capacidade de extração do caldo e consequentemente com a diminuição de perdas de sacarose (MARQUES et al., 2001; MARQUES et al., 2008). Neste sentido, o maior teor de fibras observado para o tratamento A2T6 foi acompanhado por uma diminuição significativa do valor de UC% que apresentou o menor valor dentre os tratamentos.

Tabela 2 Açúcares redutores (%), pureza do caldo (%), teores de fibra da cana (%) e umidade do colmo (%) para a variedade de cana-de-açúcar RB867515 sob diferentes tratamentos de inoculação com os inoculantes AzoTotal e UEL e diferentes doses de nitrogênio (ureia). Fazenda Jussara, PR, 2016.

Codificação dos tratamentos¹	Açúcares redutores (%)	Pureza do caldo (%)	Fibra da cana (%)	Umidade do colmo (%)
A1T1	0,698 a	85,81 a	13,57 b	71,09 b
A1T2	0,708 a	85,43 a	12,29 b	72,55 ab
A1T3	0,693 a	85,91 a	12,70 b	71,82 ab
A1T4	0,685 a	86,14 a	11,94 b	72,42 ab
A1T5	0,688 a	86,12 a	12,67 b	71,63 ab
A1T6	0,713 a	85,34 a	12,96 b	71,76 ab
A1T7	0,755 a	84,14 a	12,25 b	72,69 ab
A2T1	0,740 a	84,57 a	12,72 b	72,03 ab
A2T2	0,693 a	85,92 a	12,97 b	71,77 ab
A2T3	0,738 a	84,62 a	13,62 b	71,53 ab
A2T4	0,735 a	84,65 a	13,57 b	71,43 ab
A2T5	0,700 a	85,71 a	12,32 b	72,35 ab
A2T6	0,680 a	86,34 a	16,04 a	69,09 c
A2T7	0,730 a	84,91 a	11,87 b	73,00 a
Q.M. tratamento	0,0023	1,9728	4,4512	3,5799
Q.M resíduo	0,0031	2,5716	2,3463	1,7826
p Tratamentos	0,6899	0,6884	0,0626	0,0318
C.V. (%)	7,78	1,88	11,82	1,86

¹Os tratamentos estão definidos na Tabela 1. Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente entre si com um nível de significância de 10% pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,10$).

Sales (2013) encontrou correlação negativa entre o teor de fibras e os valores de pureza aparente (%), Brix% do caldo, Pol% da cana e ATR (kg t^{-1}), identificando esta característica como dependente do genótipo. Além disso, o aumento da conversão de açúcares solúveis em fibras insolúveis não ocorre em todas as variedades de cana-de-açúcar, como consequência do aumento da idade das plantas (maturação), podendo também ocorrer em resposta a fatores do ambiente (LONSDALE;~GOSNELL, 1976). No presente trabalho, os valores apresentados na Tabela 2 para o tratamento A2T6 sugerem um efeito de precocidade sobre o

processo de maturação da cana-de-açúcar em relação aos demais tratamentos. Estes efeitos resultaram em maior teor de fibra no colmo e menor umidade do bagaço após prensagem; além disso foram observados efeitos não significativos nos valores de AR% e pureza (%) no caldo, que apresentaram redução de 8,1% e aumento de 2,1% respectivamente, em comparação ao tratamento não inoculado correspondente (A2T1). O teor de fibra do colmo também está relacionado à maior resistência ao tombamento e maior resistência ao ataque de pragas (LAVANHOLI, 2008). Ainda com relação aos resultados apresentados na Tabela 2, o tratamento A2T7 (inoculante UEL aplicado no sulco e reinoculado em cobertura, na presença de 30 kg N ha⁻¹) apresentou o maior valor para a umidade do colmo como também o menor valor de fibras na cana (%), sugerindo que as plantas desse tratamento apresentaram o maior potencial para a recuperação de sacarose do caldo.

3.2 POL% da cana (PC), Brix% da cana (B%C), e açúcar teórico recuperável (ATR kg Mg colmos⁻¹)

Quanto aos dados tecnológicos de açúcar, nenhuma das variáveis demonstrou efeito significativo dos tratamentos, indicando ausência de efeitos de adubação com fertilizante nitrogenado e das diferentes formas de inoculação (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Pereira et al. (2011) para a variedade RB867515, em que a inoculação com uma mistura de cinco bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus* BR11281, *Herbaspirillum seropedicae* BR11335, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* BR11504, *Burkholderia tropica* BR11366, e *Azospirillum amazonense* BR11145) não resultou em diferenças significativas para os valores de fibra (%), POL (%), açúcares redutores (%), Brix (%), e ATR (kg Mg cana⁻¹) em comparação ao tratamento sem inoculação.

Tabela 3 Quantidade de sacarose aparente da cana (PC%), Brix% da cana (B%C) e açúcar teórico recuperável (ATR kg Mg⁻¹ colmos) para a variedade de cana-de-açúcar RB867515 sob diferentes tratamentos de inoculação com os inoculantes AzoTotal e Uel, e diferentes doses de nitrogênio (ureia). Fazenda Jussara, PR, 2016.

Codificação dos tratamentos¹	POL% da cana (PC)	Brix% da cana (B%C)	ATR (kg Mg colmos⁻¹)
A1T1	13,18 a	15,34 a	130,71 a
A1T2	12,97 a	15,17 a	128,90 a
A1T3	13,31 a	15,49 a	132,07 a
A1T4	13,48 a	15,64 a	133,70 a
A1T5	13,53 a	15,70 a	134,09 a
A1T6	13,05 a	15,28 a	129,67 a
A1T7	12,68 a	15,06 a	126,51 a
A2T1	12,90 a	15,25 a	128,49 a
A2T2	13,11 a	15,27 a	130,14 a
A2T3	12,57 a	14,85 a	125,21 a
A2T4	12,69 a	15,00 a	126,40 a
A2T5	13,15 a	15,34 a	130,64 a
A2T6	12,84 a	14,88 a	127,21 a
A2T7	12,85 a	15,13 a	128,03 a
Q.M. tratamento	0,3445	0,2610	28,9793
Q.M resíduo	0,5795	0,4085	42,6830
p Tratamentos	0,8446	0,8822	0,9826
C.V. (%)	5,48	4,19	5,05

Os tratamentos estão definidos na Tabela 1. Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente entre si com um nível de significância de 10% pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,10$).

3.3 N-total na massa seca (g kg⁻¹) e acúmulo de N por hectare

A Tabela 4 apresenta os resultados das determinações do teor de nitrogênio foliar das amostras, e a estimativa para o acúmulo deste nutriente por área de plantio (hectare) com base na produtividade de colmos e na relação entre peso de colmos e peso de folhas e ponteiros para a variedade RB867515. Todos os tratamentos de inoculação promoveram incrementos no acúmulo de N pelas plantas que não receberam adubação nitrogenada no plantio. Destes, destacam-se incrementos significativos observados pelo uso do inoculante AzoTotal aplicado no sulco (tratamento A1T4) ou aplicado no sulco com reinoculação em cobertura (tratamento A1T6), em que os teores de N-foliar foram equivalentes aos observados

nas plantas não inoculadas que receberam adubação nitrogenada (tratamento A2T1). Incrementos significativos no teor de N-foliar foram também observados pelo uso do inoculante UEL, quando aplicado no sulco (tratamento A1T3) ou em cobertura (tratamento A1T5), porém estes valores não atingiram aqueles obtidos pelo uso de adubação nitrogenada de plantio (tratamento A2T1). Com relação ao acúmulo de nitrogênio por área, foram observados incrementos de 34,3% e 274,4% na quantidade de N acumulada na massa verde (folhas e ponteiros) das plantas que receberam inoculação com AzoTotal aplicado no sulco em comparação às plantas não inoculadas que receberam adubação nitrogenada (tratamento A2T1) ou com plantas que não receberam adubação (tratamento A1T1), respectivamente. Em adição, exceto pelo tratamento em que foi aplicado o inoculante UEL no sulco com reinoculação em cobertura (tratamento A1T7), os demais tratamentos de inoculação promoveram incrementos significativos na quantidade de nitrogênio acumulada pelas plantas (tratamentos A1T2, A1T3, A1T5 e A1T6).

Tabela 4 Teores de nitrogênio foliar e acúmulo de nitrogênio na matéria verde (folhas e ponteiros) para a variedade de cana-de-açúcar RB867515 sob diferentes tratamentos de inoculação com AzoTotal e UEL com e sem 30 kg ha⁻¹ de N (ureia). Fazenda Jussara, PR, 2016.

Codificação dos tratamentos ¹	Teores médios de Nitrogênio foliar (g N kg matéria verde ⁻¹)	Acúmulo de Nitrogênio na matéria verde (folhas e ponteiros; kg N ha ⁻¹)
A1T1	3,73 ± 1,78 h	82,41 ± 4,38 h
A1T2	5,59 ± 0,18 fgh	122,89 ± 3,67 g
A1T3	7,69 ± 1,50 defg	163,53 ± 7,51 ef
A1T4	12,26 ± 2,19 ab	308,53 ± 43,22 a
A1T5	7,39 ± 1,62 efg	181,65 ± 18,97 e
A1T6	11,72 ± 4,87 abc	252,54 ± 31,57 bc
A1T7	3,97 ± 0,36 h	75,94 ± 12,35 h
A2T1	13,16 ± 1,26 a	229,64 ± 38,44 cd
A2T2	6,25 ± 1,46 fgh	113,32 ± 7,25 g
A2T3	8,41 ± 2,08 def	164,25 ± 14,43 ef
A2T4	10,94 ± 2,91 abcd	267,51 ± 16,63 b
A2T5	9,73 ± 2,16 bcde	211,03 ± 13,24 d
A2T6	4,81 ± 1,36 gh	117,68 ± 7,66 g
A2T7	8,77 ± 0,55 cdef	151,68 ± 21,54 f
Q.M. tratamento	28,76	20217,14
Q.M resíduo	4,39	412,89
p Tratamentos	0,00	0,00
C.V. (%)	25,65	11,65

Os tratamentos estão definidos na Tabela 1. Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente entre si a 10% de significância pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,10$).

Incrementos no teor de nitrogênio de plantas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 foram relatados na literatura (SCHULTZ et al., 2012), onde plantas inoculadas com uma mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas apresentaram maior acúmulo de N por área do que plantas adubadas com 120 kg ha⁻¹ de N. Da mesma forma, Lima (2016) identificou aumento na quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea da variedade RB867515 em resposta à inoculação com três espécies de bactérias diazotróficas, aplicadas em mistura ou isoladamente, entretanto sem encontrar diferenças significativas sobre os tratamentos controle (sem inoculação e sem adubação, ou sem inoculação e com

adubação de 40 kg ha⁻¹ de N). Apesar da existência de vários relatos apontando ganhos nutricionais significativos para a cana-de-açúcar, principalmente aqueles relacionados ao N em resposta à prática de inoculação com bactérias diazotróficas, a origem deste nutriente não foi ainda inequivocamente demonstrada. Existem indicativos de que a FBN contribua efetivamente para os incrementos nos teores deste elemento nos tecidos de plantas como a cana-de-açúcar (URQUIAGA et al., 2012), entretanto a maior capacidade de explorar reservas do solo e do subsolo, em consequência do maior desenvolvimento do sistema radicular de plantas inoculadas, também não pode ser descartada (MARCOS et al., 2016). Seja qual for o mecanismo, as plantas inoculadas apresentaram um estado nutricional superior para o N, significando um acúmulo de mais de 300 kg ha⁻¹ de N na matéria verde. Esta alta quantidade de nitrogênio, seja diretamente derivada da FBN ou o resultado da remobilização de nutrientes presentes em camadas mais profundas do solo, significa um aporte nutricional significativo e que pode ser disponibilizado para a cultura subsequente, via mineralização. Considerando que o material exportado das áreas de plantio são colmos, e que a colheita da cana sem queima será o sistema padrão, a inoculação com bactérias diazotróficas apresenta-se como ferramenta adicional para o alcance do manejo sustentável da cana-de-açúcar.

3.4 Número de colmos industrializáveis por parcela (24 m²) e número de colmos industrializáveis corrigido (10 m lineares)

Os resultados apresentados na Tabela 5 compreendem os valores médios de colmos industrializáveis obtidos na área útil das parcelas (24 m²), os respectivos valores ajustados para 10 metros lineares de cultivo, e as equações de regressão utilizadas para os ajustes. As equações de regressão apresentaram melhor ajuste para o modelo linear, e todos os modelos apresentaram significância, mesmo para aqueles com os menores valores de coeficiente de correlação. De acordo com Lima (2012), ocorrem muitas as interações entre variáveis físicas, químicas e biológicas no ambiente agrícola, o que podem resultar em uma elevada variabilidade nos resultados experimentais, de maneira que a aplicação de modelos analíticos adequados possibilita uma melhor interpretação dos resultados. Com base nos valores de colmos industrializáveis, sem o ajuste dos valores com base nos modelos de regressão, não se observam diferenças significativas entre os tratamentos testados, refletindo os elevados valores para o desvio padrão das médias para cada

tratamento. Por outro lado, após o ajuste do número de colmos de cada tratamento com auxílio dos respectivos modelos de regressão, foi possível observar uma diminuição dos valores para o desvio padrão, e a consequente diferenciação dos tratamentos em diferentes níveis de resposta.

Tabela 5 Número de colmos industrializáveis por parcela (24 m²), número de colmos industrializáveis corrigido (10 m²), e respectivos modelos de regressão utilizados para ajuste do número de colmos por parcela para a variedade de cana-de-açúcar RB867515 sob diferentes tratamentos de inoculação com AzoTotal e Inoculante UEL e diferentes doses de nitrogênio (ureia). Fazenda Jussara, PR, 2016.

Codificação dos tratamentos ¹	Número de colmos industrializáveis (24m ²)	Número de colmos corrigido (10 m ²)	Equação de regressão (coeficiente de regressão)
A1T1	166,5 ± 27,06 a	67,82 ± 1,31 c	y = 0,097 * x + 119,530 (R2=0,724)
A1T2	159,8 ± 15,50 a	67,49 ± 0,75 c	y = 0,097 * x + 119,530 (R2=0,600)
A1T3	137,8 ± 23,37 a	65,36 ± 0,91 d	y = 0,078 * x + 120,000 (R2=0,592)
A1T4	157,0 ± 11,63 a	74,23 ± 0,41 a	y = 0,070 * x + 137,470 (R2=0,923)
A1T5	159,0 ± 7,16 a	70,45 ± 0,37 b	y = 0,103 * x + 124,470 (R2=0,934)
A1T6	155,5 ± 20,83 a	63,28 ± 1,04 e	y = 0,100 * x + 111,000 (R2=0,579)
A1T7	166,5 ± 19,23 a	59,90 ± 2,00 f	y = 0,208 * x + 85,200 (R2=0,763)
A2T1	146,3 ± 21,55 a	51,09 ± 2,73 h	y = 0,253 * x + 65,133 (R2=0,908)
A2T2	157,8 ± 19,97 a	54,90 ± 2,84 g	y = 0,284 * x + 64,933 (R2=0,911)
A2T3	149,3 ± 19,09 a	58,26 ± 1,12 f	y = 0,118 * x + 98,933 (R2=0,802)
A2T4	150,5 ± 23,67 a	72,18 ± 0,96 b	y = 0,081 * x + 132,130 (R2=0,582)
A2T5	162,0 ± 19,03 a	58,85 ± 1,71 f	y = 0,180 * x + 88,533 (R2=0,936)
A2T6	151,8 ± 30,90 a	66,41 ± 0,53 cd	y = 0,034 * x + 127,600 (R2=0,092)
A2T7	142,0 ± 12,83 a	49,18 ± 1,10 i	y = 0,171 * x + 74,067 (R2=0,802)
Q.M. tratamento	297,14	952,08	
Q.M resíduo	382,98	8,73	
p Tratamentos	0,73	0,00	
C.V. (%)	12,68	2,35	

Os tratamentos estão definidos na Tabela 1. Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente entre si com um nível de significância de 10% pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,10$).

Destaca-se o efeito negativo da adubação nitrogenada sobre o número de colmos, em que praticamente todos os tratamentos de inoculação, inclusive o tratamento controle (tratamento A2T1, sem inoculação com *A. brasilense*), apresentaram diminuição no número de colmos em comparação aos respectivos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada. Considerando somente os tratamentos adubados com nitrogênio (série A2), apenas o tratamento A2T7 (inoculante UEL aplicado no sulco com reinoculação em cobertura) não promoveu incremento no número de colmos, sendo que todos os outros tratamentos de inoculação resultaram em incrementos nesta variável. Ainda considerando a série A2, destacam-se os tratamentos A2T4 (inoculante AzoTotal aplicado em cobertura) e A2T6 (inoculante AzoTotal aplicado no sulco com reinoculação em cobertura), com incrementos no número de colmos de 41,3% e 30,0% sobre o tratamento controle (A2T1), respectivamente.

As maiores produtividades foram obtidas nas parcelas onde houve inoculação com *A. brasilense* na ausência de fertilizante nitrogenado, destacando-se os tratamentos A1T4 (inoculante AzoTotal aplicado em cobertura) e A1T5 (inoculante UEL aplicado em cobertura), com incrementos de 9,5% e 3,9% em relação ao tratamento controle (A1T1), respectivamente, e incrementos de 45,3% e 37,9% em comparação ao tratamento A2T1, respectivamente. Os tratamentos A1T3, A1T6 e A1T7 resultaram em uma diminuição na densidade de colmos de 3,6%, 6,7% e 11,7% respectivamente, em comparação ao tratamento A1T1. Estudos de inoculação em cana-de-açúcar var. RB867515 realizados por Gírio et al. (2015), utilizando uma mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas, demonstraram incrementos no número de perfilhos das plantas inoculadas, independentemente do uso de fertilizante nitrogenado na dose de 50 kg ha⁻¹ de N. Da mesma forma, estudos conduzidos por Chaves et al. (2015) também demonstraram efeito positivo da inoculação de bactérias diazotróficas sobre o número de brotação da variedade RB867515. Foram também observados incrementos significativos no perfilhamento de variedades de cana-de-açúcar indianas (CoSe92423 e Co pant90223), em resposta à inoculação com diferentes isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum lipoferum* e outras espécies diazotróficas endofíticas não identificadas (SUMAN et al., 2005; CHAUHAN et al., 2010). A maioria das bactérias diazotróficas associativas possui capacidade de biossíntese de fitormônios, principalmente auxinas, como é o caso da estirpe Ab-V5 de *A. brasilense* utilizada neste estudo. O

efeito de auxinas exógenas, como as produzidas por bactérias associativas, é sugerido por influenciar a capacidade de divisão celular e promover a brotação (perfilhamento) em cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2002).

3.5 Peso médio de colmos (kg), produtividade de colmos por hectare (Mg ha⁻¹) e toneladas de sacarose por hectare (Mg POL ha⁻¹)

Os resultados de produtividade estão apresentados na Tabela 6. Não foram observadas diferenças significativas para o peso médio de colmos em resposta aos diferentes tratamentos estudados. Os valores obtidos foram semelhantes aos observados por Rodolfo Junior et al. (2016) para a variedade RB867515 cultivada em Planaltina (DF) sob irrigação, e superiores aos obtidos por Uchôa et al. (2009) e Pereira et al. (2013) para esta mesma variedade, cultivada em Boa Vista (RO) e Seropédica (RJ), respectivamente. Por outro lado, a produtividade de colmos (Mg ha⁻¹) e o rendimento bruto de sacarose (Mg POL ha⁻¹) refletiram os efeitos dos tratamentos de inoculação sobre a densidade de colmos, bem como as tendências de incremento nos valores de POL%, Brix% e ATR apresentadas na Tabela 3, resultando em diferenças significativas entre os tratamentos. Observa-se que na ausência da inoculação, a adubação com fertilizante nitrogenado (tratamento A2T1) diminuiu a produtividade de colmos e, conseqüentemente, a estimativa da produtividade de sacarose, quando comparada aos valores para o tratamento controle absoluto (A1T1), evidenciando a ausência de limitação nutricional por nitrogênio nas condições do ensaio. Além disso, a diminuição na produtividade de cana planta da variedade RB867515 em resposta à adubação nitrogenada foi também observada por Lima (2016). Apesar da importância do nitrogênio para a produtividade e longevidade dos canaviais, a cana-planta não apresenta resposta consistente à adubação nitrogenada, o que tem levado a recomendações de não-uso, ou do uso de pequenas doses (30 kg ha⁻¹ de N) nas áreas de renovação e/ou implementação de canaviais (JADOSKI et al., 2010; SCHULTZ et al., 2010). Esta baixa resposta da cana-planta ao nitrogênio pode estar relacionada com uma maior disponibilidade de nutrientes decorrentes da mineralização da matéria orgânica pelo preparo das áreas de plantio, associada à menor absorção de nutrientes pelo sistema radicular ainda em formação nas plantas jovens, à presença de reserva nutricional nos toletes e perdas do nitrogênio por lixiviação (SEGATO et al., 2006).

Tabela 6 Peso de colmos industrializáveis (kg), produtividade de colmos por hectare (Mg ha⁻¹), e toneladas de sacarose por hectare (Mg POL ha⁻¹) para a variedade de cana-de-açúcar RB867515 sob diferentes tratamentos de inoculação com AzoTotal e Inoculante UEL e diferentes doses de nitrogênio (ureia). Fazenda Jussara, PR, 2016.

Codificação dos tratamentos¹	Peso médio de colmos (kg)	Produtividade de colmos por hectare (Mg ha⁻¹)	Toneladas de sacarose por hectare (Mg POL ha⁻¹)
A1T1	2,04 ± 0,112	115,41 ± 6,14 bc	15,22 ± 1,75 bcd
A1T2	2,04 ± 0,063	114,72 ± 3,42 bcd	14,89 ± 1,33 bcde
A1T3	2,04 ± 0,116	110,92 ± 5,09 cd	14,80 ± 1,48 bcde
A1T4	2,12 ± 0,294	131,31 ± 18,40 a	17,79 ± 3,48 a
A1T5	2,19 ± 0,240	128,22 ± 13,39 ab	17,27 ± 0,80 ab
A1T6	2,13 ± 0,264	112,44 ± 14,06 cd	14,59 ± 1,20 cde
A1T7	2,00 ± 0,284	99,90 ± 16,25 de	12,74 ± 2,75 def
A2T1	2,13 ± 0,296	91,04 ± 15,24 e	11,74 ± 1,94 f
A2T2	2,07 ± 0,177	94,60 ± 6,06 e	12,42 ± 1,09 ef
A2T3	2,10 ± 0,207	101,86 ± 8,95 cde	12,84 ± 1,60 def
A2T4	2,12 ± 0,141	127,61 ± 7,93 ab	16,20 ± 1,14 abc
A2T5	2,31 ± 0,093	113,10 ± 7,10 bcd	14,88 ± 1,44 bcde
A2T6	2,31 ± 0,145	127,71 ± 8,31 ab	16,45 ± 2,24 abc
A2T7	2,20 ± 0,326	90,20 ± 12,81 e	11,61 ± 1,79 f
Q.M. tratamento	0,0359	802,67	16,07
Q.M resíduo	0,0459	125,00	3,42
p Tratamentos	0,6739	0,00	0,00
C.V. (%)	10,06	10,04	12,73

Os tratamentos estão definidos na Tabela 1. Letras iguais indicam que os tratamentos não diferem estatisticamente entre si com um nível de significância de 10% pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,10$).

Para os tratamentos que receberam adubação nitrogenada, A2T4 (inoculante AzoTotal aplicado em cobertura), A2T5 (inoculante UEL aplicado em cobertura) e A2T6 (inoculante AzoTotal aplicado no sulco com reinoculação em cobertura) apresentaram valores superiores ao tratamento controle (A2T1) para a produtividade de colmos e produtividade de sacarose. Os incrementos na produtividade de colmos para os tratamentos A2T4, A2T5 e A2T6 alcançaram valores superiores de 40,2%, 24,2% e 40,3% respectivamente, em relação ao tratamento controle (A2T1). Estes mesmos tratamentos promoveram incrementos de 38% (A2T4), 26,8% (A2T5) e 40,1% (A2T6) na produtividade de sacarose em relação ao tratamento A2T1. Os demais tratamentos não diferiram do tratamento controle com relação à

produtividade de colmos ou produtividade de sacarose. Considerando a produtividade de colmos dos tratamentos que não receberam adubação nitrogenada (série A1), apenas os tratamentos A1T4 (inoculante AzoTotal aplicado em cobertura) e A1T7 (inoculante UEL aplicado no sulco com reinoculação em cobertura) diferiram do tratamento controle (A1T1), sendo observado um aumento na produtividade sob o tratamento A1T4 e uma diminuição sob o tratamento A1T7. Dentre todos os tratamentos avaliados, a maior produtividade de colmos foi observada para o tratamento A1T4, alcançando 131,1 toneladas de colmos ha^{-1} , o que significou um incremento de 13,8% e 42,7% em relação aos tratamentos controle A1T1 e A1T2, respectivamente.

Assim como houve aumento na produtividade de colmos em resposta à inoculação com AzoTotal, também foram observados incrementos na produtividade de sacarose. Dentre os tratamentos que não receberam adubação nitrogenada (série A1), somente o tratamento A1T4 diferiu significativamente do tratamento controle A1T1, sendo que neste tratamento foi registrada a maior produtividade em sacarose para o ensaio (17,79 toneladas sacarose ha^{-1} , correspondente a um aumento de 16,9% em relação ao controle). Incrementos na produtividade de colmos e na produtividade de sacarose em resposta à inoculação com bactérias diazotróficas têm sido registrados na literatura, entretanto a maioria dos trabalhos disponíveis trata do uso de uma mistura inoculante contendo cinco diferentes espécies de bactérias (OLIVEIRA et al., 2006; PEREIRA, 2011; PEREIRA et al., 2013; GÍRIO et al., 2015; CHAVES et al., 2015; LIMA, 2016). O presente trabalho inova ao demonstrar que o inoculante comercial AzoTotal, formulado com as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* e registrado no MAPA para as culturas de milho, trigo, e arroz, também pode ser utilizada em cana-de-açúcar e resultar em incrementos significativos na produtividade.

A produtividade de sacarose nos tratamentos que receberam a dose de 30 kg ha^{-1} N (série A2) corrobora os resultados observados para outras variáveis, de que a aplicação desta dose de fertilizante nitrogenado no sulco de plantio não refletiu em incrementos no desenvolvimento ou na produtividade da variedade RB867515. Pelo contrário, os tratamentos que receberam adubação nitrogenada apresentaram diminuição efetiva na produtividade final de colmos ou sacarose. Mesmo considerando o efeito negativo da adubação nitrogenada nos parâmetros de produtividade, houve reversão destes efeitos pela maioria dos tratamentos de

inoculação, como observado para os tratamentos A2T3, A2T4, A2T5 e A2T6, que não diferiram do tratamento controle A1T1. Dentre estes tratamentos, A2T4 e A2T6 apresentaram valores de produtividade de sacarose superiores em 6,4% e 8,1% comparativamente ao controle não adubado com nitrogênio (A1T1).

Considerando as diferentes formas de manejo do inoculante comercial que foram testadas (inoculação no sulco no momento do plantio; inoculação em pós-emergência; e inoculação no sulco e em pós-emergência), os resultados apresentam fortes evidências de que o uso do inoculante em pós-emergência é mais eficiente para a cana planta, conforme demonstram os dados apresentados nas Tabelas 2 a 6. Esta maior resposta dos inoculantes aplicados em pós-emergência pode ser explicada pela própria fisiologia do desenvolvimento da cana-de-açúcar, em que o período de brotação dura de três a cinco semanas após seu plantio no solo (AUDE, 1993). Durante este período, a população do microrganismo aplicado como inoculante decai em várias ordens de magnitude e pode dificultar o estabelecimento de uma associação planta-bactéria eficiente (BASHAN et al., 1995). Além disso, uma interação planta-bactéria é dependente da troca recíproca de metabólitos, e durante a fase de brotação o metabolismo da cana-de-açúcar está direcionado à mobilização das reservas do colmo, seu transporte até os pontos de crescimento, e subsequente reorganização para formar os tecidos da nova planta (AUDE, 1993), podendo diminuir a disponibilidade de nutrientes necessários à manutenção de associações com microrganismos promotores do crescimento, como *A. brasilense*.

4 CONCLUSÃO

A utilização do inoculante AzoTotal promoveu aumento nos teores de Nitrogênio foliar e produtividade na variedade de cana-de-açúcar RB867515 em ciclo de cana planta de 13 meses, nas condições do ensaio. Os efeitos positivos sobre a produtividade foram decorrentes principalmente do aumento do número de plantas por área de cultivo, mas houve tendência de incremento nos valores de POL%, Brix% e peso médio de colmos. A adubação nitrogenada na dose de 30 kg ha⁻¹ não promoveu incrementos nos parâmetros de produtividade da variedade RB867515 de cana-de-açúcar nas condições do ensaio. A aplicação do inoculante AzoTotal demonstrou maior eficiência quando aplicado em pós emergência, em dose única e na ausência de adubação nitrogenada.

5 REFERÊNCIAS

- AUDE, M. I. S. Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar e suas relações com a produtividade. **Ciência Rural**, v. 23, p. 241-248, 1993.
- BASHAN, Y.; PUENTE, M. E.; RODRIGUEZ-MENDOZA, M. N.; TOLEDO, G.; HOLGUIN, G.; FERRERA-CERRATO, R.; PEDRIN, S. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1938-1945, 1995.
- CESNIK, R. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2004, 307p.
- CHAUHAN, H.; SHARMA, A.; SAINI, S. K. Response of sugarcane to endophytic bacterial inoculation. **Indian Journal of sugarcane technology**, v. 25, p. 1-4, 2010.
- CHAVES, V. A.; SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; REIS, V. M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 1595-1602, 2015.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar**, v. 3 – Safra 2016/17, n.1 - Primeiro Levantamento, Brasília, p. 1-66, 2016.
- CONSECANA. **Regulamento dos negócios de compra e venda de cana-de-açúcar no Estado de São Paulo: Manual de Instruções**. Piracicaba: 2006. 16p. Apostila. CONSECANA, 2006.
- EMBRAPA. **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**. Veronica Massena Reis et al. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento, 45, 22 p., 2009.
- FERNANDES, A. C. **Cálculos na agroindústria de cana-de-açúcar**. Piracicaba: STAB, 66 p., 2000.
- FIESP. **Outlook Fiesp 2023 projeções para o agronegócio brasileiro**. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. São Paulo, FIESP, 115 p., 2013.
- GÍRIO, L. A. S.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M. A. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, p. 33-43, 2015.
- IAPAR. Instituto Agrônomo do Paraná. Disponível em <http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=913>. Acesso em 21/06/2016.
- JADOSKI, C. J.; TOPPA, E. V. B; JULIANETTI, A.; HULSHOF, T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Fisiologia do desenvolvimento do estágio vegetativo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, v. 3, p. 169-176, 2010.
- KÖPPEN, W. Climatologia: com um estudio de los climas de la tierra. **Fondo de Cultura Económica**. México. 479p, 1948.

- LAVANHOLI, M. G. D. P. **Qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de açúcar e álcool.** In: Cana-de-açúcar. Campinas: IAC, 2008. p. 697-722.
- LIMA, C. G. R. **Análise linear e espacial entre alguns atributos produtivos e tecnológicos da cana-de-açúcar com o pH de um Argissolo Vermelho de Suzanópolis (SP).** Tese (Doutorado em Sistemas de Produção). Universidade Estadual Paulista, 2012, 101 p.
- Lima, D. R. M. **Fixação biológica de nitrogênio e nutrição nitrogenada em cana planta inoculadas com bactérias diazotróficas.** Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2016, 90 p.
- LONSDALE, J. E.; GOSNELL, J. M. Growth and quality of four sugarcane varieties as influenced by age and season. **Proceedings of The South African Sugar Technologists' Association**, p. 82-86, 1976.
- MARCOS, F. C. C.; IÓRIO, R. P. F.; SILVEIRA, A. P. D.; RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; LAGÔA, A. M. M. A. Endophytic bacteria affect sugarcane physiology without changing plant growth. **Bragantia**, v. 75, p. 1-9, 2016.
- MARKS BB, MEGÍAS M, NOGUEIRA MA, HUNGRIA M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *A. brasilense* inoculants with soybean and maize. **ABM Express**, v. 3, p. 1-10, 2013.
- MARQUES, M. O; MARQUES, T. A, TASSO JUNIOR, L. C. **Tecnologia do açúcar: Produção e Industrialização da cana de açúcar.** Jaboticabal: FUNEP, 166p. 2001.
- MARQUES, M.O.; MACIEL, B.F.; FIGUEIREDO, I.C.; MARQUES, T.A. Considerações sobre a qualidade da matéria-prima. In: MARQUES M.O., MUTTON, M.A., NOGUEIRA, T.A.R., TASSO JÚNIOR, L.C., NOGUEIRA, G.A., BERNARDI, J.H. **Tecnologias na agroindústria canavieira.** Jaboticabal: FCAV, 2008. p.9-16.
- NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-379, 1944.
- 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.
- OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, p. 23-32, 2006.
- PEREIRA, W. **Produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas.** Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011, 70 p.
- PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. S.; SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 363-370, 2013.
- RIDESA. Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. **Liberação nacional de novas variedades "RB" de cana-de-açúcar.** Curitiba, 64 p., 2010.

RODOLFO JUNIOR, F.; RIBEIRO JUNIOR, W. Q.; RAMOS, M. L. G.; ROCHA, O. C.; BATISTA, L. M. T.; SILVA, F. A. M. Produtividade e qualidade de variedades de cana-de-açúcar de terceira soca sob regime hídrico variável. **Nativa**, v.4, p.36-43, 2016.

SALES, L. R. Seleção de cultivares de cana-de-açúcar potenciais para a produção de cachaça artesanal. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia). Universidade Federal de Lavras, 2013, 58 p.

SCHENEIDER, F. **Sugar analysis ICUMSA methods**. Copenhagen, 265 p., 1979.

SCHULTZ, N.; LIMA, E.; PEREIRA, M. G.; ZONTA, E. Efeito residual da adubação na cana-planta e da adubação nitrogenada e potássica na cana-soca colhidas com e sem queima da palhada. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 34, p. 811-820, 2010.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO-JÚNIOR, J. B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 261-268, 2012.

SEGATO, S.V.; PINTO, A.S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J.C.M. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, Gráfica Prol, 2006. 415p.

SUMAN, A.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A. K.; YADAV, R. L. Improving sugarcane growth and nutrient uptake by inoculating *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Plant growth regulation**, v. 47, p. 155-162, 2005.