

**ANDRESA PRISCILA DE SOUZA RAMOS**

**BACTÉRIAS ASSOCIADAS A VARIEDADES DE  
CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS EM PERNAMBUCO: DIVERSIDADE  
GENÉTICA E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO**

RECIFE/PE  
AGOSTO/2011

ANDRESA PRISCILA DE SOUZA RAMOS

**BACTÉRIAS ASSOCIADAS A VARIEDADES DE  
CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS EM PERNAMBUCO: DIVERSIDADE  
GENÉTICA E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

**Orientadora:** DRA. JÚLIA KUKLINSKY SOBRAL

**Conselheiros:** DR. FERNANDO JOSÉ FREIRE  
DR. FERNANDO DINI ANDREOTE

RECIFE-PE  
AGOSTO/2011

### Ficha Catalográfica

R175b Ramos, Andresa Priscila de Souza  
Bactérias associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco: diversidade genética e produção de ácido indol acético / Andresa Priscila de Souza Ramos. -- 2011.  
128 f.: il.

Orientador (a): Júlia Kuklinsky Sobral.  
Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 2011.  
Referências.

1. Microbiologia do solo 2. Auxinas 3. Saccharum ssp.  
4. Endofíticas 5. Rizoplano I. Sobral, Júlia Kuklinsky, Orientadora  
II. Título

CDD 631.4

**ANDRESA PRISCILA DE SOUZA RAMOS**

**BACTÉRIAS ASSOCIADAS A VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADAS  
EM PERNAMBUCO: DIVERSIDADE GENÉTICA E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL  
ACÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

**Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 26 de agosto  
de 2011**

Orientadora:

Dr<sup>a</sup> Júlia Kuklinsky Sobral

Examinadores:

Dr<sup>a</sup> Ana Dolores Santiago Freitas

Dr<sup>a</sup> Carolina Etienne Rosália Silva Santos

Dr<sup>a</sup> Márcia do Vale Barreto Figueiredo



*Seja a mudança que você quer ver no mundo...*

(Dalai Lama)

*A minha família, principalmente aos meus pais, **Antônio Ramos Neto e M<sup>a</sup> Laudecí de S. Ramos**, por simplesmente **TUDO!!!!***

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar por caminhos que as vezes pareceram incertos, mas que no final sempre foram as melhores escolhas.

Aos meus pais, Antônio Ramos Neto e M<sup>a</sup> Laudecí de S. Ramos, por todo carinho e amor, pelos ensinamentos e valores passados, pelo incentivo para sempre continuar em frente e para sempre me levantar depois da queda, e por sempre acreditarem em mim, além do exemplo, fazendo com que eu deseje, um dia, criar meus filhos como eles me criaram.

A minha família, por todo o incentivo, torcida e apoio, principalmente a minha Irmã Angélica pelos momentos de descontração e a Tia Cleide, amiga para todos os momentos... Também a Tia Jane, Binho e Leyde, por estarem sempre prontos a me auxiliar..

A Prof<sup>a</sup> Dra Júlia Kuklinsky Sobral, simplesmente pelo privilégio que tive de conhecer, conviver e admirar, pelos ensinamentos passados, por buscar sempre o melhor e nos estimular a fazer o mesmo, pelo exemplo de pessoa e profissional que é e pela amizade cultivada.

Ao Prof<sup>o</sup> Alberto Einstein pelas palavras de incentivo e pelo apoio.

A Airon J. da Silva, que mesmo durante os momentos de ausência, sempre me apoiou, entendeu e auxiliou, pela paciência e por gostar de mim do jeito que sou.

Aos amigos Adelazil, Renato, Tathiana e Silvana simplesmente por comporem uma das melhores partes de mim, mesmo a distância.

Aos amigos conquistados na PGCS: Danúbia, Karen, Cybelle, Jean, e Wagner, pelos momentos de descontração e conversas científicas.

A grande família LGBM:Adjailton, Andreza Raquel, Narcizo, Camila, Jacyelle, Bruno, Jezimiel, Isanelli, Tiago, Danúbia, Everton, Arthur, Jéssica, Luana, Gilka e Williane, por me acolherem e me apoiarem e por todos os momento de descontração, mesmo nos momentos mais estressantes de trabalho, sempre tem um que nos faz sorrir.

A Marisângela, Diogo e Pedro, pois uma vez LGBM, sempre LGBM.

Ao Prof. Dr Fernando Freire, pelo apoio ao projeto.

Ao Prof. Dr Fernando Dini Andreote, pelos ensinamentos repassados e pela oportunidade de conviver como seu grupo de pesquisa (Emiliana, Júlia,

Josh e também Diogo) durante a mobilidade e também a Armando Dias pelo auxílio.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelos ensinamentos repassados.

À Socorro, pelo carinho com que nos trata e pelos inumeráveis auxílios prestados.

A UFRPE pela oportunidade de ingressar na Profissão de Engenheira Agrônoma e pelo que aprendi a cultivar por esta bela profissão.

A FACEPE pela concessão da Bolsa de estudos.

Enfim, a todos que buscam crescimento e conhecimento e que acham que sempre é possível aprender mais.

E a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho.

***OBRIGADA!!!!!!***

## SUMÁRIO

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xx
RESUMO	xxi
ABSTRACT	xxiii
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b>	01
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	03
2.1 Interação bactéria – planta	03
2.1.1 Aspectos Gerais	03
2.2 Comunidade Bacteriana Endofítica	04
2.3 Comunidade Bacteriana Associada à Rizosfera e ao Rizoplane	06
2.4 Mecanismos de Promoção de Crescimento Vegetal	08
2.5 Fitormônios	09
2.6 Auxinas	11
2.7 Estudo da Diversidade Bacteriana Associada às Plantas	12
2.7.1 Técnicas Dependentes de Cultivo - BOX-PCR	13
2.7.2 Técnicas Independentes de Cultivo – DGGE	14
2.8 A Cana-de-Açúcar	15
2.9 REFERÊNCIAS	17
<b>3. CAPÍTULO I - BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO E PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR</b>	28
RESUMO	29
ABSTRACT	31
3.1 INTRODUÇÃO	33
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.3 RESULTADOS	37
3.4 DISCUSSÃO	64
3.5 CONCLUSÕES	68
3.6 REFERÊNCIAS	69
<b>4 CAPÍTULO II- COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA A CANA SOCA E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO</b>	74
RESUMO	75
ABSTRACT	77
4.1 INTRODUÇÃO	79

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	80
4.3 RESULTADOS	85
4.4 DISCUSSÃO	100
4.5 CONCLUSÕES	104
4.6 REFERÊNCIAS	105
<b>5 CAPÍTULO III- FILOGENIA E CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO POR BACTÉRIAS ASSOCIADAS À CANA-DE- AÇÚCAR</b>	108
RESUMO	109
ABSTRACT	111
5.1 INTRODUÇÃO	113
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	114
5.3 RESULTADOS	116
5.4 DISCUSSÃO	121
5.5 CONCLUSÕES	124
5.6 REFERÊNCIAS	125
<b>6 CONCLUSÕES FINAIS</b>	128

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via dependente de triptofano, em relação ao nicho do qual foram isoladas: **ER**: endofítica de raiz e **RIZ**: rizoplano de plantas de cana-de-açúcar. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou que houve influência do nicho de isolamento ( $p < 0,05$ ). 38
- Figura 3.2.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via dependente de triptofano, em relação ao tempo de cultivo da planta hospedeira: 4 meses e 10 meses de cultivo. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou que houve influência do tempo de cultivo ( $p < 0,05$ ). 38
- Figura 3.3.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via independente de triptofano, em relação ao local de cultivo da planta hospedeira: EECAC – Carpina e Usina Petribú. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou que houve influência do local de cultivo ( $p < 0,05$ ). 39
- Figura 3.4.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via independente de triptofano, em relação ao nicho do qual foram isoladas: ER: endofítica de raiz e RIZ: rizoplano de plantas de cana-de-açúcar. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou que houve influência do nicho de isolamento ( $p < 0,05$ ). 39
- Figura 3.5.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via independente de triptofano, em relação ao tempo de cultivo da planta hospedeira: 4 meses e 10 meses de cultivo. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou que houve influência do tempo de cultivo ( $p < 0,05$ ). 41
- Figura 3.6.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via independente de triptofano, em relação ao genótipo da planta hospedeira: variedades RB92579; RB867515; e RB863129. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou que houve influência das variedades ( $p < 0,05$ ). 41

- Figura 3.7.** Distribuição das linhagens bacterianas segundo os níveis de produção de AIA, via dependente de triptofano, agrupadas de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . 42
- Figura 3.8.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via dependente de triptofano, por bactérias endofíticas de raiz de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515, RB863129), cultivadas na EECAC – Carpina, aos quatro meses de cultivo. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 44
- Figura 3.9.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}$ ), via dependente de triptofano, por bactérias endofíticas de raiz de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515, RB863129), cultivadas na Usina Petribú, aos quatro meses de cultivo. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 46
- Figura 3.10.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via dependente de triptofano, por bactérias endofíticas de raiz de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515, RB863129), cultivadas na EECAC - Carpina e na Usina Petribú, aos dez meses de cultivo. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 47
- Figura 3.11.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via dependente de triptofano, por bactérias isoladas do rizoplano de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515, RB863129), cultivadas na EECAC - Carpina e na Usina Petribú, aos quatro meses de cultivo. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 49



- Figura 3.12.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via dependente de triptofano, por bactérias isoladas do rizoplano de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515, RB863129), cultivadas na EECAC - Carpina e na Usina Petribú, aos dez meses de cultivo. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 51
- Figura 3.13.** Distribuição das linhagens bacterianas segundo os níveis de produção de AIA, via independente de triptofano, agrupadas de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . 53
- Figura 3.14.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via independente de triptofano, por bactérias endofíticas de raiz de três variedades de cana-de-açúcar, cultivadas na EECAC - Carpina e na Usina Petribú, aos quatro meses de cultivo. V1: RB92579; V2: RB87515 e V3: RB863129. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 53
- Figura 3.15.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via independente de triptofano, por bactérias endofíticas de raiz de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas na EECAC e na Usina Petribú, aos dez meses de cultivo. V1: RB92579; V2: RB87515 e V3: RB863129. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 54
- Figura 3.16.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via independente de triptofano, por bactérias isoladas do rizoplano de três variedades de cana-de-açúcar, cultivadas na EECAC - Carpina e na Usina Petribú, aos quatro meses de cultivo. V1: RB92579; V2: RB87515 e V3: RB863129. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 55

- Figura 3.17.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via independente de triptofano, por bactérias isoladas do rizoplano de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas na EECAC e na Usina Petribú, aos dez meses de cultivo. V1: RB92579; V2: RB87515 e V3: RB863129. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 55
- Figura 3.18.** Influência do local de isolamento (EECAC – Carpina e Usina Petribú) em função do tempo de cultivo das plantas de cana-de-açúcar (4 e 10 meses) sobre a produção de AIA, via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 57
- Figura 3.19.** Influência do local de isolamento (EECAC – Carpina e Usina Petribú) em função das variedades de cana-de-açúcar (RB92579; RB867515; RB863129), sobre a produção de AIA, via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 57
- Figura 3.20.** Influência do tempo de cultivo (4 e 10 meses) em função das variedades de cana-de-açúcar (RB92579; RB867515; RB863129), sobre a produção de AIA, via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 58
- Figura 3.21.** Influência do tempo de cultivo (4 e 10 meses) em função do nicho de colonização bacteriana (ER: endofíticas de raiz; e RIZ: rizoplano), sobre a produção de AIA via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 59
- Figura 3.22.** Influência do tempo de cultivo (4 e 10 meses) em função das variedades de cana-de-açúcar (RB92579; RB867515; RB863129), sobre a produção de AIA, via independente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 60

- Figura 3.23.** Influência do local de isolamento (EECAC – Carpina e Usina Petribú) em função do nicho de colonização bacteriana (ER: endofíticas de raiz; e RIZ: rizoplano), sobre a produção de AIA, via independente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 61
- Figura 3.24.** Influência do tempo de cultivo (4 e 10 meses) em função do nicho de colonização bacteriana (ER: endofíticas de raiz; e RIZ: rizoplano), sobre a produção de AIA, via independente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 61
- Figura 3.25.** Dendrograma de similaridade mostrando o agrupamento das linhagens bacterianas produtoras de AIA associadas a plantas de cana-de-açúcar, com base nas sequências obtidas pelo primer BOX A1R, através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), com *bootstrap* de 1.000 vezes. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso. 63
- Figura 4.1.** Placas de Petri do isolamento de bactérias associadas às raízes e rizosfera de plantas de cana soca, em meio de cultura TSA sólido. 86
- Figura 4.2.** Densidade populacional bacteriana em relação ao nicho de colonização bacteriana (rizosfera e endofíticas de raiz) de plantas de cana soca. Médias de três repetições. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 87
- Figura 4.3.** Densidade populacional bacteriana em relação às variedades de cana soca (RB92579; RB867515; RB863129) em cada nicho de colonização bacteriana (rizosfera e endofíticas de raiz). Médias de três repetições. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 87

- Figura 4.4.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via dependente de triptofano, em relação ao nicho do qual foram isoladas. **ER:** endofítica de raiz e **RIZ:** rizosfera. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ). 88
- Figura 4.5.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via dependente de triptofano, em relação a três variedades de cana soca (RB92579; RB867515; RB863129) das quais foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que não houve influência das variedades ( $p < 0,05$ ). 89
- Figura 4.6.** Distribuição das linhagens bacterianas segundo os níveis de produção de AIA, via dependente de triptofano, agrupadas de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . 90
- Figura 4.7.** Produção de AIA, via dependente de triptofano, por bactérias isoladas da rizosfera de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579; RB867515; RB863129), cultivadas na EECAC aos três meses de rebrota na fase soca. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 91
- Figura 4.8.** Produção de AIA, via dependente de triptofano, por bactérias endofíticas isoladas de raízes de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579; RB867515; RB863129), cultivadas na EECAC aos três meses de rebrota na fase soca. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 91
- Figura 4.9.** Influência do nicho de colonização bacteriana (ER: endofítica de raiz; Riz: rizosfera) em função das variedades de cana-de-açúcar (RB92579; RB867515; RB863129), via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 92

- Figura 4.10.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA via independente de triptofano, em relação ao nicho qual foram isoladas. **ER:** endofítica de raiz e **RIZ:** rizoplano A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência do nicho ( $p < 0,05$ ). 93
- Figura 4.11.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA via independente de triptofano, em relação às variedades (RB92579; RB867515; RB863129) de cana que foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência das variedades ( $p < 0,05$ ). 93
- Figura 4.12.** Distribuição das linhagens bacterianas segundo os níveis de produção de AIA via independente de triptofano, agrupadas de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . 94
- Figura 4.13.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via independente de triptofano, por bactérias endofíticas de raízes e da rizosfera de variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515, RB863129), cultivadas na EECAC, aos três meses de rebrota na fase soca. **ER:** Endofítica de raiz. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 95
- Figura 4.14.** Influência do nicho de colonização bacteriana (**ER:** endofítica de raiz; **Riz:** rizosfera) sobre a produção de AIA, via independente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). 95
- Figura 4.15.** Dendrograma de similaridade mostrando o agrupamento das linhagens bacterianas produtoras de AIA associadas a plantas de cana soca, com base nas sequências obtidas pelo *primer* BOX A1R, através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com *bootstrap* de 1.000 vezes. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso. **ER:** endofítica de raiz; 97

**RZ:** rizosfera; **V1:** RB92579; **V2:** RB867515 e **V3:** RB863129.

**Figura 4.16.** Perfis de DGGE obtidos após amplificação com *primers* universais para o gene 16S rRNA. **ER:** endofítica de raiz; e **RZ:** rizosfera, de três variedades (RB92579, RB867515, RB863129) de cana-de-açúcar. Cada variedade apresenta três repetições. 98

**Figura 3.17.** Dendrograma de similaridade mostrando o agrupamento das linhagens com baseados nas sequências obtidas por primers específicos para o gene 16S rDNA, através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com *bootstrap* de 1.000 vezes. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso. **ER:** endofítica de raiz; **RZ:** rizosfera; **V1:** RB92579; **V2:** RB867515 e **V3:** RB863129. 99

**Figura 5.1.** Subdivisão *Gammaproteobacteria*, família *Enterobacteriaceae*. Árvore filogenética construída pelo programa MEGA 5.0 através das sequências do 16S rDNA das linhagens UAGC70, UAGC103 e UAGC140, endofíticas de raiz e do rizoplano da cana-de-açúcar. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso (*bootstrap* de 1.000 vezes). A sequência de *Streptomyces sp.*JF799836 foi utilizada para enraizar a árvore filogenética, como grupo externo. 117

**Figura 5.2.** Subdivisão *Betaproteobacteria*, família *Burkholderiaceae*. Árvore filogenética construída pelo programa MEGA 5.0 através das sequências do 16S rDNA das linhagens UAGC76, UAGC78 e UAGC114, endofíticas de raiz e do rizoplano da cana-de-açúcar. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso (*bootstrap* de 1.000 vezes). A sequência de *Pelistega europaea* Y11890 foi utilizada para 117

enraizar a árvore filogenética, como grupo externo.

**Figura 5.3.** Curvas de crescimento e de produção de AIA em função do tempo de cultivo da linhagem UAGC70. **A:** densidade ótica ( $D.O_{600nm}$ ) via dependente e independente de triptofano; **B:** produção de AIA em  $\mu g.mL^{-1}$  via dependente e independente de triptofano. Médias de três repetições. 119

**Figura 5.4.** Curvas de crescimento e de produção de AIA em função do tempo de cultivo da linhagem UAGC78. **A:** densidade ótica ( $D.O_{600nm}$ ) via dependente e independente de triptofano; **B:** produção de AIA em  $\mu g.mL^{-1}$  via dependente e independente de triptofano. Médias de três repetições. 120

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 4.1.** Linhagens bacterianas produtoras de AIA, isoladas de plantas de cana-de-açúcar, cultivadas na Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina (EECAC).

114



RAMOS, ANDRESA PRISCILA DE SOUZA. MSc. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Agosto de 2011. Bactérias associadas a variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco: diversidade genética e produção de ácido indol acético. Orientadora: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral. Conselheiros: Prof. Dr. Fernando José Freire e Prof. Dr. Fernando Dini Andreote.

## RESUMO

A associação entre bactérias benéficas e plantas é considerada extremamente importante, pois pode promover o desenvolvimento do vegetal através da disponibilização de nutrientes, proteção e produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal, como o ácido indol acético (AIA). A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância agrícola e econômica, e sua produção crescente ainda depende de diversos insumos químicos que são onerosos e prejudicam o ambiente. Uma alternativa sustentável seria a utilização de bactérias benéficas que possam diminuir ou anular o uso desses insumos e incrementar a produção agrícola. Diante disso, os objetivos deste trabalho foram: i) selecionar e avaliar bactérias produtoras de AIA, via dependente e independente de triptofano, associadas a raízes de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco; ii) avaliar a influência dos nichos de colonização, do local e tempo de cultivo e do genótipo da planta hospedeira sobre a frequência e produção de bactérias produtoras de AIA; iii) analisar a variabilidade genética de bactérias produtoras de AIA por BOX-PCR; iv) avaliar a comunidade bacteriana não cultivável associada a cana soca; v) e avaliar a produção de AIA, de duas bactérias endofíticas, em função do tempo. Foram estudadas bactérias isoladas aos quatro e dez meses de cultivo de cana planta, coletadas na EECAC- Carpina-PE e na Usina Petribú- Lagoa de Itaenga-PE e linhagens isoladas aos três meses de rebrota na cana soca, coletadas na EECAC. Os resultados demonstraram que as plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco apresentam alta frequência de bactérias com capacidade de produzir AIA *in vitro*, via dependente e independente de triptofano, e que o local, tempo de cultivo da planta hospedeira e o nicho de colonização bacteriana influenciaram na distribuição das bactérias produtoras de AIA. Além disso, o local, tempo de cultivo, genótipo da planta hospedeira e o

nicho de colonização bacteriana influenciaram nos níveis de produção e as linhagens apresentaram alta variabilidade genética. Na cana soca, a densidade populacional bacteriana foi maior no solo rizosférico do que endofítica de raiz e também apresentaram alta frequência de bactérias com capacidade de produzir AIA *in vitro*. A análise da variabilidade e diversidade genética revelaram alta variabilidade genética entre as bactérias produtoras de AIA e a predominância de grupos bacterianos dominantes, não cultivados, no solo e no interior das raízes de cana soca, cultivadas em Pernambuco. Algumas linhagens endofíticas de raiz de cana planta, com capacidade de produzir AIA, foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Enterobacter*.

**Palavras-chave:** Auxinas, bactérias endofíticas, *Saccharum spp.*, triptofano, rizoplano.

RAMOS, ANDRESA PRISCILA DE SOUZA. MSc. at Universidade Federal Rural de Pernambuco, August 2011. Bacteria associated of varieties of sugar cane cultivated in Pernambuco: genetic diversity and indole acetic acid production. Adviser: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral. Co-Adviser: Prof. Dr. Fernando José Freire e Prof. Dr. Fernando Dini Andreote.

## ABSTRACT

The association between bacteria and plants is considered extremely important because it may promote the plant development by providing nutrients, protection, and production of plant growth promoting substances like indole acetic acid (IAA). The sugarcane production is under a great economic and agricultural importance, and increasing its production still depending on several chemical inputs that are expensive and environmentally damaging. A sustainable alternative is the use of beneficial bacteria that may diminish or abolish the use of these inputs and increase agricultural production. Therefore, the objectives of this study were: i) selecting and evaluating IAA-producing bacteria, dependent and independent pathway of tryptophan, sugarcane roots plant association in crop fields in Pernambuco, ii) evaluate the influence of niche isolation, the place of cultivation, the cultivation time and host plant genotype on frequency and IAA-producing bacteria; iii) Analyze the genetic variability of IAA-producing bacteria by BOX-PCR, and iv) assess the non-cultivable bacterial community sugarcane ratoon-associated v) Evaluate the production of IAA, two endophytic bacteria according to the time. Isolates were studied at four and ten months sugarcane plant cultivation, collected in EECAC Carpina-PE and Petribú factory, Lagoa de Itaenga-PE and isolates from three months on sugarcane plant-ratoon regrowth, collected in EECAC. The results showed that plants from sugarcane crop fields in Pernambuco have a high frequency of bacteria producing IAA in vitro by a tryptophan-dependent and independent pathways, the crop place, cultivation time of the host plant and niche colonization. Bacterial influence on the distribution of IAA-producing bacteria. In addition, the location, time of cultivation of the host plant genotype and bacterial niche colonization influenced the production levels. The strains showed high genetic variability. In sugarcane plant-ratoon, the bacterial population density was higher than in the rizhosphericsoil and root-endophytic

bacteria also showed a high frequency capacity to produce IAA in vitro. Analysis of variability and genetic diversity revealed high genetic variability among bacteria producing IAA and the predominance of dominant bacterial groups not grown in soil and inside the roots of sugarcane plant-ratoon grown in Pernambuco. Some strains of root endophytic sugarcane plant, with capacity to produce IAA, were identified as belonging to the genus *Enterobacter* and *Burkholderia*.

**Key words:** auxin, endophytic bacteria, *Saccharum spp.*, tryptophan, rhizosphere

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As bactérias associadas às plantas colonizam diferentes nichos, como a rizosfera e o rizoplane (epifíticas da raiz) e endofiticamente na raiz, que se mostram ambientes propícios para o desenvolvimento bacteriano, pois apresentam a deposição das substâncias secretadas pelas raízes. Essas substâncias são ricas em fontes de carbono, vitaminas, reguladores de crescimento e nutrientes que estimulam a atividade microbiana e a diversidade de espécies ali existentes.

Estas apresentam diferentes mecanismos de interação, que podem ser influenciados por fatores intrínsecos aos próprios micro-organismos, às plantas hospedeiras e a fatores ambientais. Entretanto, quando em associação com as plantas, as bactérias podem ser neutras ou benéficas, sendo encontradas habitando o hospedeiro de forma endofítica ou epifítica.

As bactérias endofíticas, epifíticas e do solo podem trazer benefícios a planta hospedeira, como a disponibilização de nutrientes, proteção microbiológica e produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal através da produção de metabólitos secundários, ricos em substâncias, que são utilizados pelas plantas para promover o seu desenvolvimento. Dentre estes metabólitos, estão as substâncias promotoras de crescimento vegetal, como os fitormônios. O ácido indol acético (AIA), que faz parte do grupo das auxinas, é o fitormônio encontrado em maiores quantidades nos vegetais, e também o mais estudado e produzido, de forma idêntica, por bactérias promotoras de crescimento.

As principais funções do ácido indol acético são promover o alongamento celular, divisão, diferenciação celular e de tecidos, e a formação radicular, além disso, também aumenta a proporção do xilema e a resistência a fatores de estresse, quando em baixos níveis. A produção de AIA bacteriana *in vitro* pode ser afetada por diversos fatores, como por exemplo, o tempo de crescimento da cultura bacteriana no meio de cultura, onde a máxima produção de AIA geralmente ocorre na fase estacionária do crescimento bacteriano.

Para o melhor entendimento e conhecimento da microbiota e das funções que estas exercem quando em interação com as plantas, se faz necessário a aplicação de técnicas que permitam o acesso as comunidades

bacterianas cultiváveis e não cultiváveis. As técnicas dependentes de cultivo, como o isolamento, permitem o conhecimento das comunidades bacterianas que se desenvolvem fora do ambiente natural, geralmente os grupos dominantes, atingindo apenas 1% de toda comunidade presente no ambiente, enquanto que as técnicas independentes de cultivo permitem acessar não só os grupos dominantes, mas diferentes grupos existentes, geralmente através das ferramentas moleculares.

Neste contexto, a cana-de-açúcar é uma cultura de extrema importância para o mercado agrícola brasileiro, atuando como *comoditie* no mercado econômico. O Brasil é o maior produtor mundial e por isso, a cada ano, são necessários incrementos na produtividade para sustentar a demanda do mercado pelos seus produtos e subprodutos.

Portanto, os objetivos deste trabalho foram: i) selecionar bactérias associadas a raízes de plantas de cana-de-açúcar, nas fases cana planta e cana soca, com capacidade de produzir AIA; ii) quantificar a produção de AIA via dependente e independente de triptofano; iii) avaliar a influência do nicho de colonização bacteriana, local, tempo de cultivo e genótipo da planta hospedeira sobre a frequência de bactérias produtoras de AIA; iv) avaliar a variabilidade genética de bactérias produtoras de AIA, v) avaliar a diversidade bacteriana não cultivável associada plantas de cana soca; vi) identificar e analisar filogeneticamente algumas linhagens de bactérias produtoras de AIA associadas a plantas de cana-de-açúcar; vii) avaliar a produção de AIA bacteriana em função do tempo de cultivo.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1. Interação bactéria – planta**

#### **2.1.1. Aspectos Gerais**

Os micro-organismos são considerados a forma de vida mais abundante na biosfera, habitando desde os ambientes mais extremos e improváveis aos mais comuns, como por exemplo, a nossa pele (GRICE et al., 2008; CHANAL et al., 2006; LOWE et al., 1993). Os animais e plantas normalmente estão associados à alta densidade e diversidade de micro-organismos e, quando abordamos apenas a associação entre micro-organismos e plantas, é notado que existe íntima relação entre estes e seus hospedeiros, apresentando relações muito peculiares (BERG, 2009; HARDOIM et al., 2008; ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Baseando-se nas interações entre micro-organismos e plantas, Reis (2005) afirma que é possível classificá-los como benéficos, saprofíticos e fitopatogênicos. Apesar de que estes micro-organismos podem, durante o seu ciclo de vida, transitar ou permanecer em mais de uma destas classificações (HALLMANN et al., 1997).

Os fitopatogênicos são considerados aqueles que atacam tecidos vivos de folhas, colmos ou raízes, prejudicando o desenvolvimento do seu hospedeiro, enquanto que os saprófitos são definidos como aqueles que habitam tecidos em deterioração e são essenciais decomposição da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes (LUGTENBERG et al., 2002; HALLMANN et al., 1997).

Os assim chamados benéficos são aqueles que convivem em simbiose com seu hospedeiro, de maneira que nenhum dos dois venha a ser prejudicado, ou seja, o hospedeiro fornece fotossintatos, que são fonte de açúcares, carbono e nitrogênio, e em troca, os micro-organismos oferecem alguns metabólitos, defesa e disponibilização de nutrientes (HARDOIM et al., 2008; VANDENKOORNHUYSE et al., 2007). Os benéficos também podem ser classificados como micro-organismos endofíticos ou epifíticos. Em uma simples definição, epifíticos são aqueles que habitam a superfície externa do organismo

hospedeiro, enquanto que os endofíticos são aqueles que habitam o interior do hospedeiro (HALLMANN et al., 1997).

Estes micro-organismos, tanto endofíticos quanto epifíticos, podem pertencer aos domínios Archaea, Bacteria e Eucarya, este último representado, em sua maioria, pelos fungos e, até o momento, não existem relatos de comunidades pertencentes ao domínio Archaea atuando como endófitos (ANDREOTE et al., 2008).

As bactérias são o grupo de micro-organismos mais abordados nos estudos de prospecção de características aplicáveis para o desenvolvimento de insumos mais sustentáveis, seja para a indústria, agricultura ou na recuperação de áreas degradadas. Atualmente, existem diversos estudos que apontam o grande potencial existente na comunidade bacteriana presente tanto no solo quanto associada a plantas (RATHNAYAKE et al., 2009; SHENG et al., 2008; KUIPER et al., 2004; GLICK, 2003; AZEVEDO et al., 2000; GENRICH et al.; 2000).

De acordo com estas observações, percebe-se que as plantas formam um nicho bastante amplo e diversificado, que promove a colonização por micro-organismos, principalmente bactérias, tanto no interior quanto na superfície externa dos tecidos vegetais (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). E o solo também é considerado um grande reservatório microbiano. Segundo Trevors (2010), um grama de solo contém cerca de  $1 \times 10^{10}$  células bacterianas, deste modo, confirmando a alta densidade microbiana e a perspectiva de potencial biotecnológico existente.

## **2.2 Comunidade Bacteriana Associada à Rizosfera e ao Rizoplano**

O termo rizosfera foi introduzido por Hiltner em 1904, mas a definição atual vem a ser a zona que sofre influência direta das raízes e que apresenta alto nível de atividade microbiana (COMPANT et al., 2010; BERG & SMALLA, 2009; MORGAN et al., 2005; BENDING, 2003). Enquanto a rizosfera compreende a zona que sofre influência direta das raízes, o rizoplano é a superfície entre a raiz e o solo (CARDOSO & NOGUERIA, 2007), que, no entanto, sofre as mesmas influências da rizosfera, só que de forma mais intensa.



Tanto a rizosfera quanto o rizoplano se mostram benéficos para as bactérias, por serem locais de deposição das substâncias secretadas pelas raízes, ricas em fontes de carbono, vitaminas, reguladores de crescimento e nutrientes que estimulam a atividade microbiana (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009; BERG & SMALLA, 2009). Além disso, há a exsudação radicular de nutrientes estimulantes para a atividade bacteriana, havendo o estímulo da quimiotaxia bacteriana (BAIS et al., 2006), e neste contexto, Lugtenberg & Kamilova (2009) afirmam que a concentração bacteriana na rizosfera se apresenta de 10 a 1000 vezes maior que no restante do solo.

A interação entre as bactérias associadas às raízes dos vegetais é, de certa forma, mutualística, pois a planta oferece seus exsudados, ricos em nutrientes, e recebe em troca proteção contra patógenos, disponibilização de substâncias promotoras de crescimento, como os fitormônios, contribuem na obtenção de nutrientes essenciais, e auxiliam na prevenção contra a acumulação de elementos tóxicos à planta (BADRI et al., 2009; MORGAN et al., 2005), devido a estes fatos, as bactérias benéficas que habitam a rizosfera são chamadas bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPB- *Plant Growth Promotion Bacteria*) (COMPANT et al., 2010).

Diversos fatores podem influenciar a diversidade e a funcionalidade da comunidade bacteriana associada às plantas, fatores bióticos e abióticos como o clima, manejo do solo, aplicação de defensivos agrícolas, atividades antropogênicas, tipo de solo e até a própria cultura e seu manejo, bem como o genótipo, sanidade e estado de desenvolvimento da mesma (COMPANT et al., 2010; BERG, 2009; BERG & SMALLA, 2009; KUKLISNKY-SOBRAL et al., 2004). Nunam et al. (2005) estudaram a influência de diferentes espécies de gramíneas formadoras de pastagens na composição da comunidade bacteriana que habita o rizoplano e encontraram que, para esta situação específica, as diferentes espécies não exerceram diferença significativa na diversidade microbiana do rizoplano.

Na rizosfera e/ou no rizoplano, não se encontram apenas bactérias que trazem benefícios quando associadas com as raízes das plantas, também são encontradas bactérias neutras, e as que apresentam interação negativa com as plantas, como fitopatógenos (COMPANT et al., 2010). Deste modo, tanto a rizosfera quanto o rizoplano se apresentam como um sistema dinâmico, onde as interações entre raízes e bactérias apresentam grande importância tanto

para a manutenção do sistema biológico quanto para o crescimento vegetal (ORTÍZ-CASTRO et al., 2009).

Os grupos bacterianos que colonizam a rizosfera e o rizoplane também podem colonizar endofiticamente a planta, hipótese confirmada por Kuklinsky-Sobral et al. (2004), que isolaram bactérias do gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Ralstonia*, associadas a plantas de soja, encontrando-os atuando tanto de forma endofítica quanto epifítica.

### **2.3 Comunidade Bacteriana Endofítica**

Existem diversas definições para micro-organismos endofíticos, ou endófitos. A primeira definição foi fundamentada por De Bary, em 1866, estudando fungos endofíticos, para diferenciá-los de fungos patogênicos (DE BARY, 1866 apud TARKKA et al., 2008). Em 1997, Hallmann et al., complementaram a definição de endófitos como “aqueles que podem ser isolados de tecidos de plantas que tiveram suas superfícies desinfestadas, ou extraídas de dentro da planta, sem causar danos visíveis a esta”, definição esta utilizada atualmente. No entanto, Azevedo et al. (2000), complementou a definição, considerando como endófitos aqueles micro-organismos que se apresentam como os citados acima, mas que não produzem estruturas externas visíveis. Para Zhang et al. (2006), micro-organismos endofíticos são considerados todos aqueles que, durante determinada fase ou período de vida, se desenvolvem dentro do hospedeiro sem que este desenvolva algum tipo de sintoma.

Os micro-organismos endofíticos foram isolados em todas as espécies vegetais investigados até o momento (ANDREOTE et al., 2009; ANDREOTE et al., 2008; HARDOIM et al., 2008). Entretanto, as mais estudadas são as que apresentam algum tipo de interesse ou importância para a exploração agrícola, como por exemplo, algodão (MISAGHI & DONNDELINGER, 1990), arroz (VERMA et al., 2004), banana (TING et al., 2008; THOMAS, et al., 2008), café (VEGA et al., 2005), cana-de-açúcar (MAGNANI et al., 2010; VELÁZQUEZ et al., 2008; MIRZA et al., 2001; SUMAN et al., 2000), cenoura (SURETTE et al., 2003), citros (ANDREOTE et al., 2004), milho (SEGHERS et al., 2004), morango (DIAS et al., 2009; PEDRAZA et al., 2007), soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; HUNG et al., 2007), uva (COMPANT et al., 2008).

De acordo com a revisão publicada por Rosenblueth & Martinez-Romero (2006), podemos encontrar micro-organismos endofíticos em folhas, caules, raízes, sementes, frutos, túberas, dentro de óvulos e, até, dentro dos nódulos formados por bactérias associativas nas leguminosas. Apesar de colonizarem todos os órgãos vegetais, no sistema radicular são encontrados em maior densidade, por, geralmente, ser o primeiro local de colonização (SCHULZ & BOYLE, 2006). Contudo, estas bactérias podem se translocar do sistema radicular para outros órgãos através dos vasos do xilema, durante o desenvolvimento do vegetal (COMPANT et al., 2010; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004).

Uma vez dentro do hospedeiro, os endófitos podem ocupar os mesmos nichos dos patógenos (RYAN et al., 2008; BERG et al., 2005), como os espaços intercelulares, vasos do xilema, câmaras subestomáticas e no apoplasto, colonizando-os de forma sistemática (ANDREOTE et al., 2008; COMPANT et al., 2005; QUADT-HALLMANN et al., 1997; QUADT-HALLMANN & KLOEPPER, 1997), e podendo vir, ou não, a causar sintomas de patogenicidade em algum momento de seu ciclo de vida ou por causa de fatores bióticos ou abióticos que afetem o hospedeiro (ROSENBLUETH & MARTINEZ-ROMERO, 2006).

Os endófitos podem penetrar a planta hospedeira por diversas formas, como através de aberturas naturais (estômatos e lenticelas), pontos de emergência das raízes secundárias, ferimentos causados por insetos que afetam o hospedeiro e/ou pelos tratamentos culturais, ou, através da produção de enzimas hidrolíticas que podem degradar partes da parede celular do hospedeiro, facilitando, assim, sua entrada e competição com patógenos (COMPANT et al., 2010; ROTHBALLER et al., 2008; BACILIO –JIMÉNEZ et al., 2003; QUADT-HALLMANN et al. 1997).

Diversos gêneros bacterianos já foram encontrados colonizando endofiticamente as plantas, por exemplo, em plantas de café foram encontrados *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, e *Stenotrophomonas* (VEGA et al., 2005), em cana-de-açúcar foram encontrados *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Gluconacetobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Staphylococcus* e *Xanthomonas* (VELÁZQUEZ et al., 2008) e em

eucalipto *Bacillus*, *Enterococcus*, *Methylobacterium*, *Paenibacillus*, *Paracoccus* e *Sphigomonas* (FERREIRA, 2008).

## 2.4 Mecanismos de Promoção de Crescimento Vegetal

Os efeitos benéficos exercidos pelas bactérias associadas às plantas são realizados por meio do estímulo ao crescimento da planta ou por proteção microbiológica (BERG, 2009).

A proteção microbiológica, ou biocontrole, ocorre através da supressão ou resistência sistêmica a doenças e ao ataque de pragas em diversas culturas agrícolas (FIGUEIREDO et al, 2010; RYAN et al., 2008), apresentando grandes possibilidades de aplicação na produção vegetal, visando a substituição, ou redução, da utilização de defensivos químicos. As bactérias também podem produzir substâncias antifúngicas, antibacterianas ou simplesmente concorrer com os fitopatógenos pelos mesmos nichos (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009; ARAÚJO et al., 2002).

O potencial biotecnológico de micro-organismos endofíticos para biocontrole é grande, através da produção de substâncias, como as fitoalexinas (BAIS et al., 2006). Alguns autores já realizaram revisões sobre este tema, (Compant et al.,2010; Azevedo et al., 2000), e esta funcionalidade já foi confirmada em estudos que avaliaram uma bactéria endofítica, identificada como *Serratia* sp., e conseguiram inibir *in vitro* o crescimento de *Botrytis cinerea*, *Cryphonectria parasitica*, *Rhizoctonia cerealis*, *Valsa sordida* (Liu et al., 2010).

Quanto ao estímulo do crescimento vegetal, este pode ocorrer através da disponibilização de nutrientes e produção de substâncias promotoras de crescimento (COMPANT et al. 2010). A disponibilização de nutrientes pelas bactérias endofíticas pode ocorrer por meio da solubilização de fosfatos (KHAN et al, 2009; NAIK et al., 2008). Taurian et al. (2010), avaliando bactérias isoladas de amendoim, observaram que, de 433 isolados estudados, 73 apresentaram capacidade de solubilização de fosfato inorgânico *in vitro*, e que a re-inoculação destes em plantas de amendoim resultou no incremento da biomassa.

Outro nutriente, de grande importância agrícola, que pode ser disponibilizado pelas bactérias endofíticas, é o nitrogênio. As bactérias que

realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN) são chamadas bactérias diazotróficas (BALDANI et al., 2009). Mirza et al. (2001), testaram a inoculação de linhagens isoladas de folhas e caules de cana-de-açúcar, identificadas como *Enterobacter cloacae*, em mudas de cana-de-açúcar micropropagadas e observaram que esta bactérias supriram parte das necessidades das mudas, e que o nitrogênio fixado pela bactéria contribuiu com cerca de 28% do nitrogênio total encontrado nas mudas.

A produção de sideróforos por bactérias endofíticas auxilia as plantas na absorção de íons de ferro, em quantidade suficiente para suprir a demanda necessária para o seu desenvolvimento, tanto da bactéria quanto do hospedeiro, quando há a deficiência deste no meio (SHENG et al., 2008). Segundo Lugtenberg & Kamilova (2009) a maioria das bactérias tem a capacidade de produzir sideróforos, principalmente quando a mesma possui potencial para o biocontrole de patógenos, pois consegue obter o íons ferro e se desenvolver mais rápido que os patógenos. O estudo realizado por Loaces et al. (2011), que analisaram a função, diversidade e dinâmica de bactérias endofíticas produtoras de sideróforos, demonstrou que a maioria das bactérias isoladas pertenciam, principalmente, aos gêneros *Burkholderia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* e que as linhagens produtoras de sideróforos são mais frequentemente encontradas em plantas maduras do que durante o crescimento destas.

## 2.5 Fitormônios

O estímulo dos micro-organismos ao crescimento de plantas também pode ser realizado pela produção de fitormônios promotores de crescimento vegetal, onde os mais comuns são os pertencentes aos grupos das auxinas, citocininas, giberelinas, etilenos e ácido abscísico (RYAN et al., 2008; TSAVKELOVA et al., 2006; FIGUEIREDO et al. 2010b). O grupo das auxinas será abordado de forma mais aprofundada no próximo tópico.

Os fitormônios do grupo das citocininas são os responsáveis pela divisão celular e, conseqüentemente, do desenvolvimento do vegetal e, dentre elas, a zeatina é a de maior ocorrência natural (TAIZ & ZEIGER, 2006). Hussain & Hasnain (2011) isolaram bactérias rizosféricas dos gêneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Pseudomonas* de diversas plantas hospedeiras, e avaliaram a

capacidade da produção de citocininas (zeatina) *in vitro*. Como resultados, observaram que todas as linhagens estudadas produziram citocininas em níveis que variaram de 219 a 416 ng. mL<sup>-1</sup>.

A produção de giberelinas por bactérias endofíticas e da rizosfera foi tema da revisão realizada por Bottini et al. (2004), onde, segundo os autores, são os hormônios responsáveis pelo crescimento da planta através do alongamento dos internódios, controla a germinação das sementes, a transição de planta jovem para madura e o amadurecimento dos frutos (TAIZ & ZEIGER, 2006; LANG, 1970). Assim, Bastián et al. (1998) estudaram a habilidade de produção de giberelinas e ácido indol acético (AIA), um tipo de auxina, por duas linhagens bacterianas, identificadas como *Gluconoacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae*, e observaram que apenas a primeira foi competente na produção de giberelinas (13,2 ng.mL<sup>-1</sup>), mas as duas apresentaram capacidade de produção de AIA (33,4 e 7 ng.mL<sup>-1</sup>, respectivamente).

O etileno é produzido, principalmente, nas regiões meristemáticas e nós, sendo a taxa produzida dependente da fase de desenvolvimento em que a planta se encontra. Tem como funções a promoção do amadurecimento dos frutos, a expansão celular lateral, a indução da formação de raízes adventícias, indução da floração e, em grandes quantidades, aumenta a taxa de senescência foliar (TAIZ & ZEIGER, 2006). Seu precursor é o aminoácido metionina, e o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) é seu intermediário na conversão em etileno (TAIZ & ZEIGER, 2006). Ribaud et al. (2006) avaliaram a inoculação de uma linhagem de *Azospirillum* sp., em sementes de tomate e observaram o desenvolvimento das plântulas; notaram, então, que houve o incremento no desenvolvimento, tanto radicular quanto foliar, das mesmas e que este fato era devido não só a atuação do etileno produzido pela linhagem, mas também por sua atuação conjunta com o AIA.

O Acido abscísico (ABA) é responsável por controlar a dormência de gemas e sementes, e está diretamente relacionado como a resistência da planta ao estresse, principalmente o hídrico (TAIZ & ZEIGER, 2006; COHEN et al., 2008). Cohen et al. (2008) trabalharam com uma linhagem de *Azospirillum brasilense* e exploraram a mesma quanto a produção de ABA, e obtiveram níveis que variaram de 73 a 235 ng.mL<sup>-1</sup>. Quando inocularam a bactéria em

plantas de *Arabidopsis thaliana*, os níveis endógenos de ABA foram de 1,32 ng.mL<sup>-1</sup> (controle) a 3,55 ng.mL<sup>-1</sup> (planta inoculada).

Karadeniz et al. (2006) investigaram a produção *in vitro* de AIA, giberelinas, citocininas e ácido abscísico por linhagens de *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *P. vulgaris*. Os autores verificaram que todas as linhagens apresentaram a capacidade de produzir os fitormônios citados e que os níveis de produção variaram de 0,13 a 50,68 µg.mL<sup>-1</sup> de AIA; 0,84 a 70,52 µg.100mL giberelina; 0,03 a 2,29 µg.100mL<sup>-1</sup> citocininas e 0,03 a 4,20 µg.100mL<sup>-1</sup> de ABA . Logo, há bactérias capazes de produzir diferentes tipos de fitormônios, podendo beneficiar a planta por diferentes mecanismos.

## 2.6 Auxinas

As bactérias tem a capacidade de produzir metabólitos secundários, ricos em substâncias que são utilizadas pelas plantas para promover seu desenvolvimento. Dentre estes metabólitos, estão presentes as substâncias promotoras de crescimento, como os fitormônios e, dentre estes, encontra-se o grupo das auxinas (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009).

No vegetal, as auxinas (do Grego auxein = crescer) são produzidas nos ápices foliares, meristemas, frutos e sementes em desenvolvimento (TAIZ & ZEIGER, 2006, PATTEN & GLICK, 2002), e redistribuídas através dos cilindros centrais, pelo córtex e epiderme, até as raízes (KERBAUY, 2004). As auxinas são responsáveis por promover o alongamento celular, divisão, diferenciação celular e de tecidos, aumento da proporção do xilema e formação radicular, além da resistência a fatores de estresse, quando em baixos níveis (TSAVKELOVA et al., 2006; TAIZ & ZEIGER, 2006)

O grupo das auxinas é formado por diversos compostos que exibem o anel indólico, sendo o mais estudado o ácido indol acético (AIA), que é encontrado em maiores quantidades nos vegetais, e também o mais estudado e produzido, de forma idêntica, por bactérias promotoras de crescimento (PATTEN & GLICK, 1996)

PATTEN & GLICK (1996) afirmam que bactérias endofíticas, epifíticas e do solo apresentam capacidade para sintetizar AIA e que cerca de 80% das bactérias, habitantes da rizosfera, possuam a capacidade de produzi-lo. As

bactérias sintetizam AIA através de duas vias principais, uma dependente do aminoácido triptofano e outra independente deste.

Segundo TSAVKELOVA et al. (2006), as principais vias de produção de AIA bacteriano dependentes de triptofano são quatro: 1) através da conversão do triptofano em ácido 3-indol piruvato, via esta que é comum à maior parte das bactérias, sendo estas patogênicas ou não; 2) através da conversão do triptofano em aldeído 3-indol acético ou alternativamente em triptamina; 3) através da via 3-indol acetamida; 4) através da conversão do triptofano em 3-indol acetonitrila; e uma via de biossíntese de AIA independente de triptofano. De acordo com Lambrecht et al. (2000), as principais vias de biossíntese de AIA são a 3-indol acetamida e a 3-indol piruvato. Manulis et al. (1998) afirma que uma linhagem bacteriana pode apresentar mais de uma rota metabólica.

Diversos gêneros bacterianos apresentam a capacidade para produzir AIA e os principais são *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia* e *Herbaspirillum* (BHROMSIRI & BHROMSIRI, 2010; TSAVKELOVA et al., 2006).

Em estudo realizado por Ali et al. (2009), onde os autores inocularam bactérias do gênero *Bacillus*, produtoras de AIA, em sementes de *Vigna radiata* e avaliaram seu desenvolvimento, foi observado incrementos no desenvolvimento radicular das plântulas, na ordem de 30% no comprimento das folhas, 98% no número de brotações e 14% no peso da semente. Merzaeva & Shirokikh (2010) inocularam bactérias produtoras de AIA em sementes de centeio, observaram que a inoculação com uma linhagem de *Curtobacterium plantarum* aumentou em 90% a capacidade de germinação das sementes e condições controladas. Logo, estes trabalhos demonstram que bactérias produtoras de AIA podem beneficiar a planta hospedeira por diferentes mecanismos.

## **2.7 Estudo da Diversidade Bacteriana Associada às Plantas**

Conforme Van Elsas & Boersma (2011), o estudo das populações microbianas que habitam o ambiente natural é fundamental para entendermos o funcionamento dos ecossistemas. A diversidade microbiana, geralmente, é considerada o número de indivíduos de diferentes táxon e sua distribuição entre os taxa (ATLAS e BARTHA, 1998 apud LYNCH et al., 2004), enquanto



que a diversidade genética consiste na variação dos genes e do genótipo dentro dos grupos (LYNCH et al., 2004)

A evolução das metodologias de biologia molecular, aplicadas ao estudo do meio ambiente, tem contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana. Os benefícios científicos esperados a partir de um melhor conhecimento sobre a diversidade microbiana são extensos (HUNTER-CEVERA, 1998). Entre outros, estão a compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento de suas interações com outros componentes da biodiversidade, como por exemplo, as plantas. Vários estudos têm explorado a diversidade de bactérias associadas às plantas, obtendo-se novas informações para o conhecimento de mecanismos envolvidos na interação bactéria-plantas (DINI-ANDREOTE et al., 2010; ANDREOTE et al., 2009; CASE et al., 2007; KUKLINSKY-SOBRAL, et al., 2004).

Os estudos de diversidade bacteriana associada às plantas já identificaram vários gêneros bacterianos, como *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, entre outras (MENDES, et al., 2007; ANDREOTE, 2007; GOMES et al., 2003). No entanto, menos de 10% das bactérias existentes no ambiente são conhecidas, e das desconhecidas, estima-se que apenas 1 % podem ser cultivadas em condições de laboratório (HIRSCH et al., 2010).

### 2.7.1 Técnicas Dependentes de Cultivo - BOX-PCR

Dentre as diversas técnicas existentes na biologia molecular que dependem do isolamento e cultivo das comunidades bacterianas em laboratório, encontra-se o BOX-PCR. O BOX-PCR utiliza a mesma técnica que o REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromicsequence– Polimerase Chain Reaction*) que se baseia em encontrar e amplificar regiões repetitivas do genoma bacteriano (MARQUES et al., 2008). Segundo Lee & Wong (2009), a diferença entre as duas técnicas é o tipo de *primer* utilizado, sendo que a segunda utiliza o *primer* BOX A1R (5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG- 3'). Nesta técnica são amplificadas regiões repetitivas e altamente conservadas do genoma bacteriano, chamados elementos Box, que se dividem em três: BoxA, BoxB e BoxC, sendo o BoxA o mais comum. A utilização do *primer* BOX A1R

permite uma caracterização mais detalhada dos isolados, pois produz fragmentos de padrão complexo e *fingerprints* robustos, por isto, geralmente, é utilizado para diferenciar linhagens bacterianas que apresentam algum tipo de parentesco, permitindo agrupar as bactérias inter e intra-espécies (LEE & WONG, 2009; SCOTT et al. 2002).

Para exemplificar a proposição acima, Marques et al. (2008), utilizando a técnica de BOX-PCR, conseguiram agrupar 120 linhagens de *Pseudomonas syringae* e *P. viridiflava* ao nível de espécies até ao nível de patovar, enquanto que Torres et al. (2008) conseguiram encontrar entre bactérias endofíticas isoladas de nódulos radiculares, formados pela simbiose entre rizóbios e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), uma grande diversidade genética .

### 2.7.2 Técnicas Independentes de Cultivo – DGGE

As técnicas que avaliam a diversidade bacteriana utilizando o isolamento e cultivo de bactérias em laboratório, seguido da extração do DNA destas, não permite o estudo dos micro-organismos não cultiváveis presentes no ambiente amostral, restringindo a diversidade encontrada (LACAVA et al., 2006). Contudo, a técnica PCR-DGGE (*Polimerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) permite acessar a diversidade da comunidade bacteriana sem a necessidade de cultivo, diretamente do seu habitat. Salles et al. (2002) afirmam que o PCR-DGGE é uma ferramenta apropriada para estudo da diversidade de gêneros bacterianos oriundos de ambientes naturais.

O PCR-DGGE se baseia na extração do DNA diretamente da amostra, sem o cultivo microbiano, e na técnica de PCR. Pode utilizar tanto *primers* chamados universais, que acessam, a comunidade bacteriana em geral, como os que amplificam o gene 16S rRNA (gene ribossomal altamente conservado presente em todas os procariotos), quanto específicos, que amplificam genes certos grupos bacterianos ou com funções específicas como *primers* específicos que amplificam genes funcionais (FERREIRA et al., 2008; COSTA et al., 2006; LACAVA et al., 2006).

No DGGE, os fragmentos de DNA amplificados são de mesmo tamanho, porém com sequências de nucleotídeos diferentes, sendo separados em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante, e se baseia na diminuição da

mobilidade eletroforética do DNA dupla-fita parcialmente ligado, ou seja, a quantidade de G+C presente no fragmento (MUYZER & SMALLA, 1998).

Neste contexto, Salles et al. (2002) acessaram a diversidade do gênero *Burkholderia* de amostras de solo de pastagem utilizando um *primer* específico para este grupo. O estudo revelou a diferença da diversidade deste grupo específico em relação ao solo rizosférico e ao restante do solo. Andreote et al. (2009) conseguiram o acesso à diversidade da subdivisão *Alphaproteobacteria*, através da técnica de PCR-DGGE, em amostras de solo não cultivado e cultivado com eucalipto transgênico e não transgênico. O estudo revelou que não houve diferença entre a diversidade do solo não cultivado e o cultivado com o eucalipto transgênico, mas que houve diferença na diversidade entre plantas. Portanto, o PCR-DGGE revela-se como uma importante ferramenta no estudo de comunidades bacterianas associadas às plantas.

## 2.8 A Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma gramínea semi-perene pertencente a família Poaceae, englobando 30 espécies. É nativa do continente asiático e introduzida no Brasil, no início da colonização do país, em meados de 1500. É considerada um dos principais representantes das fontes de açúcar (EMBRAPA, 2010; VELÁZQUEZ et al., 2008).

Dentre as culturas agrícolas exploradas no Brasil, a cana-de-açúcar tem destaque, tanto em âmbito nacional como internacional. O país é líder mundial na produção desta e de seus derivados, produzindo na safra 2009/2010 cerca de 730 milhões de toneladas, com 45% destinados à produção de açúcar e 55% à produção de etanol (MAPA, 2011; CONAB, 2011; IBGE, 2010).

Considerando-se a diversidade bacteriana associada à cultura da cana-de-açúcar, Magnani (2005), pesquisando sobre bactérias endofíticas, encontrou gêneros como *Citrobacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiela*, *Pantoea* e *Staphylococcus*, mas predominantemente várias espécies de *Pseudomonas*, tanto na folha quanto no colmo da cana-de-açúcar.

A diversidade dos endófitos na cana-de-açúcar pode variar de acordo com o órgão vegetal analisado. Magnani et al. (2010), encontraram uma população predominante de *Pseudomonaceae* nas folhas, enquanto que nos

caules prevaleceram bactérias da família *Enterobacteriaceae*, revelando grupos específicos interagirem com regiões diferentes da planta.

Diante do abordado, percebemos a importância da associação entre bactérias e a cana-de-açúcar, sendo este um campo que ainda necessita de muitos estudos, principalmente para, com as linhagens encontradas, formular inoculantes que possam ser utilizados tanto nesta cultura quanto em outras e com isto reduzir a utilização de fertilizantes e defensivos químicos, tornando os custos de produção menores e a produção mais sustentável.

## 2.9 REFERÊNCIAS

- ALI, B.; SABRI, A. N.; LJUNG, K.; HASNAIN, S. (2009). Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). **World Journal of Microbiology Biotechnology** 25:519–526.
- ANDREOTE, F. D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 184f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo. 2007.
- ANDREOTE, F. D.; CARNEIRO, R. T.; SALLES, J. F.; MARCON, J.; LABATE, C. A.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. (2009). Culture-Independent Assessment of Rhizobiales-Related Alphaproteobacteria and the Diversity of *Methylobacterium* in the Rhizosphere and Rhizoplane of Transgenic Eucalyptus. **Microbiology Ecology** 57:82–93.
- ANDREOTE, F. D.; GULLO, M. J. M.; LIMA, A. O. S.; MACCHERONI JR, W.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L.(2004). Impact of Genetically Modified *Enterobacter cloacae* on Indigenous Endophytic Community of *Citrus sinensis* Seedlings. **The Journal of Microbiology** 42(3):169-173.
- ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. **Diversidade molecular de microorganismos endofíticos**. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD; N. P.; SILVA SANTOS, C. E. R. Microorganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura. 1Ed. Guaíba. Agrolivros, 2008. p. 233-258.
- ARAUJO, W. L., MARCON, J., MACCHERONI, W., JR., VAN ELSAS, J. D., VAN VUURDE, J. W. L., AND AZEVEDO, J. L. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied Environmental Microbiology** 68:4906-4914.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journa of Biotechnology** 3.<http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4> (12/04/2011).
- BACILIO-JIMENEZ, M. AGUILAR-FLORES, S., VENTURA-ZAPATA, E., PEREZ-CAMPOS, E., BOUQUELET, S. AND ZENTENO, E.(2003).

- Chemical characterization of radical exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effect on the chemotactic capacity of endophytic bacteria and two root and soil plant growth-promoting bacteria (*Azospirillum* and *Bacillus* spp.). **Plant and Soil** 249: 271-277.
- BADRI, V. D.; WEIR, T. L.; VAN DER LELIE, D.; VIVANCO, J. M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions. **Current Opinion in Biotechnology** 20:642–650.
- BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. (2006). The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. **Annual Review of Plant Biology** 57:233–66.
- BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R.S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F. L.; HEMERLY, A. S.; URQUIAGA, S.; ET. (2009) **Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantas da Família Poaceae (Antiga Gramineae)**. In: RIBEIRO, M. R.; NASCIMENTO, C. W. A.; RIBEIRO FILHO, M. R.; CANTALICE, J. R. B. Tópicos em ciência do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 4:203-271.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. (1998). Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation** 24: 7–11.
- BENDING, G. D. (2003). **The rhizosphere and its microorganisms**. In: Thomas B, Murphy DJ, Murray BG, eds. Encyclopaedia of applied plant sciences. London: Academic Press, 1123–1129p.
- BERG, G. & SMALLA, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology** 68:1–13.
- BERG, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology Biotechnology** 84:11–18.
- BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. (2005). The Rhizosphere as a Reservoir for Opportunistic Human Pathogenic Bacteria. **Environmental Microbiology** 7: 1673-1685.
- BHROMSIRI, C. & BHROMSIRI, A. (2010). Isolation, Screening of Growth-Promoting Activities and Diversity of Rhizobacteria from Vetiver Grass and Rice Plants. **Thai Journal of Agricultural Science** 43(4): 217-230.

- BOTTINI, R.; CASSÁN, F.; PICCOLI, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. **Applied Microbiology Biotechnology** 65: 497–503.
- CARDOSO, E. J. B. N & NOGUEIRA, M. A. **A Rizosfera e seus Efeitos na Comunidade Microbiana e na Nutrição de Plantas**. In: SILVEIRA, A. P. D. & FREITAS, S. S., (Eds.). Microbiologia do Solo e Qualidade Ambiental. Campinas, SP. Instituto Agrônomo de Campinas – IAC. Cap 5.79-92 p. 2007.
- CASE, R.J.; BOUCHER, Y.; DAHLLOF, I.; HOLMSTROM, C.; DOOLITTLE, W.F.; KJELLEBERG, S. (2007) Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, p. 278–288.
- CHANAL, A.; CHAPON, V.; BENZERARA, K.; BARAKAT, N.; CHRISTEN, R.; ACHOUAK, W.; BARRAS, F.; HEULIN, T. (2006). The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. **Environmental Microbiology** 8 (3): 514-525.
- COHEN, A. C., BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. (2008). *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in Arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation** 54:97–103.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO -CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, 3º levantamento**. dez de 2009. Brasília. 2009. 16p.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO -CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, 3º levantamento**. Jan 2011. Brasília. 2011. 18p.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, S.; SESSITSCH, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry** 30: 669-678.
- COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. **Applied and Environmental Microbiology** 71(9): 4951–4959.

- COMPANT, S.; KAPLAN, H.; SESSITSCH, A. ; NOWAK , J.; AIT BARKA, E.; CLÉMENT, C. (2008). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to in florescence tissues. **FEMS Microbiology Ecology** 63: 84- 93.
- COSTA, R.; SALLES, J. F.; BERG, G.; SMALLA, K. (2006). Cultivation-independent analysis of *Pseudomonas* species in soil and in the rhizosphere of field-grown *Verticillium dahliae* host plants. **Environmental Microbiology** 8:2136–2149.
- DIAS, A. C. F; COSTA, F. E. C; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A; ASSUMPCÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. (2009). Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology Biotechnoogy** 25:189–195.
- DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F. D.; COSTA, R.; TAKETANI, R. G.; VAN ELSAS, J.D.; ARAÚJO, W. L. (2010). Bacterial soil community in a Brazilian Sugarcane field. **Plant Soil** 336:337–349.
- EMBRAPA. **Agroecologia da cana-de-açúcar**. Disponível em:<<http://www.cana.cnpm.embrapa.br/agroeco.html>>. Acessado em: 13 de Fevereiro de 2010.
- FERREIRA, A. **Interação entre bactérias endofíticas e do rizoplano com *Eucalyptus***. 78f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz- Universidade de São Paulo. 2008.
- FERREIRA, E. P.B; DUSI, A. N.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. (2008).Rhizosphere bacterial communities of potato cultivars evaluated through PCR-DGGE profiles. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**43(5): 605-612.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; KUKLINSKY -SOBRAL, J. ; STAMFORD, T. L. M. ; ARAÚJO, Janete Magali de . **Bactérias promotoras do crescimento de plantas: estratégia para uma agricultura sustentável**. In: Figueiredo, M.V.B; Burity, H.A.; Oliveira, J.P.; Santos, C.E.do R.S.; Stamford, N. P. (Org.). *Biotecnologia aplicada à agricultura: textos de apoio e protocolos experimentais*. Brasília: EMBRAPA, 2010b. 1: 387-414.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; SELDIN, LUCY; ARAUJO, F.F.; MARIANO, R.L.R. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and**



- Applications.** In: Dinesh K. Maheshwari. (Org.). Plant growth and health promoting bacteria. Berlin: Springer, 2010, 18: 21-43.
- GENRICH, I.; BURD,D.; GEORGE, D.; GLICK. B. R. (2000). Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology** 46: 237-245.
- GLICK, B. R.( 2003). Phytoremediation: Synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. **Biotechnology Advances** 21: 383–393.
- GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; MESQUITA, J. C. P. (2003). Isolamento e, seleção e efeito de *Bacillus* spp na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**. 21(4):699-703.
- GRICE, E. A.; KONG, H. H.; RENAUD, G.; YOUNG, A. C.; BOUFFARD, G. G.; et al. (2008) A diversity profile of the human skin microbiota. **Genome Research** 18: 1043–1050.
- HALLMAN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.,; KLOEPFER, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology** 43: 895 -914.
- HARDOIM, P, R.; van OVERBEEK, L. S.; van ELSAS, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth.**Trends in Microbiology** 16(10): 463-471.
- HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H.; CLARK, I. M. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. **Soil Biology & Biochemistry** 42: 878-887.
- HUNG, P. Q.; KUMAR, S. M.; GOVINDSAMY, V.; ANNAPURNA, K. (2007). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. **Biology and Fertility of Soils** 44:155-162.
- HUNTER-CEVERA, J.C. (1998). The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology** 1:278–285.
- HUSSAIN, A. & HASNAIN, S. (2011). Interactions of bacterial cytokinins and IAA in the rhizosphere may alter phytostimulatory efficiency of rhizobacteria. **World Journal of Microbiology Biotechnology**. DOI 10.1007/s11274-011-0738-y.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola-LSPA**:. Rio de Janeiro, v.22 n.02 p.1-80 jan. 2011.

- KARADENIZ, A.; LU, Ş .F T.; INAN, S. (2006). Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 22:1061–1064.
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2004.
- KHAN, Z. M. S.; AHMED, M.; OVES, M. ( 2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, 56 (3): 263-284.
- KUIPER, I.; LAGENDIJK, E. L. ; BLOEMBERG, G. V. ; LUGTENBERG, B. J. J. (2004). Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 17:6–15.
- KUKLINSKY –SOBRAL, J. ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER , A. A.; AZEVEDO, J. L. (2004). Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology** 6(12): 1244-1251.
- LACAVA, P. T.; ANDREOTE, F. D.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. (2006). Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 41(4):.637-642.
- LAMBRECHT,M.; OKON,Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. **TRENDS IN MICROBIOLOGY** 8(7): 298-300.
- LANG, A. (1970). Gibberellins: Structure and Metabolism. **Annual Review of Plant Physiology** 21:537-570.
- LEE, A. & WONG, E. (2009). Optimization and the Robustness of BOX A1R PCR for DNA Fingerprinting Using Trout Lake *E. coli* Isolates.**Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)** 13:104-113.
- LIU, X.; JIA, J.; ATKINSON, S.; CAMARA, M.; GAO, K.; LI, H.; CAO, J. (2010). Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action. **World Journal of Microbiology Biotechnology** 26:1465–1471.
- LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F.(2011). Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microbiology Ecology** 61:606–618.
- LOWE, S. E.; JAIN, M. K.; ZEIKUS, J. G. (1993). Biology, ecology, and biotechnological applications of anaerobic bacteria adapted to

- environmental stresses in temperature, pH, salinity, or substrates. **Microbiology Review** 57(2): 451-509.
- LUGTENBERG, B. & KAMILOVA, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annual Review Microbiol.** 63:541–56.
- LUGTENBERG, B. J. J.; CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V. (2002). Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek** 81: 373–383.
- LYNCH, J. M.; BENEDETTI, A.; INSAM, H.; NUTI, M. P.; SMALLA, K.; TORSVIK, V.; NANNIPIERI, P. (2004). Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. **Biology and Fertility of Soils** 40: 363–385.
- MAGNANI, G. S.; DIDONET, C. M.; CRUZ, L. M.; PICHTH, C.F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. (2010). Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetic and Molecular Research** 9(1): 250-258.
- MAGNANI, G.S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar.** 93 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. 2005.
- MANULIS, S.; HAVIV-CHESSNER, A.; BRANDL, M. T.; LINDOW, S. E.; ISAAC. (1998). Differential Involvement of Indole-3-Acetic Acid Biosynthetic Pathways in Pathogenicity and Epiphytic Fitness of *Erwinia herbicola* pv. *Gypsophilae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 11(7): 634–642.
- MARQUES, A. S. A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON, R. (2008). BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology** 31(1): 106-115.
- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAÚJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. (2007). Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. **Applied And Environmental Microbiology** 73 (22): 7259–7267.
- MERZAEVA, O. V. & SHIROKIKH, G. I. (2010). The Production of Auxins by the Endophytic Bacteria of Winter Rye. **Applied Biochemistry and Microbiology** 46(1): 44–50.

- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA.  
Disponível  
em:[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/DesenvolvimentoSustentavel/Agroenergia/estatisticas/producao/ATUALIZACAO\\_16\\_03\\_2011/03\\_%20prod\\_cana.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/DesenvolvimentoSustentavel/Agroenergia/estatisticas/producao/ATUALIZACAO_16_03_2011/03_%20prod_cana.pdf). Acessado em: 04 de abr de 2011.
- MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant and Soil** 237: 47–54.
- MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. (1990) Endophytic bacteria in symptom free cotton plants. **Phytopathology** 80: 808-811.
- MORGAN, J. A. W.; BENDING, G. D.; WHITE, P. J. (2005). Biological costs and Benefits to plant–microbe interactions in the Rhizosphere. **Journal of Experimental Botany** 56(417): 1729–1739.
- MUYZER, G. & SMALLA, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek** 73: 127–141.
- NAIK, P. R.; RAMAN, G.; NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BMC Microbiology** 8:230.
- NUNAN, N.; DANIELL, T. J.; SINGH, B. K.; PAPERT, A.; MCNICOL, J. W.; PROSSER, J. I. (2005) Links between Plant and Rhizosphere Bacterial Communities in Grassland Soils, Characterized Using Molecular Techniques. **Applied and Environmental Microbiology** 71(11): 6784–6792.
- ORTÍZ-CASTRO, R.; CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; LÓPEZ-BUCIO, J. (2009). The role of microbial signals in plant growth and development. **Plant Signaling & Behavior** 4 (8): 701-712.
- PATTEN, C. L. & GLICK, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal Microbiology** 42: 207-220.
- PATTEN, C.L. & GLICK, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. **Applied Environmental Microbiology** 68(8): 3795-3801.

- PEDRAZA, R. O.; MOTOK, J.; TORTORA, M. L.; SALAZAR, S. M.; DÍAZ-RICCI, J. C. (2007). Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry Plants. **Plant Soil** 295:169–178.
- QUADT-HALLMANN, A. & KLOPPER, J. W. (1996). Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology** 42: 1144-1154.
- QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOPPER, J. W. (1997). Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology** 43: 254-259.
- RATHNAYAKE, I.V.N.; MEGHARAJ, M.; BOLAN, N.; NAIDU, R.(2009). Tolerance of heavy metals by gram positive bacteria, World Academy of Science, **Engineering.Technology** 53:1185–1189.
- REIS, V. M. (2005). Interações entre plantas e microrganismos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 24p. (Embrapa Agrobiologia, Documentos194).
- RIBAUDO, C. M.; KRUMPHOLZ, E. M.; CASSÁN, F. D.; BOTTINI, R.; CANTORE, M. L.; CURÁ, J. A. (2006). *Azospirillum* sp. Promotes Root Hair Development in Tomato Plants through a Mechanism that Involves Ethylene. **Journal Plant Growth Regulation** 24:175–185.
- ROSENBLUETH, M & MARTÍNEZ-ROMERO, E. (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **The American Phytopathological Society** 19(8): 827-837.
- ROTHBALLER, M.; ECKERT, B.; SCHMID, M.; FEKETE, A.;SCHLOTTER, M.; LEHNER, A.; POLLMANN, S. &HARTMANN, A. (2008) .Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. **FEMS Microbiology Ecology**, 65:85-95.
- RYAN, R.P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; et al. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters** 278: 1-9.
- SALLES, J. F.; SOUZA, F. A.; VAN ELSAS, J. D. (2002). Molecular Method To Assess the Diversity of *Burkholderia* Species in Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology** 68(4): 1595–1603.
- SCHULZ, B. & BOYLE, C. (2006) .**What are endophytes?** IN: Microbial Root Endophytes. Soil Biology 9. Springer. 1-13p.

- SCOTT, T. M.; ROSE, J. B.; JENKINS, T. M.; FARRAH, S. R.; LUKASIK, J. (2002). Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. **Applied and Environmental Microbiology** 68(12): 5796–5803.
- SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E. M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S. D. (2004). Impact of Agricultural Practices on the *Zea mays* L. Endophytic Community. **Applied and Environmental Microbiology** 70(3): 1475–1482.
- SHENG, X. F.; XIA, J.-J.; JIANG, C.-Y.; HE, L.-Y.; QIAN, M. (2008). Characterization of Heavy Metal-Resistant Endophytic Bacteria from Rape (*Brassica napus*) Roots and Their Potential in Promoting the Growth and Pb Accumulation of Rape. **Environmental Pollution** 156(3): 1164-1170.
- SUMAN, A.; SOLOMON, S.; YADAY, D. V.; GAUR, A.; SINGH, M. (2000). Post-Harvest Loss in Sugarcane Quality Endophytic Microorganisms. **Sugar Tech** , 2(4): 21 - 25.
- SURETTE, M. A.; STURZ, A. V.; LADA, R. R.; NOWAK, J. (2003). Bacterial endophytes in Processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. **Plant and Soil** 253: 381–390.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E.(2006). **Fisiologia vegetal**. 3ª Ed. Artmed. Porto Alegre.
- TARKKA, M.; SCHREY, S.; HAMPP, R. Plant Associated Soil Micro-organisms. Chapter 1. In: **Molecular Mechanisms of Plant and Microbe Coexistence**. NAUTIYAL, C. S. & DION, P. 2008. SPRINGER.
- TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. (2010). Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant Soil** 329:421–431.
- THOMAS, P.; SWARNA, G. K.; ROY, P. K.; PATIL, P. (2008). Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv. Grand Naine. **Plant Cell Tissues and Organ Culture** 93:55–63
- TING, A. S.Y.; MEON, S.; KADIR, J.; RADU, S.; SINGH, G. (2008). Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana . **BioControl** 53:541–553.

- TORRES, A. R.; ARAÚJO, W. L.; CURSINO, L.; HUNGRIA, M.; PLOTEGHER, F.; MOSTASSO, F. L.; AZEVEDO, J. L. (2008). Diversity of Endophytic Enterobacteria Associated with Different Host Plants. **The journal of Microbiology** 46(4): 373-379.
- TREVORS, J. T. (2010). One gram of soil: a microbial biochemical gene library. **Antonie van Leeuwenhoek** 97:99–106.
- TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. YU.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV A. I.(2006). Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology** 42(2): 117–126.
- VAN ELSAS, J. D.; BOERSMA, F. G. H. (2011). A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology** 47: 77-87.
- VANDENKOORNHUYSE, P.; MAHÉ, S.; INESON, P.; STADDON, P.; OSTLE, N.; CLIQUET, J.- B.; FRANCEZ, A.-J.; FITTER, A. H.; YOUNG, J. P. W. (2007). Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. **Proceedings of the National Academics of Science of the U. S. A.** 104: 16970–16975.
- VEGA, F. E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J. S. (2005). Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal of Basic Microbiology** 45(5): 371–380.
- VELÁZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M. J.; RIVAS, R. ZURDO-PIÑERO, J.L.; HEYDRICH, M.; BEDMAR, E.J.(2008). Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of Basic Microbiology**, 48: 118–124.
- VERMA, S. C.; SINGH, A.; CHOWDHURY, S. P.; TRIPATHI, A. K. (2004). Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. **Biotechnology Letters** 26: 425–429.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports** 23: 753–771.

### **3 CAPÍTULO I**

## **BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO E PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR**



RAMOS, ANDRESA PRISCILA DE SOUZA. Msc. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Agosto de 2011. Capítulo 1 - Bactérias produtoras de ácido indol acético e plantas de cana-de-açúcar. Orientadora: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral. Conselheiros: Prof. Dr. Fernando José Freire e Prof. Dr. Fernando Dini Andreote.

## RESUMO

Bactérias benéficas associadas às plantas colonizam o hospedeiro de forma epifítica ou endofítica. Estas podem apresentar a capacidade de produzir substâncias que promovam o crescimento dos vegetais, como os fitormônios. Dentre estes, um dos principais é o ácido indol acético (AIA), que pertence ao grupo das auxinas, e pode, entre outras funções, estimular o desenvolvimento radicular do vegetal. Deste modo, este trabalho teve por objetivos selecionar e avaliar bactérias com capacidade de produzir AIA, via dependente e independente de triptofano, quantificar esta produção e avaliar a influência do local, nicho de colonização, tempo de cultivo e do genótipo da planta sobre a produção e frequência de AIA, além de analisar a variabilidade genética destas bactérias. Foram avaliadas 196 bactérias, endofíticas de raiz e do rizoplane, de três variedades (RB863129, RB867515 e RB92579) de plantas de cana-de-açúcar, cultivadas em Pernambuco. Foi observado que 94% das bactérias foram capazes de produzir AIA via dependente de triptofano. Os resultados demonstraram que o tempo de cultivo e o nicho de colonização afetaram a frequência das linhagens produtoras de AIA via dependente de triptofano. Contudo, a frequência das linhagens produtoras de AIA via independente de triptofano foram afetadas pelo local, nicho, tempo de cultivo e genótipo do hospedeiro. A quantificação da produção por bactéria, em meio de cultura com acréscimo de triptofano, variou de 1 a 190  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , obtendo destaque as linhagens endofíticas de raiz UAGC522 e UAGC531, com produção de 166,46  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 161,72  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA, respectivamente, ambas isoladas aos 10 meses da variedade RB92579. Em relação às bactérias do rizoplane, destacaram-se as linhagens UAGC103 e UAGC104, com produção de 190,36  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 140,00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA, respectivamente, ambas isoladas as 4 meses da variedade RB867515. A quantificação da produção por bactéria,

via independente de triptofano, variou de 8 a  $44\mu\text{g.mL}^{-1}$ , destacando-se as linhagens UAGC70, endofítica de raiz da variedade RB863129 isolada aos 4 meses de cultivo e produzindo  $43,44\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e a UAGC140, isolada do rizoplano da variedade RB863129 aos 4 meses de cultivo, produzindo  $42,42\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A análise da variabilidade genética, pela técnica de BOX-PCR, resultou em alta variabilidade entre as linhagens analisadas, onde apenas as linhagens UAGC531 e UAGC533 apresentaram similaridade acima de 70%. Os resultados demonstram que há um grande potencial biotecnológico nas linhagens produtoras de AIA associadas as raízes de cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** auxina, genótipo, nicho de colonização, *Saccharum spp.*, tempo de cultivo, triptofano.

RAMOS, ANDRESA PRISCILA DE SOUZA. Msc.atUniversidade Federal Rural de Pernambuco. August 2011. Chapter 1. Indoleacetic acid producing-bacteria and sugarcane plants. Adviser: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral. Co-Advisers: Prof. Dr. Fernando José Freire e Prof. Dr. Fernando Dini Andreote.

## ABSTRACT

Beneficial bacteria- associated, colonize the host plant as epiphytic or endophytic. These may have the ability to produce substances that promote the growth of vegetables, such as phytohormones. Among these, one of them is the indole acetic acid (IAA), which belongs to the group of auxins, and can, among other functions, stimulate the root vegetable development. Thus, this work aimed to evaluate and select bacterias with capacity to produce IAA by a tryptophan-dependent and independent pathways and this production related to means to quantify and evaluate the influence of local, niche colonization, cultivation time and genotype on plant production IAA and frequency, and analyze the genetic variability of these bacterias. We evaluated 196 bacteria, endophytic root and rhizoplane of three varieties (RB863129, RB867515 and RB92579) plants from sugar cane crop fields in Pernambuco. It was observed that 94% of the bacteria were able to produce IAA from tryptophan dependent pathway. The results showed that the time of cultivation and niche colonization affected the frequency of strains producing IAA from tryptophan dependent pathway. However, the frequency of strains producing IAA pathway independent of tryptophan were affected by local, niche, growing time and genotype of the host. The quantification of production by bacteria in culture medium with added tryptophan, ranged from 1 to 190  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , gaining prominence strains of endophytic and root UAGC522 UAGC531, with production of 166.46  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and 161.72  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  IAA, respectively. Both 10 months- isolated, variety RB92579. Regarding the rhizoplane bacteria stood out and UAGC104 UAGC103 lines, with production of 190.36 and 140.00  $\mu\text{g.mL}^{-1}$   $\mu\text{g.mL}^{-1}$  IAA, respectively, both 4 months isolated variety RB867515. Bacterial production and quantification independent tryptophan pathway ranged from 8 to 44  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , highlighting the strains UAGC70, root endophytic variety RB863129 isolated at 4 months of growing and producing 43.44  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , and UAGC140, isolated from the rhizoplane 4 months-cultivation variety RB863129, producing 42.42  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . The analysis of genetic variability, the BOX-PCR

technique resulted in high variability between the strains analyzed, where only the strains were similar (UAGC533 and UAGC531) above 70%. The results show a great potential in biotechnology IAA production strains sugarcane roots-associated.

**Key-Words:** auxin, genotype, colonization niche, *Saccharum spp.*, cultivation time, tryptophan

### 3.1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos associados às plantas apresentam diferentes mecanismos de interação, podendo ser influenciados por fatores intrínsecos aos próprios micro-organismos, às plantas hospedeiras e a fatores ambientais (BERG, 2009; HARDOIM et al., 2008; ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Quando em associação com as plantas, as bactérias podem ser neutras ou benéficas, sendo encontradas habitando o hospedeiro de forma endofítica ou epifítica. Epifíticas são aquelas encontradas no exterior do organismo hospedeiro, enquanto que endofíticas são aquelas que habitam o interior do hospedeiro sem causar sintomas ou danos a este, e nem formar estruturas visíveis (COMPANT et al., 2010; ZHANG et al., 2006; AZEVEDO et al., 2000; HALLMANN et al., 1997). Tanto bactérias endofíticas quanto epifíticas podem trazer benefícios ao hospedeiro, como a disponibilização de nutrientes, proteção microbiológica e produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal (BADRI et al., 2009; MORGAN et al., 2005).

Dentre as substâncias promotoras de crescimento vegetal, ou fitormônios, encontra-se o grupo das auxinas, e dentre estas o ácido indol acético (AIA), que é o fitormônio encontrado em maiores quantidades nos vegetais, e também o mais estudado e produzido, de forma idêntica, por bactérias promotoras de crescimento (KARADENIZ et al., 2006; PATTEN & GLICK, 1996).

As principais funções do ácido indol acético são promover o alongamento celular, divisão, diferenciação celular e de tecidos, e a formação radicular, além disso, também aumenta a proporção do xilema e a resistência a fatores de estresse, quando em baixos níveis (TSAVKELOVA et al., 2006; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Bactérias produtoras de AIA foram relatadas interagindo com diferentes espécies de vegetais, como milho, morango, soja, trigo (EGAMBERDIYEVA & KUCHAROVA, 2009; DIAS et al., 2009; EGAMBERDIYEVA, 2007; KUKLINSKY-SOBRAAL et al., 2004), assim como na cana-de-açúcar, onde também foram encontradas bactérias produtoras de ácido indol acético associados as suas raízes (GOVINDARAJAN et al., 2007; GOVINDARAJAN et al., 2006; MIRZA et al., 2001). Estas bactérias podem promover a melhora do

desenvolvimento e arquitetura do sistema radicular, assim como no desenvolvimento de pelos radiculares, aumentando a capacidade de buscar e absorver nutrientes e água, e com isso as chances de estabelecimento da cultura (MALHOTRA& SRIVASTAVA, 2009).

Neste contexto, a cana-de-açúcar é uma cultura de extrema importância para o mercado agrícola brasileiro, atuando como *comoditie* no mercado econômico. O Brasil é o maior produtor mundial e por isso, a cada ano, são necessários incrementos na produtividade para sustentar a demanda do mercado pelos seus produtos e subprodutos (IBGE, 2010; ÚNICA, 2010).

Para diminuir a utilização de insumos químicos, alguns autores já comprovaram a eficácia da utilização de inoculantes bacterianos na cultura, como, por exemplo, Govindarajan et al. (2007) que utilizou uma linhagem de *Klebsiella sp.*, produtora de AIA e fixadora de N<sub>2</sub>, que conseguiu diminuir em 50% a utilização de adubo nitrogenado e a produção do tratamento foi maior que no tratamento que recebeu os 100% da adubação sem inóculo.

Portanto, os objetivos deste trabalho foram: i) selecionar bactérias associadas a raízes de plantas de cana-de-açúcar com capacidade de produzir AIA; ii) quantificar a produção de AIA via dependente e independente de triptofano; iii) avaliar a influência do nicho de colonização bacteriana, local, tempo de cultivo e genótipo da planta hospedeira sobre a frequência de bactérias produtoras de AIA; e iv) avaliar a variabilidade genética de bactérias produtoras de AIA.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Linhagens bacterianas**

Foram avaliadas 196 linhagens bacterianas, sendo 115 bactérias endofíticas de raízes e 81 do rizopiano de plantas de cana-de-açúcar, das variedades RB 92579, RB 867515 e RB 863129, aos 4 meses e 10 meses, cultivadas na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina (EECAC), Carpina - PE, e na Usina Petribú S/A, Lagoa de Itaenga – PE, que foram previamente isoladas em meio TSA 10%, pertencentes a coleção de culturas microbianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana da UAG/UFRPE.

As linhagens estavam estocadas a -20°C e para utilizá-las foi necessário cultivá-las em placas de Petri contendo meio de cultura sólido TSA 10% (*Trypcase Soy Agar*), para a obtenção das colônias isoladas, que foram utilizadas para a inoculação em meio TSA líquido.

### **3.2.2 Seleção de Bactérias Produtoras de *Ácido Indol Acético* - via dependente de Triptofano**

Para a seleção de bactérias produtoras de AIA via dependente de triptofano e a quantificação da produção, todas as linhagens foram inoculadas, a partir de colônias isoladas, em meio líquido TSA 10% com o acréscimo de 5mM de L-triptofano, incubadas a 28°C sob agitação constante (125 rpm), na ausência da luz, por 24 horas.

Após o período de crescimento, as amostras foram submetidas a reação colorimétrica de acordo com a metodologia de Bric et al. (1991). Dois mililitros da cultura foram centrifugados a 11764g por 5min, destes, retirou-se uma alíquota de 1 mL do sobrenadante e homogeneizou-se com 1 mL do reagente de Salkowski (2% de FeCl<sub>3</sub> 0,5M em 35% de ácido perclórico), incubou-se no escuro a 28°C durante 30 minutos. A reação foi submetida a leitura da absorbância em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 530nm. A concentração do AIA foi estimada por meio de uma curva padrão previamente estimada, utilizando valores conhecidos de AIA sintético (Vetec) 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300 e 350 µg mL<sup>-1</sup>, em meio de cultura esterilizado não inoculado (BARBOSA, 2010; ARAUJO & GUERREIRO 2010; BALDOTTO et al., 2010).

O ensaio foi realizado em triplicata e foi utilizada como controle positivo a linhagem EN303 (*Pseudomonas oryzihabitans*), bactéria endofítica de soja que é produtora de auxina (Kuklinsky-Sobral et al., 2004).

### **3.2.3 Seleção de Bactérias Produtoras de *Ácido Indol Acético* - via independente de Triptofano**

Para a seleção de bactérias produtoras de AIA via independente de triptofano e a quantificação da produção, algumas linhagens foram inoculadas,

a partir de colônias isoladas, em meio líquido TSA 10% sem o acréscimo de 5mM de L-triptofano, incubadas a 28°C sob agitação constante (125 rpm), na ausência da luz, por 24 horas.

Adotou-se a mesma metodologia descrita para a análise com adição de triptofano, como retratada acima.

### **3.2.4 Análise Estatística**

Os dados de frequência foram submetidos ao Teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para confirmar se houve ou não influencia dos fatores: local e tempo de cultivo, genótipo da planta hospedeira e nicho de colonização bacteriana sobre a distribuição das linhagens produtoras de AIA. Os dados da quantificação de produção de AIA foram transformados em  $(x+1)^{0,5}$ . para atender aos requisitos estatísticos e arranjados como fatorial dupla e submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias Scott-Knott, utilizando o software SISVAR 5.0.

### **3.2.5 Análise da Variabilidade Genética Bacteriana por BOX-PCR**

Para a análise da variabilidade genética, as linhagens bacterianas foram inoculadas, a partir de colônias isoladas, em 4 mL de meio líquido TSA 10%, incubadas a 28°C sob agitação constante (125 rpm) por 24 horas. Após o período de crescimento, a cultura foi transferida para microtubos autoclavados de 2 mL, centrifugados a 11764g por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante, e repetindo-se o procedimento até utilizar todo o meio de cultura com o crescimento bacteriano. O *pellet* formado, ao final do processo de centrifugação, foi submetido a extração de DNA genômico total, realizado através do *Bacterial Genomic DNA Isolation Kit* (Norgen), de acordo com as especificações do fabricante.

A análise da diversidade genética das linhagens foi realizada por meio da técnica BOX-PCR, utilizando o *primer* BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). As reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram preparadas para um volume final de 25  $\mu$ L contendo 0,5 a 10 ng de DNA molde; 1mM de cada dNTP; 3,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 1x do tampão da



enzima *Taq Buffer*, 1  $\mu$ M do *primer* BOX- A1R; 1x de DMSO (dimetilsufoxamida) e 0,08U da enzima *Taq DNA Polimerase* (Fermentas). A reação de PCR foi realizada em termociclador, com a seguinte condição de ciclo: 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos para desnaturação a 94°C por 2 minutos, 92°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 min, extensão de *primer* a 65°C por 1 min e seguida de extensão final a 65°C por 10 min. Após a amplificação, toda a reação de PCR foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,5% p/v) em tampão 1x TAE (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA) e corado com *Blue Green Loading Dye* (LGC Bio) e observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado.

As bandas geradas pela amplificação foram transformadas em dados binários, e com estes foi construída uma planilha que foi analisada através do software Past 1.90 (HAMMER et al., 2001), empregando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) e aplicado o Coeficiente de Jaccard para obter-se a matriz de similaridade entre as linhagens analisadas.

### 3.3 RESULTADOS

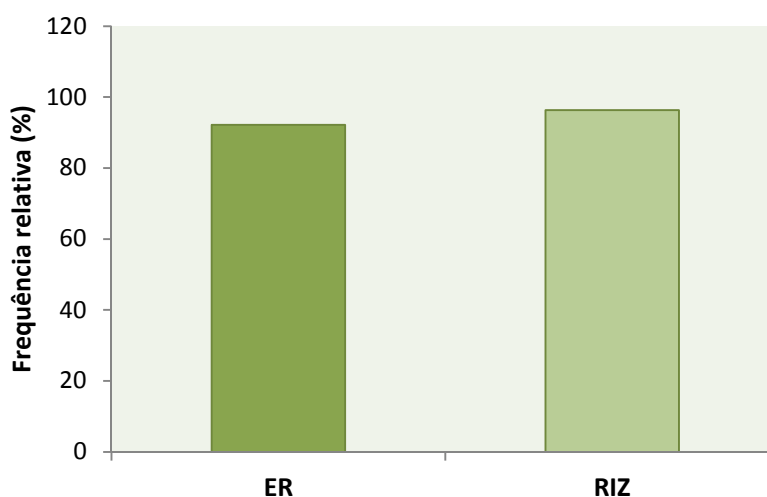
#### 3.3.1 Seleção de Bactérias Produtoras de AIA – via dependente de triptofano

Foram analisadas 196 linhagens bacterianas isoladas endofiticamente de raiz e do rizoplane de variedades de cana-de-açúcar, cultivadas em Pernambuco. Destas, avaliou-se a frequência relativa de bactérias produtoras de AIA em relação ao local de coleta, tempo de cultivo, genótipo do vegetal e nicho de colonização. Além disso, também foram avaliadas a quantificação de AIA e a variabilidade genética das linhagens produtoras de AIA.

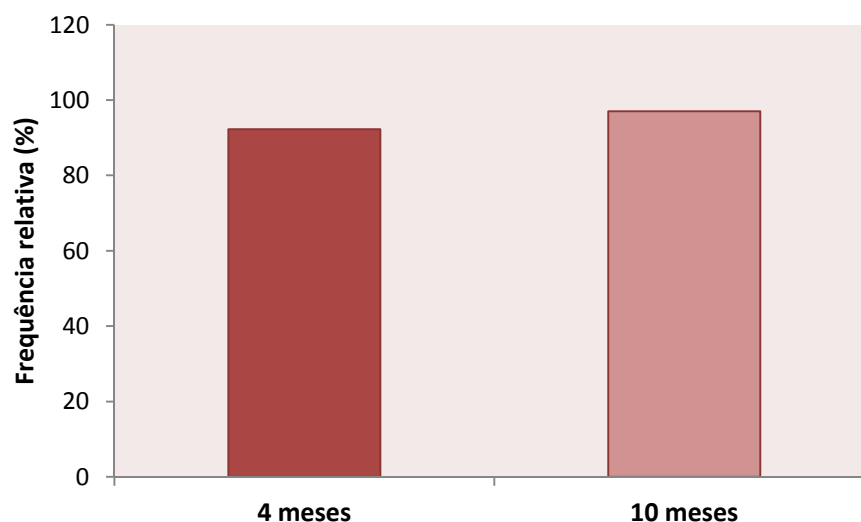
Do total avaliado, 94% foram capazes de produzir AIA, *in vitro*, com a adição de L-Triptofano no meio de cultura. A distribuição das linhagens em relação ao local de coleta foi bem semelhante, 91,5% das linhagens produtoras de AIA foram oriundas da EECAC-Carpina e 96,7 % da Usina Petribú, de modo que a aplicação do teste de  $\chi^2$  mostrou que não houve influência do local de cultivo da plantas hospedeiras.

A proporção de linhagens produtoras de AIA foi maior (96,3%) que entre as endofíticas de raiz (92,2%) com a confirmação da diferença pelo teste de  $\chi^2$  (Figura 3.1). O tempo de cultivo das plantas de cana também apresentou influência sobre a frequência de bactérias produtoras de AIA (Figura 3.2), mesmo apresentando valores próximos de distribuição, 92,3% em plantas com 4 meses e 97% em plantas com 10 meses de cultivo (Figura 3.2).

Assim como o local de cultivo, a distribuição das frequências de bactérias produtoras de AIA em relação ao genótipo do hospedeiro não apresentou diferença significativa entre as variedades de cana. As frequências encontradas foram 92,9% para a variedade RB92579; 96,9% para a RB867515 e 91,8% RB863129, entretanto, apesar o teste de  $\chi^2$  ter afirmado que as frequências não são diferentes, percebemos que a variedade RB867515 se sobressaiu em relação as demais.



**Figura 3.1.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via dependente de triptofano, em relação ao nicho do qual foram isoladas: **ER**: endofítica de raiz e **RIZ**: rizoplano de plantas de cana-de-açúcar. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou que houve influência do nicho de isolamento ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.2.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via dependente de triptofano, em relação ao tempo de cultivo da planta hospedeira: 4 meses e 10 meses de cultivo. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou que houve influência do tempo de cultivo ( $p < 0,05$ ).

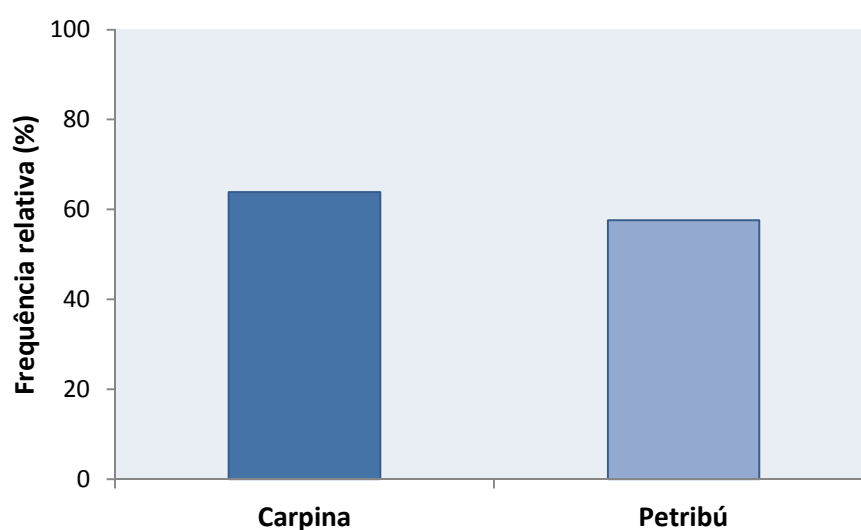
### **3.3.2 Seleção de Bactérias Produtoras de AIA – via independente de triptofano**

Além da seleção de bactérias produtoras de AIA via dependente de triptofano, também foi investigada a capacidade de algumas bactérias em produzir AIA via independente do precursor triptofano.

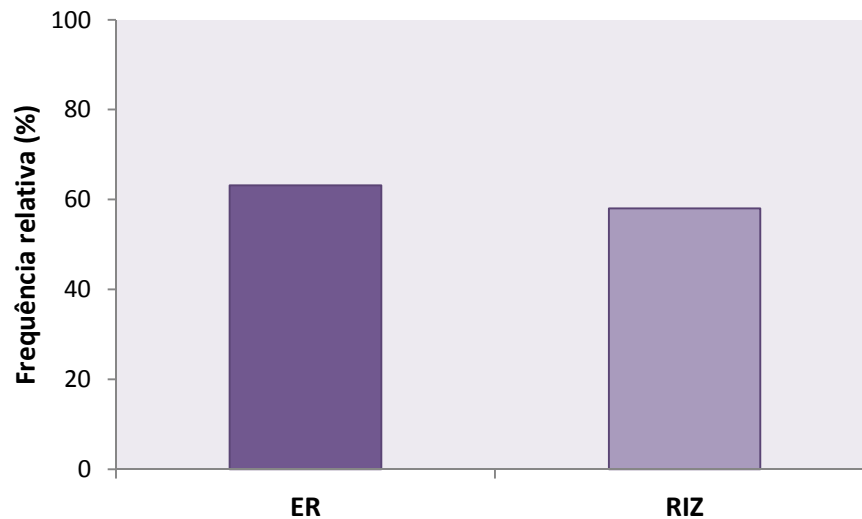
Dentre as bactérias produtoras de AIA via dependente de triptofano, 69 linhagens, sendo 38 linhagens endofíticas de raiz e 31 do rizoplano, foram selecionadas para serem avaliadas quanto a produção de AIA em meio de cultura sem a adição do aminoácido triptofano. Destas, 61% foram capazes de utilizar uma via metabólica alternativa para a produção de AIA *in vitro*.

Comparando-se a distribuição de bactérias produtoras de AIA em relação ao local de cultivo das plantas, foi observado maior frequência na EECAC do que na Usina Petribú (63,9% e 58,6%, respectivamente), com confirmação da diferença pelo teste de  $\chi^2$  (Figura 3.3). Além do local de cultivo da planta hospedeira, o nicho de isolamento também influenciou a frequência de bactérias produtoras de AIA (via independente de triptofano), com 63,2% das linhagens endofíticas de raiz e 58,1% do rizoplano (Figura 3.4).

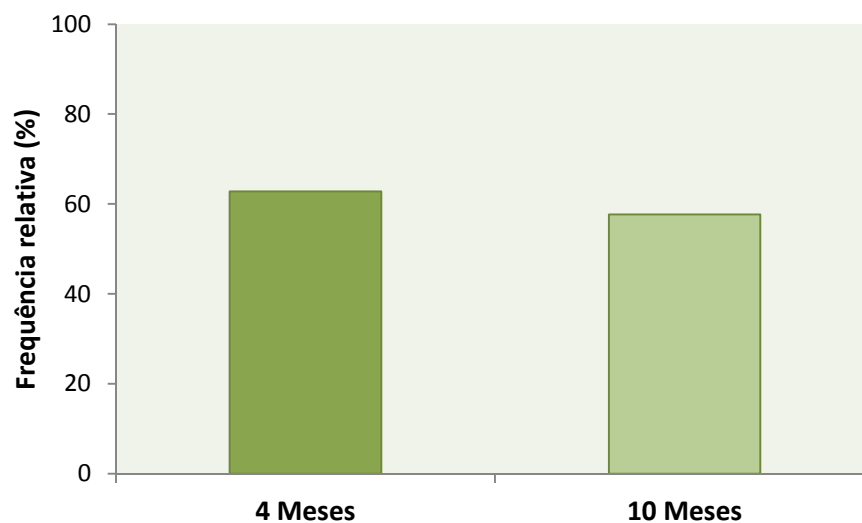
A frequência de bactérias produtoras de AIA, em meio de cultura sem a adição de L-triptofano, foi maior aos 4 meses de cultivo (62,8%) do que aos 10 meses de cultivo (57,7%) de plantas de cana-de-açúcar (Figura 3.5). Da mesma forma, a Figura 3.6 apresenta a diferença na frequência da distribuição das linhagens produtoras de AIA em relação ao genótipo da planta hospedeira, sendo observado que a RB863129 se destacou, apresentando 80% de linhagens positivas, seguida pela RB867515, com 56,52% e por último a RB92579, apresentando 45,45% de linhagens positivas. Em ambos os casos, o teste de  $\chi^2$  revelou haver diferenças dos fatores citados.



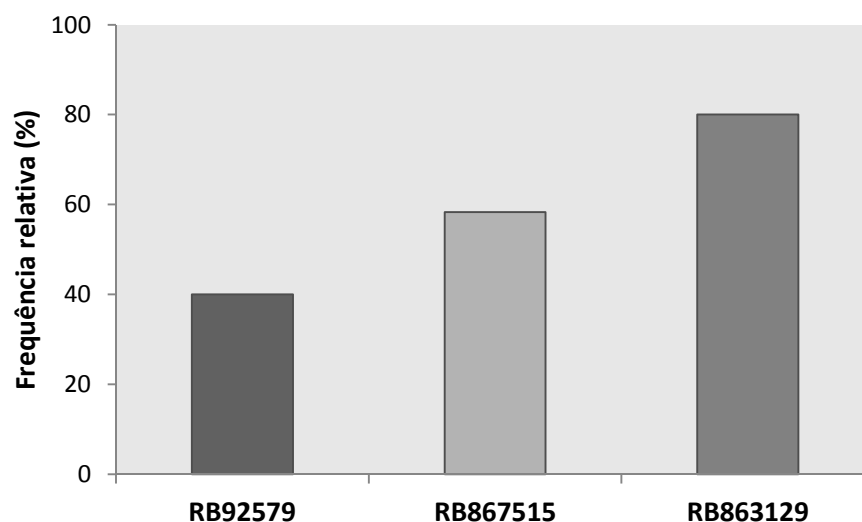
**Figura 3.3.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via independente de triptofano, em relação ao local de cultivo da planta hospedeira: EECAC – Carpina e Usina Petribú. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou que houve influência do local de cultivo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.4.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via independente de triptofano, em relação ao nicho do qual foram isoladas: **ER**: endofítica de raiz e **RIZ**: rizoplano de plantas de cana-de-açúcar. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou que houve influência do nicho de isolamento ( $p < 0,05$ ).



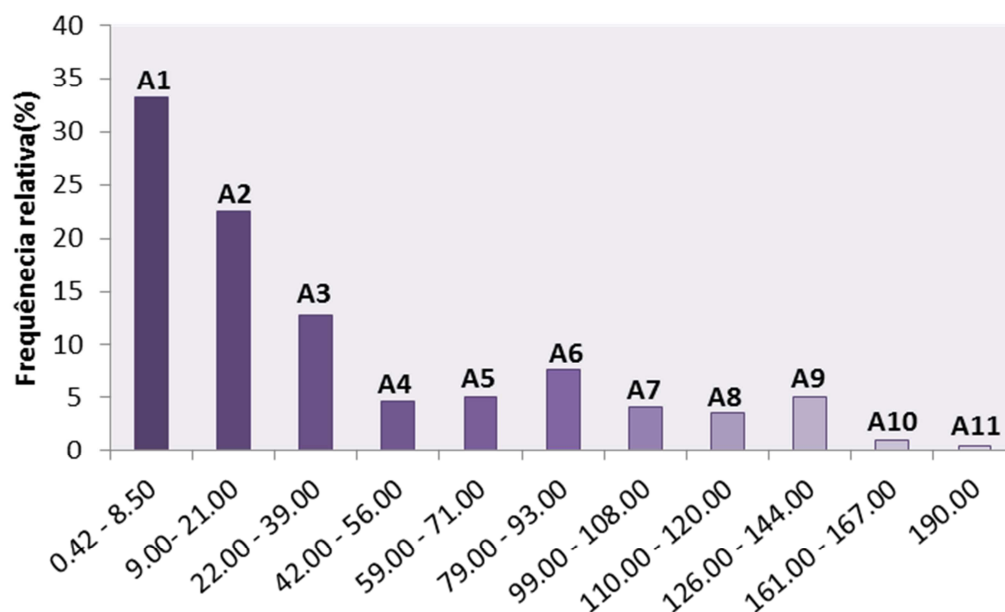
**Figura 3.5.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via independente de triptofano, em relação ao tempo de cultivo da planta hospedeira: 4 meses e 10 meses de cultivo. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou que houve influência do tempo de cultivo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.6.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via independente de triptofano, em relação ao genótipo da planta hospedeira: variedades RB92579; RB867515; e RB863129. A análise pelo teste do  $\chi^2$  revelou que houve influência das variedades ( $p < 0,05$ ).

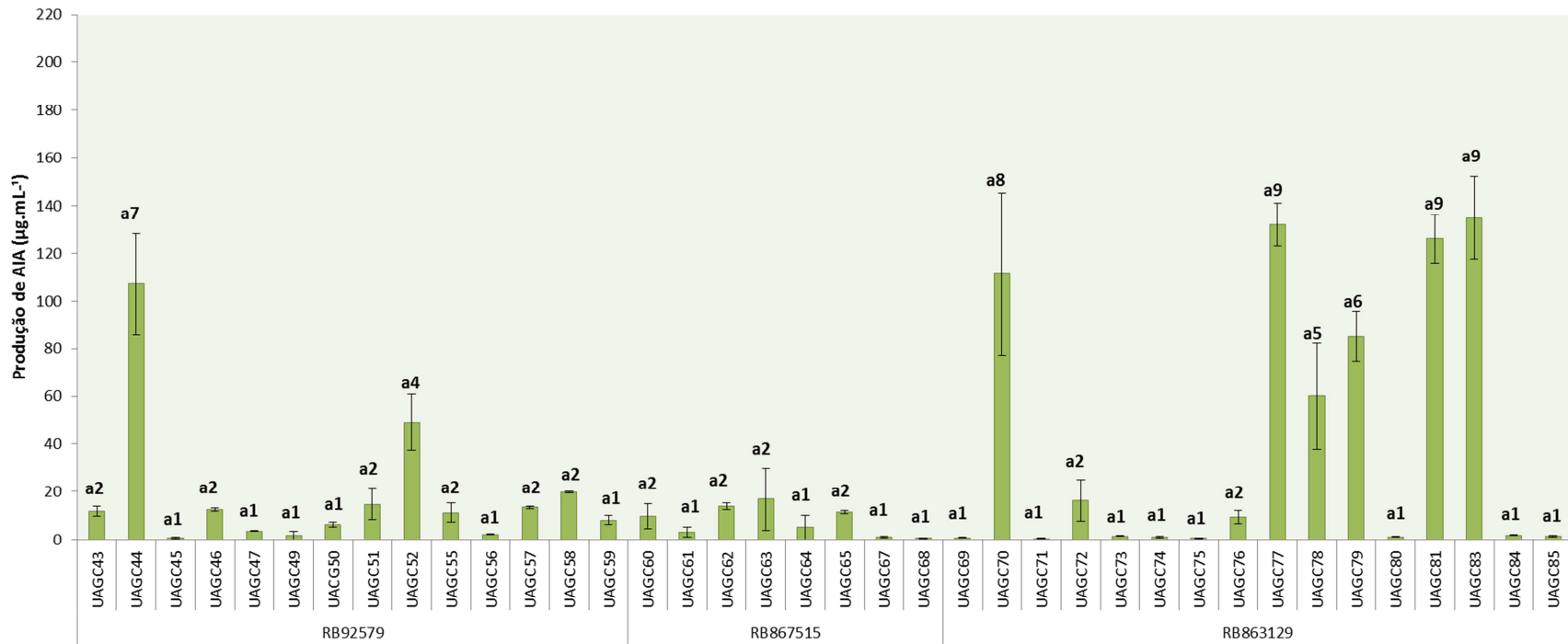
### **3.3.3 Quantificação da Produção de AIA – via dependente de triptofano**

A produção de AIA de 196 bactérias endofíticas de raiz e do rizoplane de variedades de cana-de-açúcar, cultivadas em Pernambuco, foi quantificada. Os dados resultantes da quantificação foram inicialmente submetidos ao teste de Scott-Knott, levando em consideração apenas as linhagens e suas respectivas produções. O teste agrupou as produções em 11 grupos distintos, onde o grupo A1 obteve destaque, contendo aproximadamente 35% das linhagens avaliadas, com intervalo de produção de 0,42 e 8,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , seguido do grupo A2, com aproximadamente de 22% das linhagens produzindo entre 9 e 21  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . No entanto, apenas 0,5% das linhagens avaliadas apresentaram os maiores níveis de produção de AIA, com 190  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (grupo A11). Em torno de 55% das linhagens avaliadas se encontram nos dois primeiros grupos e uma parte de aproximadamente 45% é dividido pelos grupos restantes (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Distribuição das linhagens bacterianas em níveis de produção de AIA, via dependente de triptofano, agrupadas de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Avaliando-se isoladamente a produção de AIA, em meio de cultura com adição de L-triptofano, pelas linhagens endofíticas de raiz isoladas de plantas cultivadas na EECAC, aos 4 meses de cultivo (Figura 3.8), foi observado que a maior parte das linhagens produziu AIA entre 0 e 9  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , principalmente na variedade RB92579, e que apenas as linhagens UAGC44 e UGC52 apresentaram alta produção, 107,12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 49,15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Além disso, a variedade RB867515 não apresentou linhagens com produção maior que 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA, apenas a linhagens UAGC63, que manifestou a produção máxima de 16,93  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA. Contudo, a variedade RB863129 apresentou quatro linhagens que se destacaram, produzindo acima de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA, foram as linhagens UAGC83, UAGC77, UAGC81 e UAGC70, com destaque para a UAGC83, com 134,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 3.8).

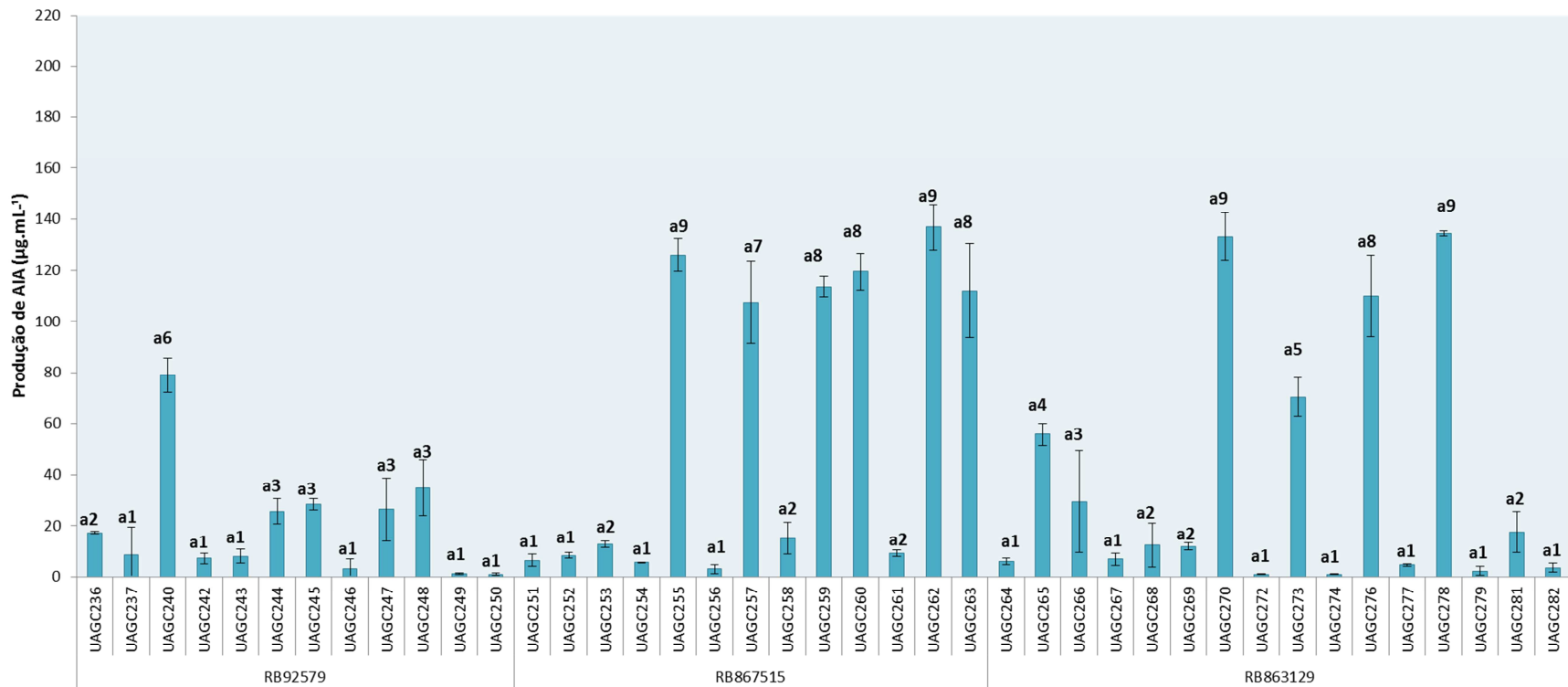


**Figura 3.8.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via dependente de triptofano, por bactérias endofíticas de raiz de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515, RB863129), cultivadas na EECAC – Carpina, aos quatro meses de cultivo. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

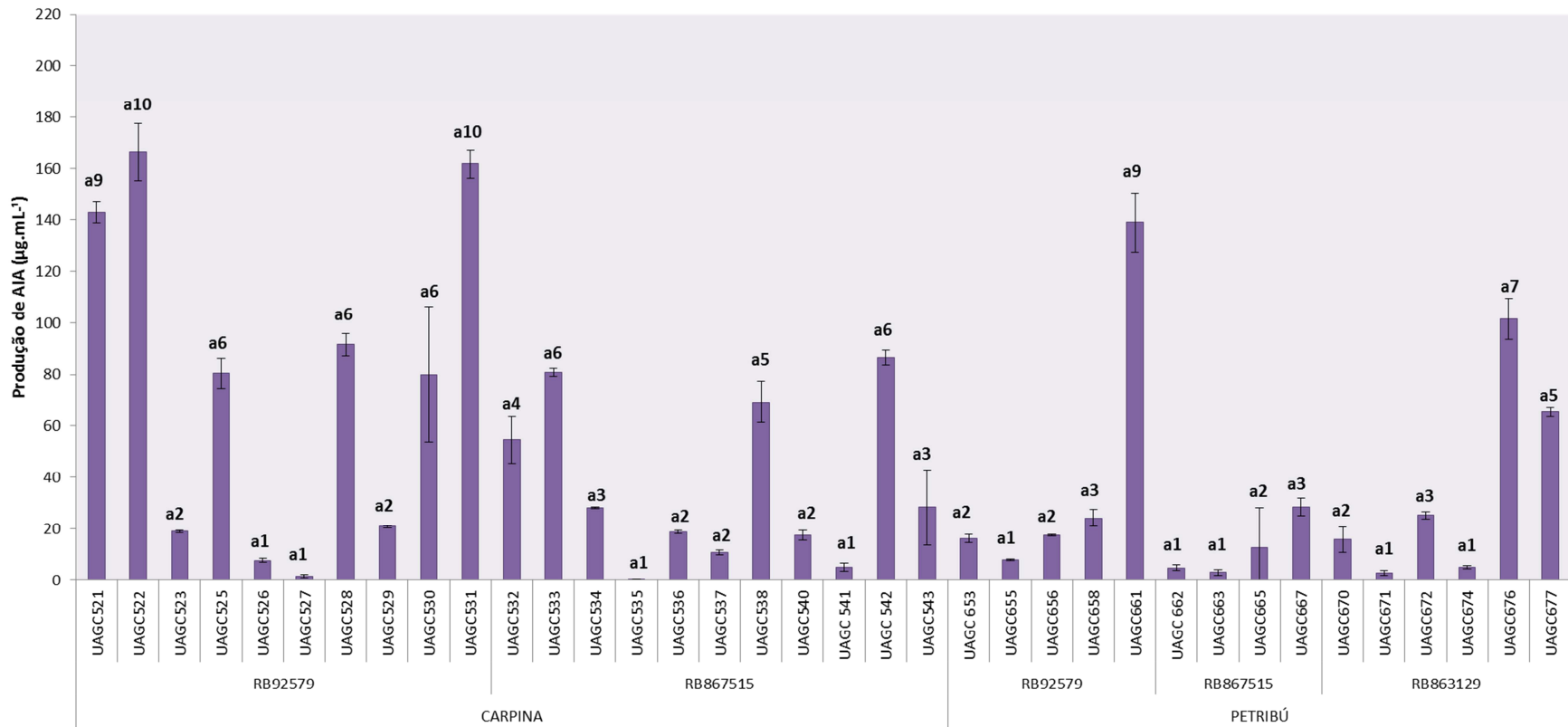


A Figura 3.9 apresenta a produção de AIA por bactéria endofítica de raiz isolada de variedades de cana cultivadas na Usina Petribú, também aos quatro meses de cultivo. Foi possível observar que a variedade RB867515 apresentou linhagens que apresentam maior capacidade de produção de AIA do que a mesma variedade quando isolada da EECAC, no mesmo tempo de cultivo (Figura 3.8). As linhagens que se destacaram foram a UAGC255, UAGC257, UAGC259, UAGC260, UAGC262 e UAGC263. A UAGC262 exibiu a maior produção, com  $136,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , seguido da linhagem UAGC255, com  $126,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Com relação a variedade RB92579, as linhagens isoladas não apresentaram produção maior que  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , valor este produzido pela linhagem UAGC240. Já na variedade RB863129, obtiveram destaque as linhagens UAGC278, UAGC270 e UAGC276, produzindo  $134,42 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $133,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $110,01 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA, respectivamente (Figura 3.9).

Considerando-se as bactérias isoladas de plantas após 10 meses de cultivo, tanto na EECAC quanto na Usina Petribú, é possível observar que a variedade RB92579 apresentou linhagens com maior produção de AIA, com bactérias produzindo até  $166,46 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 3.10), quando comparado a produção das linhagens aos 4 meses de cultivo. Já a RB867515, ao contrário de quando avaliada aos 4 meses de cultivo, apresentou linhagens com produções que se aproximaram até  $90 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 3.10).



**Figura 3.9.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via dependente de triptofano, por bactérias endofíticas de raiz de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515, RB863129), cultivadas na Usina Petribú, aos quatro meses de cultivo. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

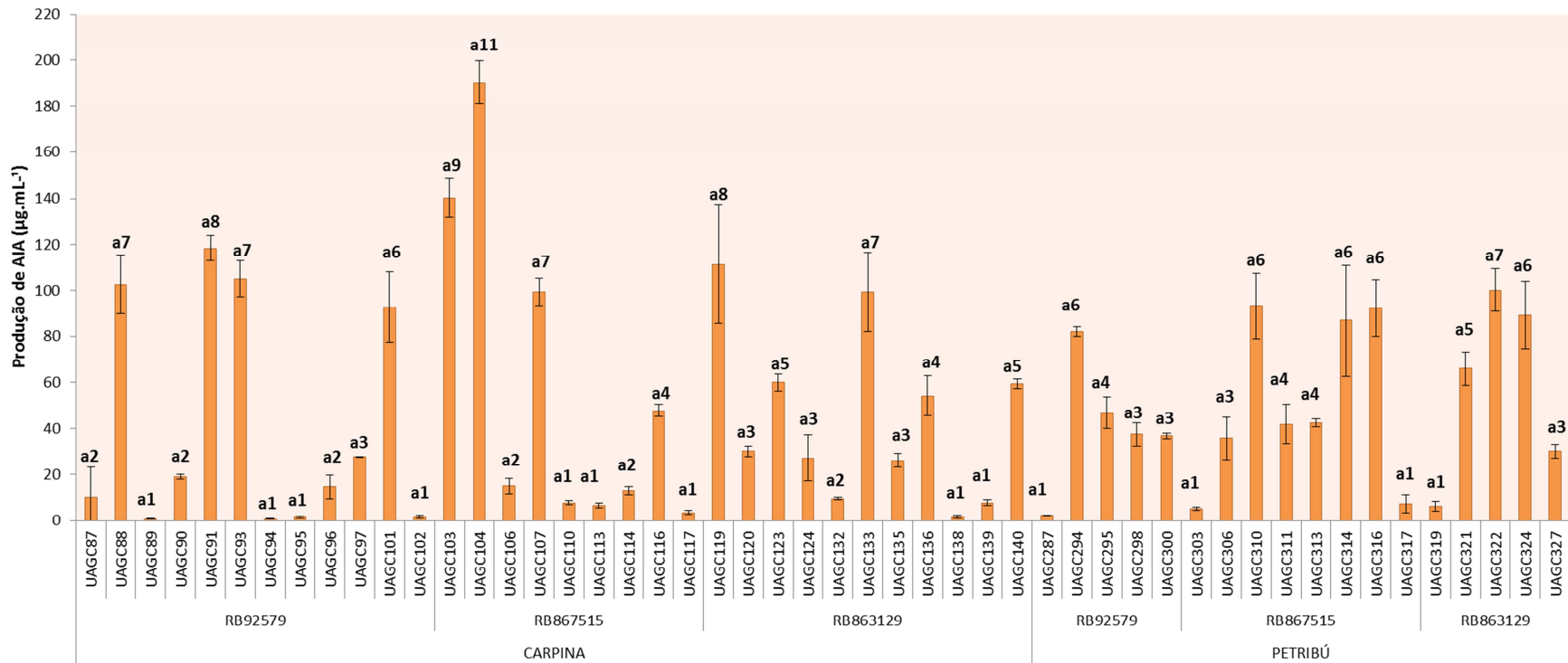


**Figura 3.10.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) via dependente de triptofano, por bactérias endofíticas de raiz de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515, RB863129), cultivadas na EECAC - Carpina e na Usina Petribú, aos dez meses de cultivo. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Ainda considerando a Figura 3.10, as linhagens isoladas de plantas cultivadas na Usina Petribú, aos 10 meses de cultivo, apresentaram menor produção de AIA, com apenas a linhagem UAGC661 se destacando, produzindo  $140 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , isolada da variedade RB92579. Das linhagens isoladas da variedade RB867515, nenhuma apresentou produção expressiva, a máxima chegou a apenas  $28,45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , produzido pela linhagem UAGC667. Já na variedade RB863129, a linhagem UAGC676 se sobressaiu sobre as demais, produzindo  $101,77 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , comparando-se com a produção das linhagens aos 4 meses de cultivo (Figura 3.9), é observado que houve uma diminuição da produção de AIA.

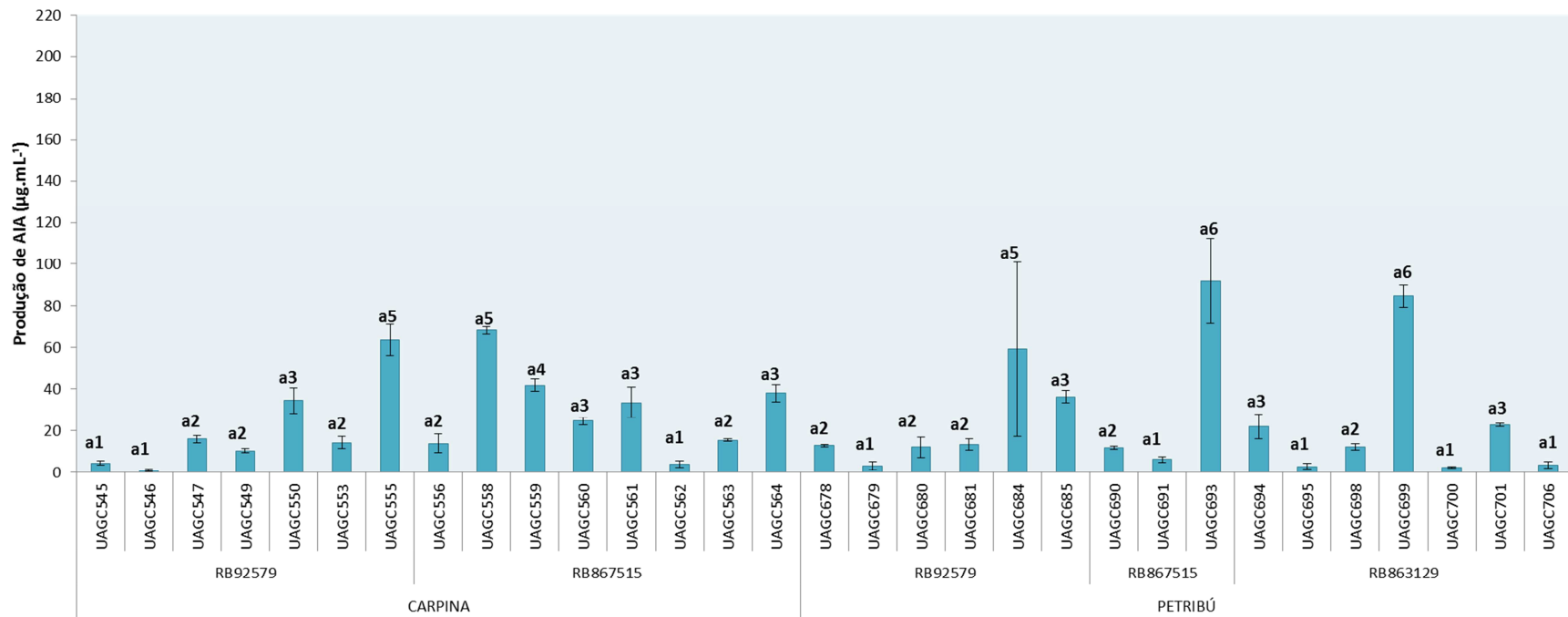
Avaliando-se a produção de AIA das bactérias isoladas do rizoplano de plantas de cana-de-açúcar aos 4 meses de cultivo (Figura 3.11), foi observado que houve um incremento da produção, quando comparada com as linhagens endofíticas de raiz. A maioria das bactérias produziu acima de  $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Considerando-se apenas as linhagens obtidas da EECAC, pela variedade RB92579, a linhagem que obteve destaque foi a UAGC91, produzindo  $118,42\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto que na variedade RB867515, a linhagem UAGC104 produziu  $190,36\mu\text{g.mL}^{-1}$ , seguido da linhagem UAGC103, com  $140,20\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA. Já na variedade RB863129, a linhagem UAGC119 se destacou, produzindo  $111\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Além disso, considerando-se as linhagens obtidas da Usina Petribú (Figura 3.11), isoladas do rizoplano aos 4 meses de cultivo, foi observado que, como as bactérias da EECAC, a maioria também produziu acima de  $20\mu\text{g.mL}^{-1}$  e as linhagens mostraram maior produção do que as endofíticas aos 4 meses de cultivo. As linhagens que se destacaram na produção de AIA foram a UAGC322, isolada da variedade RB863129, produzindo  $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a linhagem UAGC316, isolada da variedade RB867515, com produção de  $92,24\mu\text{g.mL}^{-1}$  e a linhagem UAGC294 isolada da variedade RB92579, produzindo  $80\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



**Figura 3.11.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via dependente de triptofano, por bactérias isoladas do rizoplanode três variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515, RB863129), cultivadas na EECAC - Carpina e na Usina Petribú, aos quatro meses de cultivo. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Quando comparada a produção de AIA pelas linhagens obtidas do rizoplano de plantas de cana-de-açúcar aos dez meses de cultivo, tanto da EECAC quanto da Usina Petribú, com a produção das bactérias isoladas aos quatro meses de cultivo, foi observado que houve uma diminuição na produção, onde o valor máximo produzido não ultrapassou os  $95 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA (Figura 3.12). Analisando-se, isoladamente, as linhagens obtidas da EECAC, sobressaíram-se as linhagens UAGC555 e UAGC558, a primeira, isolada da variedade RB92579, com produção de  $63,73 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e a segunda, isolada da variedade RB863129, e produção de  $68,38 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Enquanto que nas linhagens obtidas na Usina Petribú, destacaram-se as linhagens UACG684, UAGC693 e UAGC699, onde a primeira foi isolada da variedade RB 92579, com produção de  $59,20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , a segunda, isolada da variedade RB867515, produzindo  $92,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e a terceira com produção de  $84,82 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , isolada da variedade RB863129.



**Figura 3.12.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via dependente de triptofano, por bactérias isoladas do rizoplano de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515, RB863129), cultivadas na EECAC - Carpina e na Usina Petribú, aos dez meses de cultivo. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

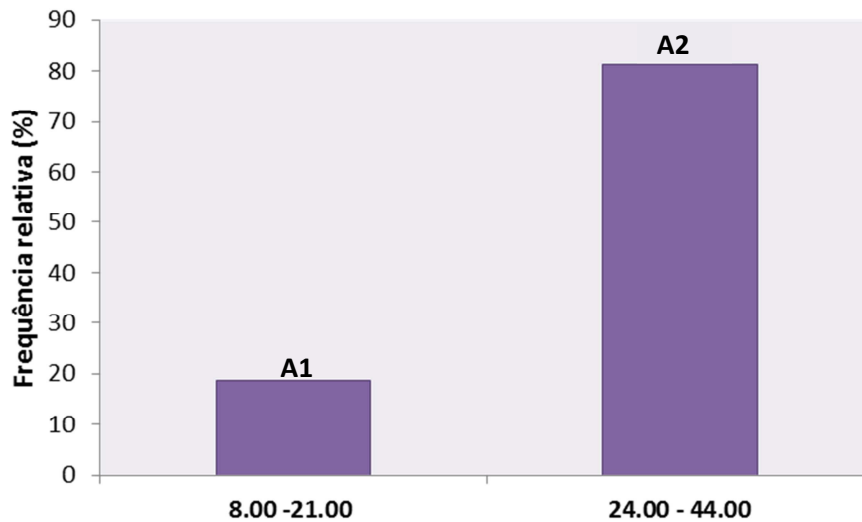
### **3.3.4 Quantificação da Produção de AIA – via independente de triptofano**

Para avaliar a capacidade da produção de AIA por uma via metabólica independente de triptofano, foram selecionadas 69 bactérias endofíticas de raiz e do rizoplane, de três variedades de cana-de-açúcar, aos 4 e 10 meses de cultivo, cultivadas em Pernambuco. Estas foram selecionadas baseadas na produção de AIA pela via dependente de triptofano. Logo, as linhagens bacterianas foram analisadas quanto à produção de AIA em meio de cultura sem o acréscimo de L-triptofano e as que apresentaram resultado positivo foram quantificadas e submetidas ao teste de Scott-Knott. O teste agrupou as linhagens em apenas dois grupos distintos, diferente de quando comparado aos níveis de produção de AIA com adição de L-triptofano. O grupo A1 conteve 18,6 % das linhagens produtoras de AIA, com nível de produção de 8 a 21  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA, e o grupo A2 ficou com o restante das linhagens produtoras, ressaltando-se o a produção máxima observada foi de 44  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA (Figura 3.13).

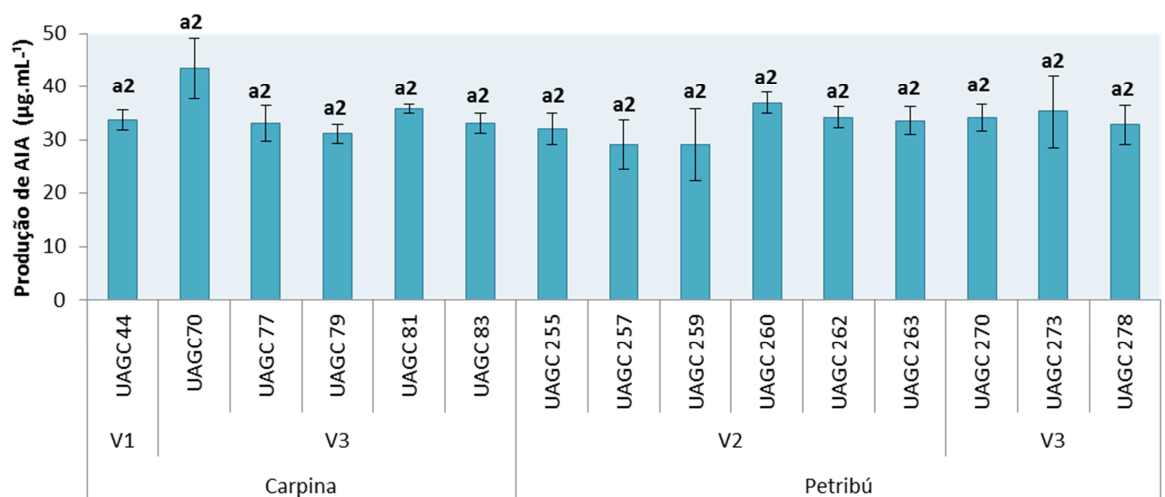
Avaliando-se a produção de AIA, em meio de cultura sem o acréscimo de L-triptofano, pelas linhagens endofíticas de raiz isoladas de variedades cultivadas tanto na EECAC quanto na Usina Petribú, aos 4 meses de cultivo, a produção de AIA foi bem constante, variando de 39 a 44  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , onde a linhagem UAGC70 se destacou, produzindo 43,41  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , isolada da variedade RB863129, cultivada na EECAC. No entanto o teste de Scott-Knott revelou não haver diferença significativa entre estas linhagens (Figura 3.14).

Quanto às linhagens endofíticas de raiz, isoladas aos 10 meses, de três variedades de cana cultivadas tanto na EECAC quanto na Usina Petribú (Figura 3.15), foi observado que algumas linhagens, quando comparadas com as da figura anterior (Figura 3.14), apresentaram menor produção, como a UAGC525 com 13,27  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA, isolada da variedade RB92579.

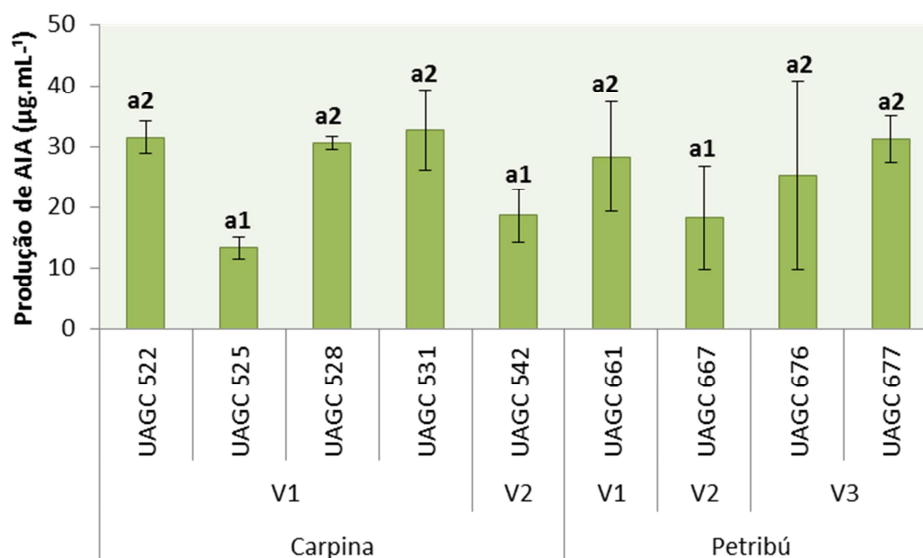




**Figura 3.13.** Distribuição das linhagens bacterianas segundo os níveis de produção de AIA, em meio de cultura sem a adição de L-triptofano, agrupadas de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



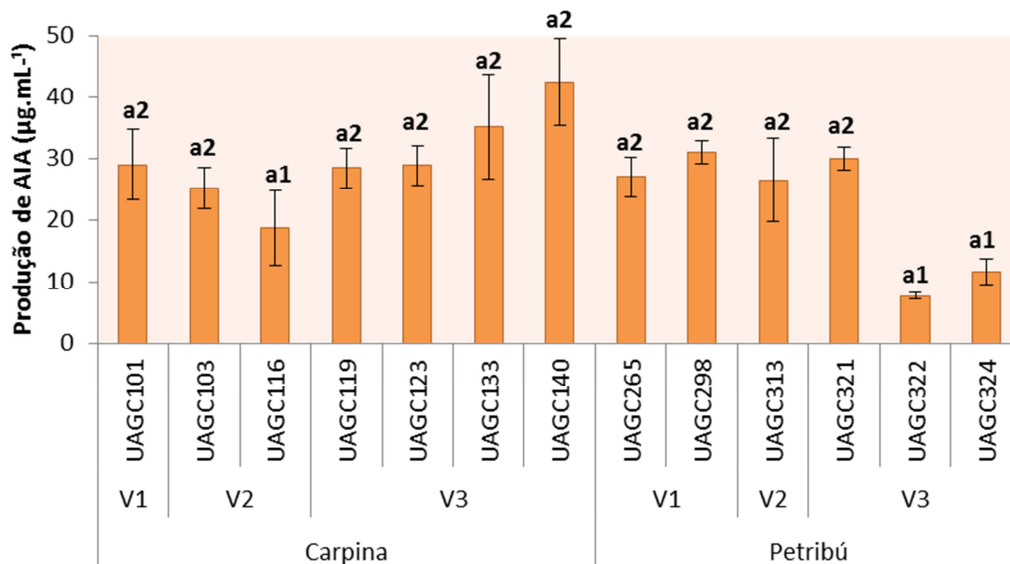
**Figura 3.14.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via independente de triptofano, por bactérias endofíticas de raiz de três variedades de cana-de-açúcar, cultivadas na EECAC - Carpina e na Usina Petribú, aos quatro meses de cultivo. **V1:** RB92579; **V2:** RB87515 e **V3:** RB863129. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).



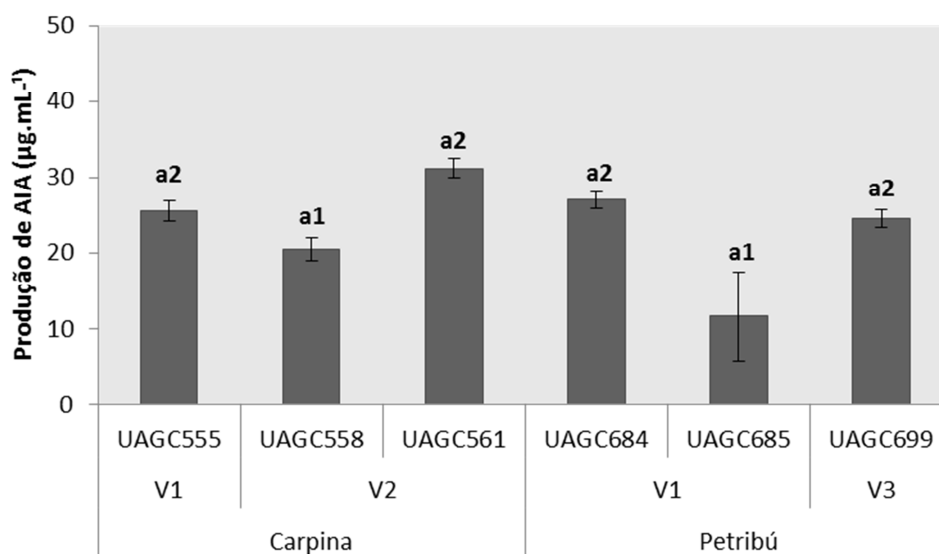
**Figura 3.15.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) via independente de triptofano, por bactérias endofíticas de raiz de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas na EECAC e na Usina Petribú, aos dez meses de cultivo. **V1**: RB92579; **V2**: RB87515 e **V3**: RB863129. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Considerando as bactérias isoladas do rizoplaneo de plantas de cana, a Figura 3.16 apresenta que as linhagens expressaram maiores produções aos 4 meses, assim como as endofíticas de raiz. Neste caso, a linhagem que se sobressaiu foi a UAGC140, com uma produção de  $42,42\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA, sendo isolada da variedade RB863129, cultivada na EECAC. Contudo, na mesma variedade, só que cultivada na Usina Petribú, foi observado o menor valor de produção de AIA, exibido pela linhagem UAGC322, seguido pela linhagem UAGC324, com produção de  $7,66\mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $11,59\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

Considerando a produção das linhagens isoladas do rizoplaneo de plantas de cana-de-açúcar cultivadas aos 10 meses, na EECAC e na Usina Petribú, foi observado que mais uma vez a linhagem que obteve destaque de produção, a UAGC561, foi isolada de planta cultivada na EECAC, com produção de  $31,25\mu\text{g.mL}^{-1}$  e isolada da variedade RB867515. Enquanto a que apresentou a menor produção foi isolada da Usina Petribú, com produção de  $11,67\mu\text{g.mL}^{-1}$ , isolada da variedade RB92579 (Figura 3.17).



**Figura 3.16.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via independente de triptofano, por bactérias isoladas do rizoplano de três variedades de cana-de-açúcar, cultivadas na EECAC - Carpina e na Usina Petribú, aos quatro meses de cultivo. **V1**: RB92579; **V2**: RB87515 e **V3**: RB863129. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.17.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) via independente de triptofano, por bactérias isoladas do rizoplano de três variedades de cana-de-açúcar cultivadas na EECAC e na Usina Petribú, aos dez meses de cultivo. **V1**: RB92579; **V2**: RB87515 e **V3**: RB863129. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

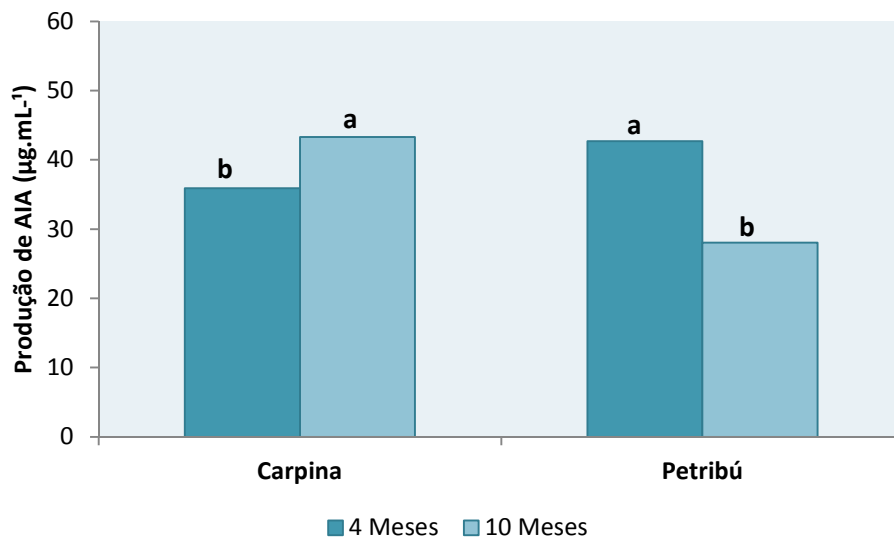
### **3.3.5 Influência de diferentes fatores sobre a produção de AIA por bactérias associadas a plantas de cana-de-açúcar**

Análises estatísticas foram realizadas para avaliar o efeito e possível interação entre os fatores: nicho de colonização bacteriana, tempo de cultivo, local de isolamento e genótipo da planta hospedeira, sobre a produção de AIA por bactérias associadas a raízes de cana-de-açúcar. A comparação de médias foi feita através do Teste de Scott-Knott. Os efeitos principais isolados não foram significativos de ao nível de 5% de probabilidade. No entanto as interações se mostraram significativas.

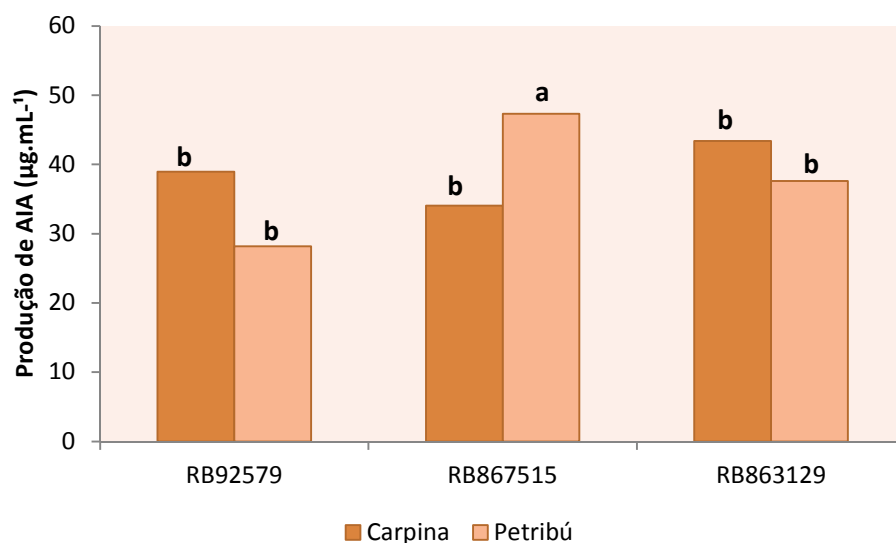
#### **3.4.5.1 Produção de AIA – via dependente de Triptofano**

Avaliando-se o local de isolamento em relação ao tempo de cultivo das plantas de cana-de-açúcar (Figura 3.18), foi observado que houve diferença significativa entre os dois locais (EECAC e Usina Petribú) aos 4 e 10 meses de cultivo. As bactérias isoladas da EECAC produziram significativamente menos aos 4 meses quando comparada com as isoladas da Usina Petribú, no mesmo tempo de cultivo. No entanto, este quadro se inverteu, quando as linhagens isoladas na EECAC aos 10 meses apresentaram maior produção do que as da Usina Petribú.

Na Figura 3.19, o local de isolamento das plantas é comparado em relação às variedades de cana-de-açúcar, sendo observado que apenas a variedade RB867515, quando cultivada na Usina Petribú se sobressaiu estatisticamente ( $p < 0,05$ ) sobre as demais, com média de produção de  $47,31 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .



**Figura 3.18.** Influência do local de isolamento (EECAC – Carpina e Usina Petribú) em função do tempo de cultivo das plantas de cana-de-açúcar (4 e 10 meses) sobre a produção de AIA, via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

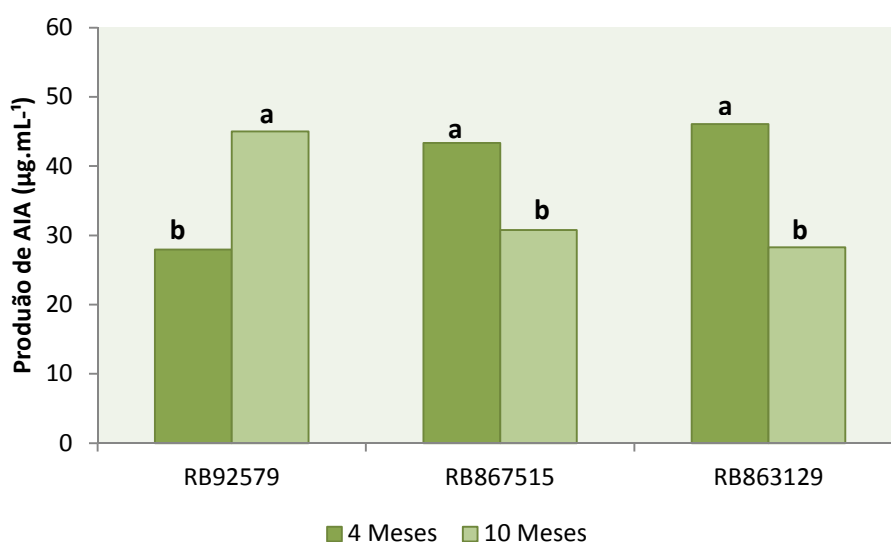


**Figura 3.19.** Influência do local de isolamento (EECAC – Carpina e Usina Petribú) em função das variedades de cana-de-açúcar (RB92579; RB867515; RB863129), sobre a produção de AIA, via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

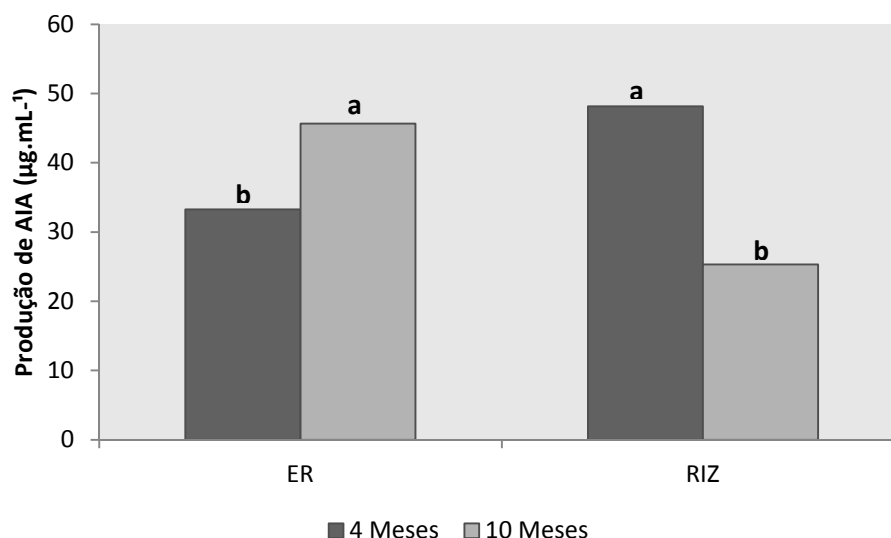
Relacionando-se o tempo de cultivo com as variedades (Figura 3.20), foi observado que aos 4 meses, a variedade RB92579 diferiu estatisticamente das demais variedades, apresentando a menor média de produção de AIA,

28 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , no entanto, aos 10 meses de cultivo, sua média foi a maior (44,5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ), comparada com as demais, afirmando a influência do tempo de cultivo na produção de AIA pelas bactérias isoladas.

Com relação ao tempo de cultivo em função do nicho de colonização bacteriana, as linhagens do rizoplasma se sobressaíram na produção de AIA quando comparadas as endofíticas de raiz, aos 4 meses de cultivo, produzindo em média 48 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ). No entanto, aos 10 meses de cultivo, as linhagens endofíticas de raiz predominaram na produção de AIA (Figura 3.21). As médias da produção de AIA do local em função do nicho, e da variedade em função do nicho não foram significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.20.** Influência do tempo de cultivo (4 e 10 meses) em função das variedades de cana-de-açúcar (RB92579; RB867515; RB863129), sobre a produção de AIA, via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.21.** Influência do tempo de cultivo (4 e 10 meses) em função do nicho de colonização bacteriana (ER: endofíticas de raiz; e RIZ: rizoplano), sobre a produção de AIA, via dependente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

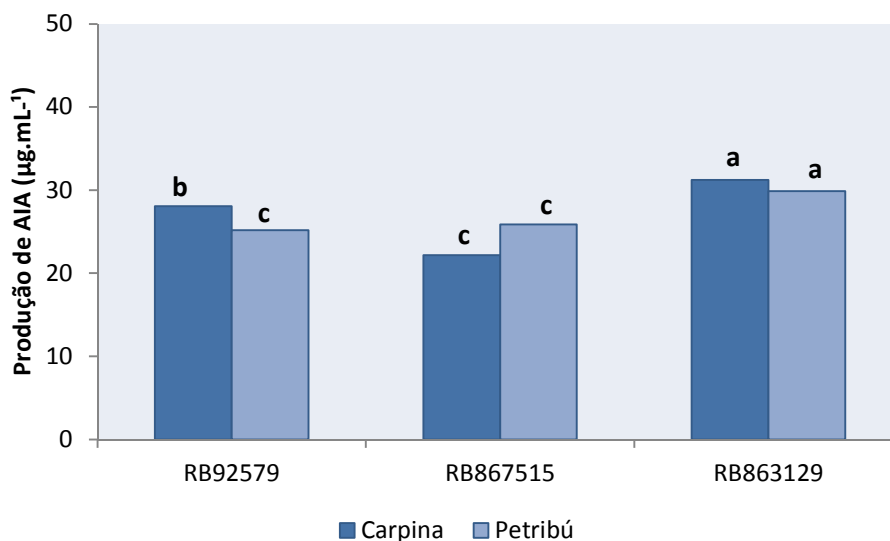
#### 3.4.5.2 Produção de AIA – via independente de Triptofano

A produção de AIA por via metabólica alternativa a utilização do triptofano como precursor, ou seja, em meio de cultura sem a adição de L-triptofano, também foi avaliada. Foi observado a influência das variedades de cana em função do local de isolamento sobre a produção de AIA (Figura 3.22), em que a variedade RB863129 diferiu estatisticamente das demais, produzindo os maiores níveis de AIA em relação às outras variedades, média de  $29\mu\text{g.mL}^{-1}$  para as bactérias isoladas da Usina Petribú e  $31\mu\text{g.mL}^{-1}$  para as isoladas da EECAC (Figura 3.22).

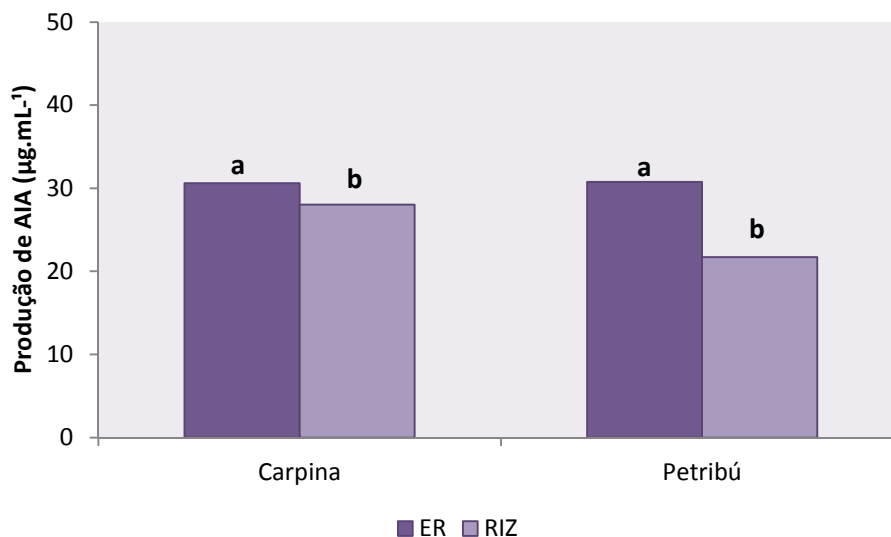
Na Figura 3.23, analisando-se o local de isolamento em função do nicho de colonização bacteriana, foi verificado que as linhagens endofíticas de raiz, tanto da EECAC quanto da Usina Petribú, apresentaram maior produção de AIA, diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) da produção apresentada pelas linhagens do rizoplano.

Analisando-se a influência do tempo de cultivo em função do nicho de colonização bacteriana (Figura 3.24), foi observado que a produção de AIA, aos 4 meses, das linhagens endofíticas de raiz superou a produção aos 4

meses do rizoplano e das endofíticas de raiz e do rizoplano aos 10 meses de cultivo, diferindo estatisticamente das demais ( $p < 0,05$ ).

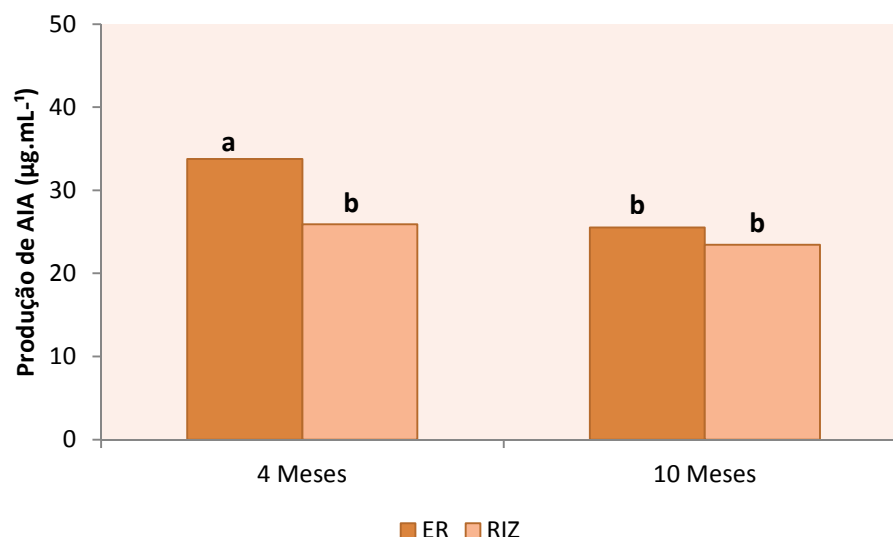


**Figura 3.22.** Influência do tempo de cultivo (4 e 10 meses) em função das variedades de cana-de-açúcar (RB92579; RB867515; RB863129), sobre a produção de AIA, via independente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.23.** Influência do local de isolamento (EECAC – Carpina e Usina Petribú) em função do nicho de colonização bacteriana (ER: endofíticas de raiz; e RIZ: rizoplano), sobre a produção de AIA via independente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).





**Figura 3.24.** Influência do tempo de cultivo (4 e 10 meses) em função do nicho de colonização bacteriana (ER: endofíticas de raiz; e RIZ: rizoplano), sobre a produção de AIA, via independente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

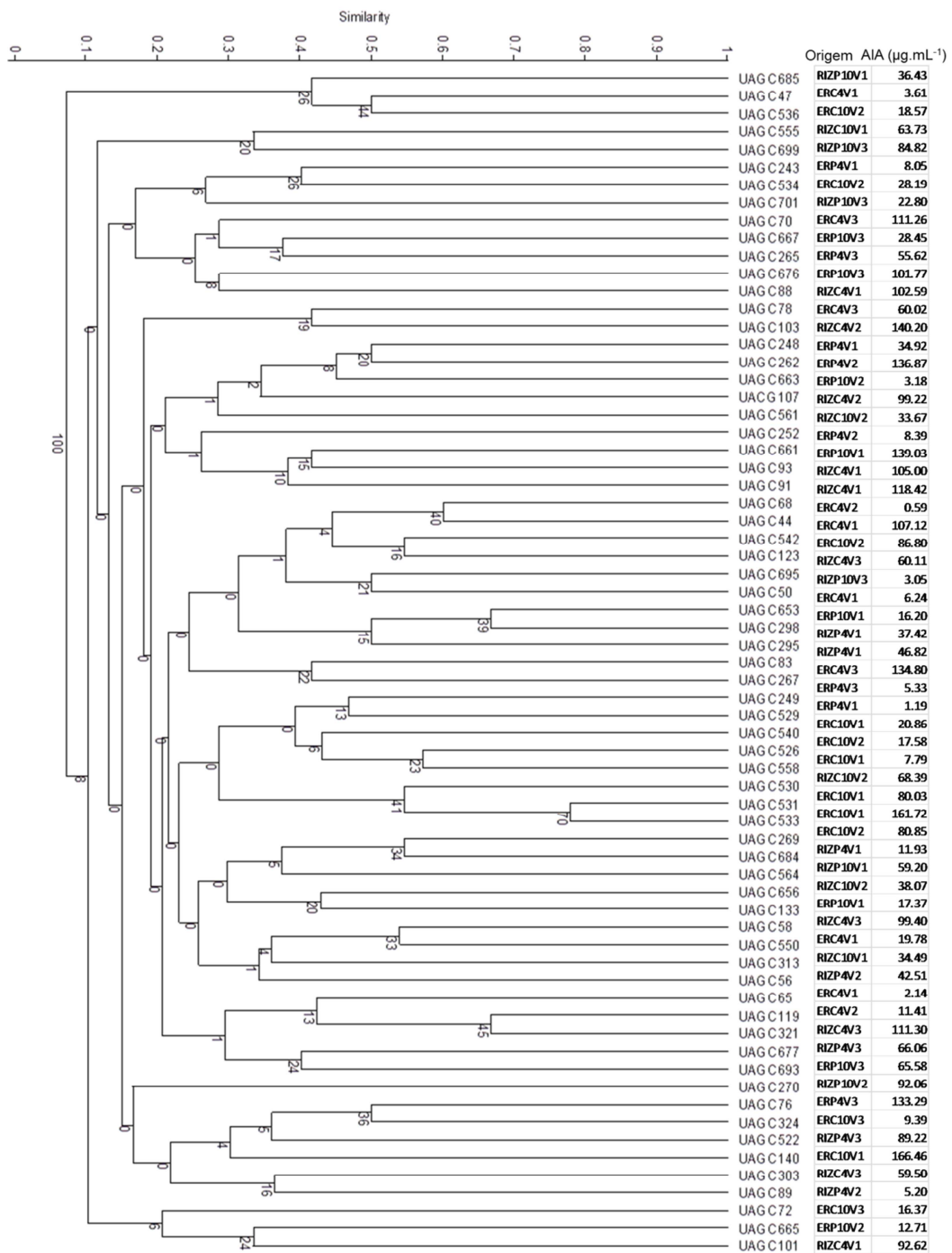
### 3.3.6 Análise da Variabilidade Genética Bacteriana por BOX-PCR

A análise da variabilidade genética, pela técnica de BOX-PCR, foi realizada em 38 linhagens endofíticas de raiz e 29 do rizoplano, expressando níveis de produção de AIA diferentes. A técnica utilizada permitiu a visualização de perfis de banda, entre 250 e 8000 pb, geradas pela amplificação de seqüências repetitivas do DNA genômico bacteriano, utilizando o *primer* BOX A1R.

A análise foi realizada através da construção de um dendrograma (Figura 3.25) de similaridade, onde o mesmo indicou uma grande variabilidade genética entre as linhagens, apenas as linhagens UAGC531 e UAGC533 apresentaram alta similaridade, acima de 70%. As linhagens UAGC119 e UAGC321, e as linhagens UAGC653 e UAGC298 apresentaram em torno de 65 % de similaridade, de acordo com o índice de Jaccard. As outras linhagens avaliadas permaneceram com índice de similaridade abaixo de 60%, confirmando mais uma vez a alta diversidade genética das linhagens produtoras de AIA em questão.

Não houve relação entre as linhagens endofíticas de raiz e do rizoplano, a maior parte dos agrupamentos não diferenciou uma da outra. A única diferenciação foi no agrupamento das linhagens UAGC531 e UAGC533, que produziram altos níveis de AIA ( $161,72 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $80,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente) e foram isoladas da EECAC aos 10 meses de cultivo, no entanto a primeira linhagem pertence a variedade RB92579 e a segunda a RB867515.

Assim como nas linhagens UAGC321 e UAGC119 ( $111,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $66,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA, respectivamente), que são oriundas do rizoplano, da mesma variedade (RB863129) e do mesmo tempo de cultivo (4 meses), mas no entanto, são de locais diferentes, a primeira é oriunda da EECAC e a segunda da Usina Petribú (Figura 3.25).



**Figura 3.25.** Dendrograma de similaridade mostrando o agrupamento das linhagens bacterianas produtoras de AIA associadas a plantas de cana-de-açúcar, com base nas sequências obtidas pelo *primer* BOX A1R, através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), com *bootstrap* de 1.000 vezes. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso.

### 3.4 DISCUSSÃO

A interação bactéria–planta hospedeira é um processo muito importante de ser estudado, pois quando esta é benéfica, a bactéria apresenta capacidade de disponibilizar nutrientes e substâncias promotoras de crescimento ao hospedeiro. No entanto, esta interação pode ser alterada por fatores provenientes do ambiente, ou intrínsecos a planta hospedeira (HAYAT et al., 2010; ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Os resultados do presente estudo demonstraram que diversos fatores podem influenciar a dinâmica das bactérias produtoras de AIA. Kuklinsky-Sobral et al. (2004), avaliando a comunidade bacteriana produtora de auxinas, associada a plantas de soja, verificaram que as bactérias podem ser afetadas pela fase de crescimento em que o hospedeiro se encontra, pelo genótipo do mesmo e também pelo nicho de colonização do qual a bactéria foi isolada. No presente trabalho, observamos que os fatores que mais influenciaram a distribuição das bactérias produtoras de AIA associadas a plantas de cana-de-açúcar foram o nicho de colonização bacteriana, o tempo de cultivo e o genótipo da planta hospedeira.

A produção de AIA por bactérias endofíticas de raiz e do rizoplane foi abordada por Becerra-Castro et al. (2011), que encontraram maior proporção de bactérias produtoras de AIA no rizoplane do que no interior do tecido radicular de plantas de *Cytisus striatus*. Kuklinsky-Sobral et al. (2004) observaram o contrário em plantas de soja, maior proporção de linhagens produtoras de AIA endofíticas de raiz do que isoladas do rizoplane. Comparando com os resultados aqui obtidos, foi verificado que tanto bactérias endofíticas de raiz quanto as do rizoplane se mostraram em proporções equivalentes, diferenciando dos dados encontrados na literatura.

A colonização do rizoplane, segundo Compant et al. (2010) está diretamente relacionada a exsudação de compostos atrativos, ricos em carbono, açúcares e aminoácidos, que atraem as bactérias para as áreas das raízes, em que estes se encontram em maior concentração. Já a colonização dos tecidos internos por bactérias está condicionada a existência de aberturas naturais ou artificiais, ou a produção enzimática que facilite o processo de penetração, que permitam a entrada destas no interior da planta hospedeira. Nem todas as bactérias existentes no rizoplane apresentam habilidade ou

competência para penetrar e colonizar o interior do hospedeiro, mas todas que estão habitando o interior do tecido vegetal já passaram alguma fase do seu ciclo de vida como epifíticos (COMPANT et al., 2010; BADRE et al., 2009; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; HALLMANN et al., 1997).

Quanto ao tempo de cultivo, percebemos que aos 4 meses de cultivo a produção de AIA das linhagens endofíticas de raiz foi inversamente proporcional as do rizoplano, e aos 10 meses de cultivo, o resultado se inverteu, a media da produção de AIA do rizoplano foi bem maior que a das endofíticas de raiz, mostrando haver flutuação entre as populações de bactérias produtoras de AIA endofíticas e do rizoplano em relação ao tempo, assim, podemos supor que aos 4 meses, no início do desenvolvimento do vegetal, as bactérias viviam epifiticamente nas raízes da cana, e , com o desenvolvimento desta, conseguiram penetrar na planta e se estabelecer nesta. Além disso, Quadt-Hallmann et al. (1997) afirmam que a colonização tanto interna ou externa pode ser afetada pelas espécies de bactérias que estão interagindo em cada fase da planta.

Observando atentamente a variação da população de bactérias produtoras de AIA entre as variedades de cana-de-açúcar cultivadas, foi observado que aos 4 meses de cultivo, principalmente a variedade RB92579, as linhagens apresentaram menor produção de AIA. Segundo a RIDESA (2010), esta variedade apresenta desenvolvimento lento, enquanto que as outras duas variedades (RB867515 e RB863129) apresentam desenvolvimento rápido, e foi observado que estas duas variedades apresentaram bactérias com maiores níveis de produção de AIA aos 4 meses de cultivo, fato que, apesar de especulativo, pode estar relacionado com o desenvolvimento da planta hospedeira.

De acordo com Patten & Glick (1996), cerca de 80% das bactérias exibem a capacidade de produzir AIA, principalmente através do metabolismo do aminoácido L-triptofano, que é o precursor do ácido indol acético (TSAVKELOVA et al., 2006). Existem cerca de 4 rotas bioquímicas para a produção do AIA através do L-triptofano, no entanto, a principal para as bactérias benéficas produtoras de AIA, é realizado através da via do ácido indol pirúvico (TSAVKELOVA et al., 2006; SPAEPEN et al., 2007). Segundo Tsavkelova et al. (2006), a rota de produção de AIA por bactérias independente do L-triptofano é insignificante, afirmação contestada pelos resultados aqui

apresentados, que mostram que nem todas as bactérias são capazes de produzir por esta rota, entretanto quando produzem, exibem quantidades bem significativas, com a variação de 7 a 43  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , enquanto que Egamberdiyeva & Kucharova (2009) encontraram no máximo 7,4 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . No entanto, Patten & Glick (1996) e Barazani & Friedman (2000) afirmam que o L-triptofano pode ser encontrado no solo, produzido pelas plantas e exsudado através das raízes, então a rota de produção de AIA através do L-triptofano se torna, de fato, mais comum.

Nas bactérias associadas a plantas de cana, foi observado que a maioria das linhagens produziu altas concentrações de AIA, chegando a um máximo de 190 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . Alguns trabalhos revelam diferentes limites de produção, como de 2  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  ( LOACES et al.,2011), 3 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  (ALI et al., 2009), 35  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  (DIAS et al., 2009), 65  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  (ALI et al., 2008) e 93 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  (MERZAEVA &SHIROKIKH, 2010), sugerindo que as bactérias aqui avaliadas apresentaram produção de AIA acima de várias citadas na literatura.

Alguns autores associam produção de AIA como um mecanismo de patogenicidade (YANG et al., 2007; MANULIS et al.,1998; FETT et al., 1987). Uma possível diferença entre a produção de AIA por bactérias benéficas e fitopatogênicas é a via metabólica, sendo o das fitopatogênicas a rota do indol-3 - acetamida (YANG et al., 2007). Logo, não é possível afirmar que uma bactéria é patogênica ou não apenas pela quantidade de AIA que ela produz. Pois, como nos resultados aqui apresentados, foi observada a associação de bactérias não patogênicas com plantas de cana-de-açúcar que produziram AIA acima de 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , enquanto que Fett et al. (1987) observaram a produção de AIA por bactérias fitopatogênicas, *Xanthomonas campestris* e *Pseudomonassp.*, em concentrações de 2 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  e 40 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. Entretanto, altas concentrações de AIA produzidas por bactérias podem, em vez de promover o desenvolvimento radicular, inibir o mesmo. Neste contexto, Dodd et al. (2010) afirmam que concentrações de AIA acima de 2 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  podem inibir a elongação radicular. Porém, Gravel et al. (2007) relatam em seu trabalho que a aplicação de soluções contendo AIA na concentração de 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , em mudas de tomate, conseguiu inibir os sintomas do fitopatógeno *Pythium ultimum*, mostrando que há um bom potencial na utilização de bactérias que produzem altas concentrações de AIA.

As bactérias selecionadas para a análise de variabilidade genética apresentavam em comum a capacidade de produzir AIA, mas expressavam esta característica em diferentes níveis de produção. Além disso, nenhum critério morfológico de seleção das linhagens foi utilizado para a realização do ensaio. Logo, a alta diversidade genética encontrada, através da técnica de BOX-PCR, era, de certo modo, esperada. Contudo, Mendes et al. (2007), trabalhando apenas com linhagens do gênero *Burkholderia*, isoladas de variedades de cana-de-açúcar, encontraram também alta variabilidade genética entre as bactérias analisadas, a maioria também exibiu capacidade de produzir AIA. Além deste, Marques et al. (2008), trabalhando com diversas linhagens de *Pseudomonas*, através da técnica de BOX-PCR, conseguiram separar as linhagens em nove grupos, com até 72% de similaridade, enquanto que Freitas et al (2007) conseguiram obter três grupos com similaridade acima de 50% em linhagens de *Rhizobium*, diferente dos resultados aqui relatados, que só apresentaram semelhanças acima de 70% em apenas duas linhagens.

Além disso, não houve praticamente nenhuma relação entre os agrupamentos formados, que envolveram tanto as linhagens endofíticas de raiz quanto as do rizoplano. A variabilidade encontrada evidenciou a grande diversidade de espécies que habitam estes nichos, como afirmaram Berg & Smalla (2009), em sua revisão.

De acordo com os resultados expostos, há um grande potencial agrônomo diante das linhagens estudadas, para a produção de futuros inoculantes para a cultura da cana-de-açúcar, e /ou para outras culturas, uma vez que está provada a interação benéfica entre estas linhagens e a cultura analisada.

### 3.5 CONCLUSÕES

- Plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco apresentam alta frequência de bactérias com capacidade de produzir AIA *in vitro*;
- Bactérias associadas a plantas de cana apresentam a capacidade de produzir AIA via dependente e independente da utilização do triptofano como precursor;
- Bactérias produtoras de AIA associadas a plantas de cana expressam a produção em diferentes níveis de concentração, variando de 1 a  $190\mu\text{g.mL}^{-1}$ ;
- O local e tempo de cultivo da planta hospedeira e o nicho de colonização bacteriana influenciaram na distribuição das bactérias produtoras de AIA associadas a cana-de-açúcar;
- O local, tempo de cultivo e genótipo da planta hospedeira e o nicho de colonização bacteriana influenciaram nos níveis de produção de AIA por bactérias associadas a cana-de-açúcar;
- As bactérias produtoras de AIA associadas às raízes da cana-de-açúcar apresentam alta variabilidade genética.



### 3.6 REFERÊNCIAS

- ALI, B.; SABRI, A. N.; LJUNG, K.; HASNAIN, S. (2009). Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus spp.* and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). **World Journal of Microbiology Biotechnology** 25:519–526.
- ALI, B.; SABRIL, A. N.; LJUNG, K.; HASNAIN, S.(2008) Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. **Letters in Applied Microbiology** 48: 542–547.
- ARAÚJO, F. F. & GUERREIRO, R. T. (2010). Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo natural e autoclavados. **Ciências Agropecuárias** 34(4):837-844.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journa of Biotechnology** 3.[http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4\(12/04/2011\)](http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4(12/04/2011)).
- BADRI, D. V.; WEIR, T. L.; VAN DER LELIE, D.; VIVANCO, J. M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions.**Current Opinion in Biotechnology** 20:642–650.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. E.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. (2010). Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 34:349-360.
- BARAZANI, O. & FRIEDMAN, J. (2000). Effect of exogenously applied l-tryptophanon allelochemical activity of plantgrowth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Journal of Chemical Ecology** 26(2): 344-349.
- BARBOSA, M. V. (2010). **Interação entre bactérias produtoras de auxinas e diferentes variedade de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) cultivadas em Pernambuco**. Monografia (Graduação). Curso de Agronomia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 72f.
- BECERRA-CASTRO, C.; KIDD, P. S.; PRIETO-FERNÁNDEZ, A.; WEYENS, N.; ACEA, M.-J.; VANGRONSVELD, J. (2011). Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterization. **Plant and Soil**, 340:413–433.

- BERG, G. & SMALLA, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology** 68:1–13.
- BERG, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Appl Microbiol Biotechnol** 84:11–18.
- BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S. (1991). Rapid in situ assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on anitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology** 57: 535-538.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, S.; SESSITSCH, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry** 30: 669-678.
- DIAS, A. C. F; COSTA, F. E. C; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A; ASSUMPCÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. (2009). Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology Biotechnoogy** 25:189–195.
- DODD, I. C.; ZINOVKINA, N. Y.; SAFRONOVA, V. I.; BELIMOV, A. A. (2010). Rhizobacterial mediation of plant hormone status. **Annals of Applied Biology** 157: 361–379.
- EGAMBERDIEVA, D.&KUCHAROVA, Z. (2009). Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. **Biology Fertility of Soils** 45:563–571.
- EGAMBERDIYEVA, D. (2007). The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology** 36:184–189.
- FETT, W. F.; OSMAN, S. F; DUNN, M. F. (1987). Auxin Production by Plant-Pathogenic Pseudomonads and Xanthomonads **Applied and Environmental Microbiology** 53(8): 1839 – 1845.
- FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C.L.; SANTOS, C. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. (2007). Caracterização de rizóbios isolados de jactupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia** 66(3):497-504.

- GOVINDARAJAN, M.; KWON, S.; WEON, H.(2007). Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 23: 997-1006.
- GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. (2006). Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant and Soil** 280:239–252 .
- GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J.(2007). Effect of indole-acetic acid (IAA) on the development of symptoms caused by *Pythium ultimum* on tomato plants. **European Journal of Plant Pathology** 119:457–462.
- HALLMAN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.,; KLOEPPER, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**. 43: 895 -914.
- HARDOIM, P, R.; van OVERBEEK, L. S.; van ELSAS, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology** 16(10): 463-471.
- HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology** 60:579–598.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola-LSPA**:. Rio de Janeiro, v.22 n.02 p.1-80 jan. 2011.
- KARADENIZ, A.; LU, Ş .F T.; INAN, S. (2006). Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 22:1061–1064.
- KUKLINSKY –SOBRAL, J. ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER , A. A.; AZEVEDO, J. L. (2004). Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology** 6(12): 1244-1251.
- LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F.(2011). Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microbiology Ecology** 61:606–618.

- MALHOTRA, M. & SRIVASTAVA, S. (2009). Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology** 45:73–80.
- MANULIS, S.; HAVIV-CHESSNER, A.; BRANDL, M. T.; LINDOW, S. E.; ISAAC. (1998). Differential Involvement of Indole-3-Acetic Acid Biosynthetic Pathways in Pathogenicity and Epiphytic Fitness of *Erwinia herbicola* pv. *Gypsophila*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 11(7): 634–642.
- MARQUES, A. S. A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON, R. (2008). BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. **Genetics and Molecular Biology** 31(1): 106-115.
- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAÚJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. (2007). Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. **Applied and Environmental Microbiology** 73 (22): 7259–7267.
- MERZAEVA, O. V. & SHIROKIKH, G. I. (2010). The Production of Auxins by the Endophytic Bacteria of Winter Rye. **Applied Biochemistry and Microbiology** 46(1): 44–50.
- MORGAN, J. A. W.; BENDING, G. D.; WHITE, P. J. (2005). Biological costs and Benefits to plant–microbe interactions in the Rhizosphere. **Journal of Experimental Botany** 56(417): 1729–1739.
- PATTEN, C. L. & GLICK, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology** 42: 207-220.
- QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W. (1997). Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology** 43: 254-259.
- REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO- RIDESA. (2010). **Catálogo nacional de variedades ‘RB’ de cana-de-açúcar**. RIDESA, 136p.
- ROSENBLUETH, M & MARTÍNEZ-ROMERO, E. (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **The American Phytopathological Society** 19(8): 827-837.

- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review** 31: 425–448.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E.(2006). **Fisiologia vegetal**. 3ª Ed. Artmed. Porto Alegre.
- TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. YU.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV A. I. (2006). Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology** 42(2): 117–126.
- UNIÃO AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. UNICA.**Estatísticas**. São Paulo: União da Agroindústria Canavieira de São Paulo, 2009. Disponível em <<http://www.portalunica.com.br/ação/cana.jsp>>. Acesso: em 15 de fev 2010.
- YANG, S.; ZHANG, Q.; GUO, J.; CHARKOWSKI, A. O.; GLICK, B. R.; ET AL. (2007). Global Effect of Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis on Multiple Virulence Factors of *Erwinia chrysanthemi* 3937. **Applied and Environmental Microbiology** 73 (4): 1079–1088.
- ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. (2006). Biology and chemistry of endophytes. **Natural Products Report**23: 753–771.

## **4 CAPÍTULO II**

# **COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA A CANA SOCA E PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO**

RAMOS, ANDRESA PRISCILA DE SOUZA. Msc. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Agosto de 2011. Capítulo 2 - Comunidade bacteriana associada a cana soca e produção de ácido indol acético. Orientadora: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral. Conselheiros: Prof. Dr. Fernando José Freire e Prof. Dr. Fernando Dini Andreote.

## RESUMO

A interação bactéria-planta pode ser afetada por diversos fatores, como o clima, manejo do solo, o genótipo do hospedeiro, o estado de desenvolvimento da cultura, entre outros. Esses fatores podem influenciar as funções que as bactérias benéficas exercem, como por exemplo, a produção de fitormônios, como o ácido indol acético (AIA). O trabalho teve por objetivos isolar, selecionar e avaliar a variabilidade genética de bactérias produtoras de AIA via dependente e independente de triptofano, associadas às raízes de cana-de-açúcar (primeira soca), e avaliar a diversidade da comunidade bacteriana não cultivável. Foram utilizadas amostras de raízes e de solo rizosférico de três variedades (RB863129, RB867515 e RB92579) de plantas de cana soca cultivadas em Pernambuco. A densidade populacional bacteriana variou entre os nichos avaliados, sendo maior na rizosfera do que nas endofíticas de raiz ( $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> SF e entre  $10^2$  e  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> TVF, respectivamente). Foram isoladas e avaliadas 52 bactérias endofíticas de raiz e da rizosfera de cana soca. Em relação à produção de AIA via dependente de triptofano, 100% das linhagens foram capazes de produzir, e a produção variou de 2 a 108 µg.mL<sup>-1</sup>, destacando-se as linhagens UAGC942 e UAGC967, isoladas rizosfera da variedade RB92579, produzindo 107,99 µg.mL<sup>-1</sup> e 103,97 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Entre as bactérias endofíticas de raiz, sobressaiu-se a linhagem UAGC979, com produção de 80 µg.mL<sup>-1</sup>, isolada da variedade RB92579. Quanto a via independente de triptofano, apenas 47% das bactérias foram capazes de produzir AIA, sobressaindo-se as linhagens UAGC940, produzindo 19,82 µg.mL<sup>-1</sup>, e a linhagem UAGC938, com média de 17,80 µg.mL<sup>-1</sup>, ambas isoladas da rizosfera da variedade RB92579. A análise da variabilidade genética por BOX-PCR resultou em alta variabilidade, devido a heterogeneidade dos perfis, apenas as linhagens UAGC979 e UAGC986 e

UAGC950 e UAGC977 apresentaram alta similaridade, próximo a 70%. A análise da diversidade bacteriana não cultivável resultou em alta similaridade dentro dos nichos de colonização e genótipo da planta hospedeira, acima de 80%, no entanto houve diferenças entre os nichos estudados.

**Palavras-chave:** auxin, diversidade, endofíticos, nicho, rizosfera, variabilidade genética.



RAMOS, ANDRESA PRISCILA DE SOUZA. Msc.atUniversidade Federal Rural de Pernambuco. August 2011. Chapter 2– Bacterial community associated with sugarcane ratoon and production of indole acetic acid. Adviser: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral. Co-Advisers: Prof. Dr. Fernando José Freire e Prof. Dr. Fernando Dini Andreote.

## ABSTRACT

The bacteria-plant interaction may be affected by many factors such as climate, soil management, the host genotype, culture development, among others. These factors may influence beneficial bacteria functions, such as the hormones production such as indole acetic acid (IAA). In this context, the work aimed in isolate, select and evaluate the genetic variability of IAA-producing bacteria, dependent and independent pathway of tryptophan, associated to sugarcane roots (first ratoon), and assess the diversity of bacterial community non-cultivable. Roots samples and three varieties (RB863129, RB867515 and RB92579) sugarcane (first ratoon) rhizosphered crop fields in Pernambuco. The bacterial population density varied between evaluated niches, higher numbered in the rhizosphere than in root endophytic (107 CFU g<sup>-1</sup> and SF between 102 and 103 CFU g<sup>-1</sup> TVF, respectively). Fifty-two root endophytic bacteria and rhizosphere of sugarcane ratoon were isolated and evaluated. Regarding the production of IAA dependent pathway of tryptophan, 100% of the strains were able to produce, and the production ranged from 2 to 108 µg.mL<sup>-1</sup>, thus, the UAGC942 UAGC967 isolated rhizosphere of the variety RB92579, producing 107 , 99 µg.mL<sup>-1</sup> and 103.97 µg.mL<sup>-1</sup>, respectively. Among the root endophytic bacteria, stood out UAGC979 strain, producing 80 µg.mL<sup>-1</sup>, variety RB92579 isolated. From the tryptophan-independent route, only 47% of the bacteria were able to produce IAA, standing out UAGC940 lines, producing 19.82 µg.mL<sup>-1</sup>, and strain UAGC938, averaging 17.80 µg.mL<sup>-1</sup> both isolated from the rhizosphere of the variety RB92579. The analysis of genetic variability by BOX-PCR resulted in high variability due to heterogeneity profiles, only the strains UAGC979, UAGC986 and UAGC950, UAGC977 showed high similarity close to 70%. The analysis of non-cultivable bacterial diversity resulted in high similarity

within the niche colonization and host plant genotype, over 80%, although, there were differences between the niches studied.

**Key words:** auxin, diversity, endophytes , genetic variability, niche, rhizosphere

## 4.1 INTRODUÇÃO

As bactérias associadas às plantas colonizam diferentes nichos, como a rizosfera e o rizoplane (epifíticas da raiz) e endofiticamente na raiz, que se mostram ambientes propícios para o desenvolvimento bacteriano, pois apresentam a deposição das substâncias secretadas pelas raízes. Essas substâncias são ricas em fontes de carbono, vitaminas, reguladores de crescimento e nutrientes que estimulam a atividade microbiana e a diversidade de espécies ali existentes (BERG & SMALLA, 2009; LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009).

As bactérias endofíticas, epifíticas e do solo podem trazer benefícios a planta hospedeira, como a disponibilização de nutrientes, proteção microbiológica e produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal (BADRI et al., 2009; MORGAN et al., 2005). Neste contexto, as bactérias têm a capacidade de produzir metabólitos secundários, ricos em substâncias, que são utilizados pelas plantas para promover o seu desenvolvimento. Dentre estes metabólitos, estão as substâncias promotoras de crescimento vegetal, como os fitormônios. O ácido indol acético (AIA), que faz parte do grupo das auxinas, é o fitormônio encontrado em maiores quantidades nos vegetais, e também o mais estudado e produzido, de forma idêntica, por bactérias promotoras de crescimento (PATTEN & GLICK, 1996).

Diversos fatores bióticos e abióticos podem influenciar a diversidade e a funcionalidade da comunidade bacteriana associada ao solo, como o clima, manejo do solo, aplicação de defensivos agrícolas, atividades antropogênicas, tipo de solo e até a própria cultura e seu manejo, bem como o genótipo, sanidade e estado de desenvolvimento da mesma (COMPANT et al., 2010; BERG & SMALLA, 2009; KUKLISNKY-SOBRAL et al., 2004).

Para o melhor entendimento e conhecimento da microbiota e das funções que estas exercem quando em interação com as plantas, se faz necessário a aplicação de técnicas que permitam o acesso as comunidades bacterianas cultiváveis e não cultiváveis. As técnicas dependentes de cultivo, como o isolamento, permitem o conhecimento das comunidades bacterianas que se desenvolvem fora do ambiente natural, geralmente os grupos

dominantes, atingindo apenas 1% de toda comunidade presente no ambiente, enquanto que as técnicas independentes de cultivo permitem acessar não só os grupos dominantes, mas diferentes grupos existentes, geralmente através das ferramentas moleculares (VAN ELSAS & BOERSMA, 2011; GARBEVA et al., 2001).

Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: i) isolar e selecionar bactérias produtoras de AIA via dependente e independente de triptofano; ii) avaliar a comunidade bacteriana cultivável associada a raízes de plantas de cana soca; iii) avaliar a diversidade genética de bactérias produtoras de AIA; iv) avaliar a comunidade bacteriana não cultivável associada a plantas de cana soca.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### ***4.2.1 Isolamento de bactérias associadas a plantas de cana soca***

#### *4.2.1.1 Amostras vegetais*

Foram utilizadas amostras de raízes e da rizosfera das variedades de cana-de-açúcar RB92579, RB867515 e RB863129, cultivadas na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Carpina (EECAC), Carpina – PE, aos três meses de rebrota após o primeiro corte (1ª soqueira). Após a coleta, as amostras foram levadas para o Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, para serem processadas.

#### *4.2.1.2 Isolamento de bactérias endofíticas*

As amostras de raiz foram lavadas em água corrente para a retirada de resquícios de solo e partes mortas. Em seguida, as raízes foram pesadas e, aproximadamente, 3g de cada amostra foram utilizados. Em seguida, foram desinfetadas superficialmente, conforme a metodologia descrita por Kuklinsky-Sobral et al. (2004), e Araújo et al. (2010), seguindo as seguintes etapas de desinfecção: imersão em álcool 70% por 1 minuto, imersão em hipoclorito de sódio (2,5% do cloro ativo) por 3 minutos, seguida, de nova imersão em outra

solução de álcool 70% por 30 segundo. Ao final do processo, as raízes foram lavadas por duas vezes em água destilada estéril. Em seguida, as amostras de raiz foram cortadas, em pequenos fragmentos e macerados, assepticamente, em 10mL de tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*- PBS: 1,44g L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,24g L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,20g L<sup>-1</sup> de KCl; 8,00g L<sup>-1</sup> de NaCl; pH 7,4).

Após este procedimento, todo o material foi transferido para tubos de 50mL e incubados sob agitação (120 rpm) a 28°C por 40min. Após a incubação, as amostras foram diluídas e alíquotas de 100µL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo meio TSA 10% (*Trypcase Soy Agar*) sólido acrescido do fungicida Cercobyn 700 (50 µg.mL<sup>-1</sup>) e incubadas a 28°C por até 15 dias.

Alíquotas de 100µL da água das últimas lavagens de cada amostra foram inoculadas em placas com meio TSA 10% sólido para confirmar a eficácia da desinfecção realizada.

A população bacteriana cultivável foi estimada através da contagem das unidades formadoras de colônia obtidas por grama de tecido vegetal fresco (UFC g<sup>-1</sup> TVF) aos 4, 7 e 15 dias de incubação. O critério de seleção utilizado buscou escolher as colônias mais diversificadas possível em relação as suas características morfológicas como a cor, o formato, e ao tamanho da colônia, sendo repicadas das placas de isolamento para novas placas contendo meio TSA 10% e purificadas pela técnica de esgotamento. Em seguida, colônias isoladas foram inoculadas em meio TSA 10% líquido, incubadas por 24 horas a 28°C e 150 rpm, em seguida foram suplementadas com 20% de glicerol e armazenadas a -20°C,.

#### 4.2.1.3 Isolamento de bactérias rizosféricas

Para o isolamento de bactérias da rizosfera, foram pesados 5g do solo rizosférico e colocados em erlenmeyers contendo cerca de 5g de pérolas de vidro e 50mL de tampão PBS. Em seguida, foram mantidos sob agitação constante a 90 rpm por 40 minutos a 28°C. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em tampão PBS e retiradas alíquotas de 100µL e inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura TSA 10% sólido, adicionado com o fungicida Cercobyn 700 (50 µg.mL<sup>-1</sup>), e incubados a 28°C para avaliação após 4, 7 e 15 dias.

A população bacteriana cultivável foi estimada através da contagem das unidades formadoras de colônia obtidas por grama de solo fresco (UFC g<sup>-1</sup> SF). As colônias selecionadas de acordo com as características morfológicas foram repicadas das placas de isolamento para novas placas contendo meio TSA 10% e purificadas pela técnica de esgotamento. Em seguida, colônias isoladas foram inoculadas em meio TSA 10% líquido, incubadas por 24 horas a 28°C e, em seguida, suplementadas com 20% de glicerol e armazenadas a -20°C.

#### **4.2.2 Seleção de Bactérias Produtoras de *Ácido Indol Acético* - via dependente de *Triptofano***

Para a seleção de bactérias produtoras de AIA via dependente de triptofano e a quantificação da produção, todas as linhagens foram inoculadas, a partir de colônias isoladas, em meio líquido TSA 10% com o acréscimo de 5mM de L-triptofano, incubadas a 28°C sob agitação constante (125 rpm), na ausência da luz, por 24 horas.

Após o período de crescimento, as amostras foram submetidas a reação colorimétrica de acordo com a metodologia descrita por Bric et al. (1991). Dois mililitros da cultura foram centrifugados a 11764g por 5min, destes, retirou-se uma alíquota de 1 mL do sobrenadante e homogeneizou-se com 1 mL do reagente de Salkowski (2% de FeCl<sub>3</sub> 0,5M em 35% de ácido perclórico), incubou-se no escuro a 28°C durante 30 minutos. A reação foi submetida a leitura da absorbância em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 530nm. A concentração de AIA foi estimada por meio de uma curva padrão, utilizando valores conhecidos de AIA sintético (Vetec) 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300 e 350 µg mL<sup>-1</sup>, em meio de cultura esterilizado não inoculado (BARBOSA, 2010; ARAUJO & GUERREIRO 2010; BALDOTTO et al., 2010).

O ensaio foi realizado em triplicata e foi utilizada como controle positivo a linhagem EN303 (*Pseudomonas oryzae*), bactéria endofítica de soja que é produtora de auxina (Kuklinsky-Sobral et al., 2004).

#### **4.2.3 Seleção de Bactérias Produtoras de *Ácido Indol Acético* - via independente de Triptofano**

Para a seleção de bactérias produtoras de AIA via independente de triptofano e a quantificação da produção, algumas linhagens foram inoculadas, a partir de colônias isoladas, em meio líquido TSA 10% sem o acréscimo de 5mM de L-triptofano, incubadas a 28°C sob agitação constante (125 rpm), na ausência da luz, por 24 horas.

Adotou-se a mesma metodologia descrita anteriormente para a análise com adição de triptofano, como citada acima.

#### **4.2.4 Análise Estatística**

Os dados de frequência foram submetidos ao Teste de Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para confirmar se houve ou não influência dos fatores: genótipo da planta hospedeira e nicho de colonização bacteriana sobre a distribuição das linhagens produtoras de AIA. Os dados da quantificação de produção de AIA foram transformados em  $\sqrt{X} + 1$  para atender aos requisitos estatísticos e arranjados como fatorial dupla e submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias Scott-Knott, utilizando o software SISVAR 5.0.

#### **4.2.5 Análise da Variabilidade Genética Bacteriana por BOX-PCR**

Para a análise da variabilidade genética, as linhagens bacterianas foram inoculadas, a partir de colônias isoladas, em 4 mL de meio líquido TSA 10%, incubadas a 28°C sob agitação constante (125 rpm) por 24 horas. Após o período de crescimento, a cultura foi transferida para microtubos autoclavados de 2 mL, centrifugados a 11764g por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante, e repetindo o procedimento até utilizar todo o meio de cultura com o crescimento bacteriano. O *pellet* formado, ao final do processo de centrifugação, foi submetido a extração de DNA genômico total, realizado através do *Bacterial Genomic DNA Isolation Kit* (Norgen) de acordo com as especificações do fabricante.

A análise da diversidade genética das linhagens foi realizada por meio da técnica BOX-PCR, utilizando o *primer* BOXA1R (5'-

CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'). As reações de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) foram preparadas para um volume final de 25 µL contendo 0,5 a 10 ng de DNA molde; 1mM de cada dNTP; 3,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 1x do tampão da enzima *Taq Buffer*, 1µM do *primer* BOX- A1R; 1x de DMSO (dimetilsufoxamida) e 0,08U da enzima *Taq DNA Polimerase* (Fermentas). A reação de PCR foi realizada em termociclador, com a seguinte condição de ciclo: 95°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos para desnaturação a 94°C por 2 minutos, 92°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 min, extensão de primer a 65°C por 1 min e seguida de extensão final a 65°C por 10 min. Após a amplificação, toda a reação de PCR foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,5% p/v) em tampão 1x TAE (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA) e corado com *Blue Green Loading Dye*, (LGC Bio) e observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado.

As bandas geradas pela amplificação foram transformadas em dados binários, e com estes foi construída uma planilha que foi analisada através do software Past 1.90 (HAMMER et al., 2001), empregando-se o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) e aplicado o Coeficiente de Jaccard para obter-se a matriz de similaridade entre as linhagens analisadas.

#### **4.2.6 Análise da Comunidade Bacteriana não-Cultivável por DGGE**

##### 4.2.6.1 Extração do DNA total do solo e do material vegetal

O DNA total do solo rizosférico e das raízes, desinfetadas superficialmente, foi extraído pelo *PowerSoil DNA Isolation Kit* (MO BIO), de acordo com as especificações do fabricante.

##### 4.2.6.2 PCR e análise por DGGE

As reações de PCR para a análise de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) foram realizadas para um volume final de 50µL, utilizando cerca de 20 ng do DNA molde, 0,2 µM dos *primers* 338F-GC(5'-GC-grampo ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') e R518 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG- '3) específicos para o gene 16S rRNA; 0,2 mM de cada dNTPs ; 5,0 µL de *Taq*



buffer 10X; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas). E foi utilizado um controle negativo sem o DNA molde.

Em seguida, a reação foi levada ao termociclador, com a seguinte condição de ciclo: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos para desnaturação a 92°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Em seguida 5µL da reação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose (1,2% p/v) em tampão 1x TAE e corado com SyberGold (Invitrogen) e fotodocumentado.

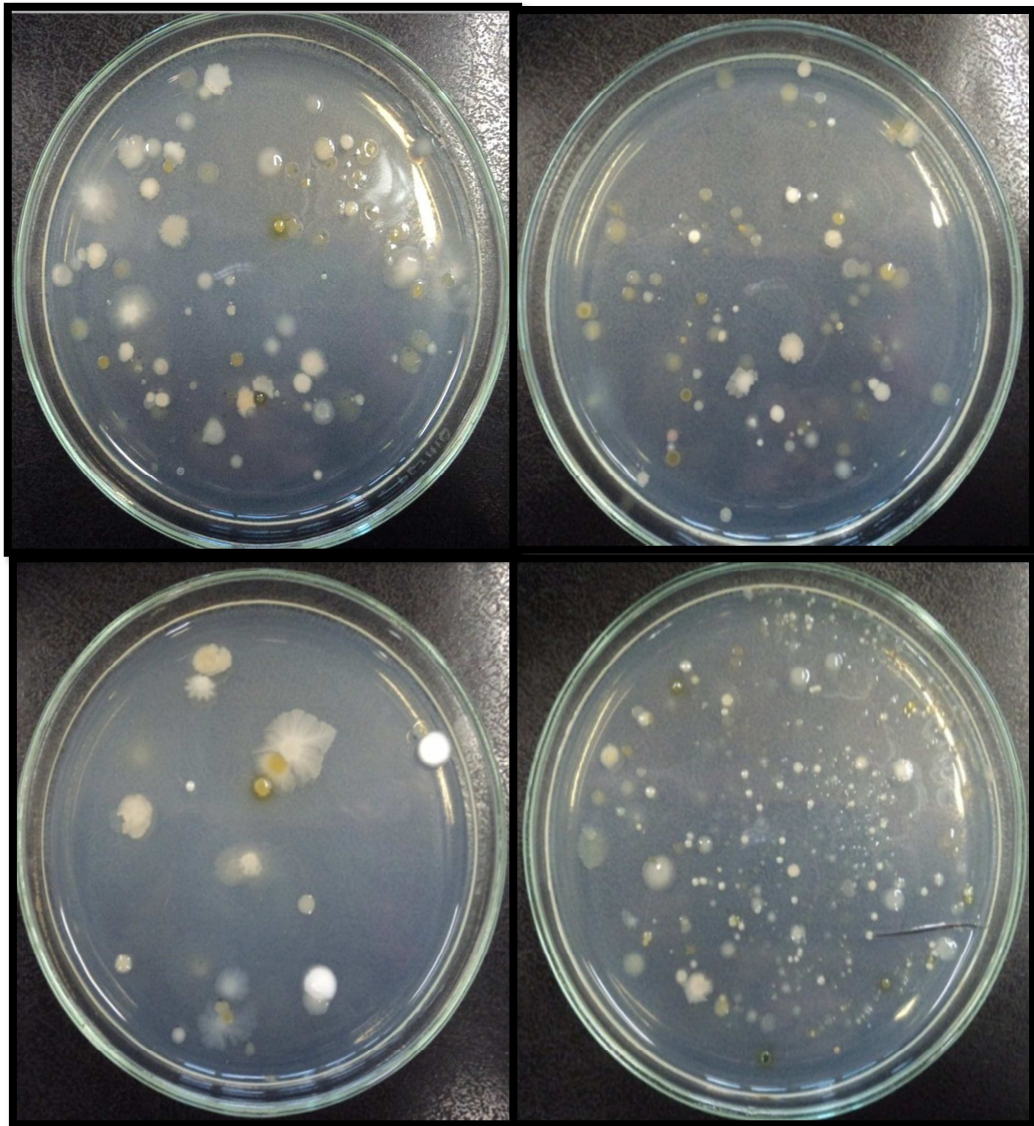
A análise por DGGE foi realizada no sistema D'Code Universal Mutation Detection System (Bio Rad). Os produtos de PCR foram colocados em gel de poliacrilamida (6% acrilamida) vertical, com gradiente desnaturante de uréia/formamida (45% a 65%) corrido a 200V em 60°C por três horas. Após a corrida, o gel foi corado com SyberGold 1:10 000 (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante, observado sobre luz ultravioleta e fotodocumentado.

As bandas geradas pela amplificação foram transformadas em dados binários, e com estes foi construída uma planilha que foi analisada através do software Past 1.90 (HAMMER et al., 2001), empregando-se o algoritmo UPGMA e aplicado ao Coeficiente de Jaccard para obter o índice de similaridade entre as amostras.

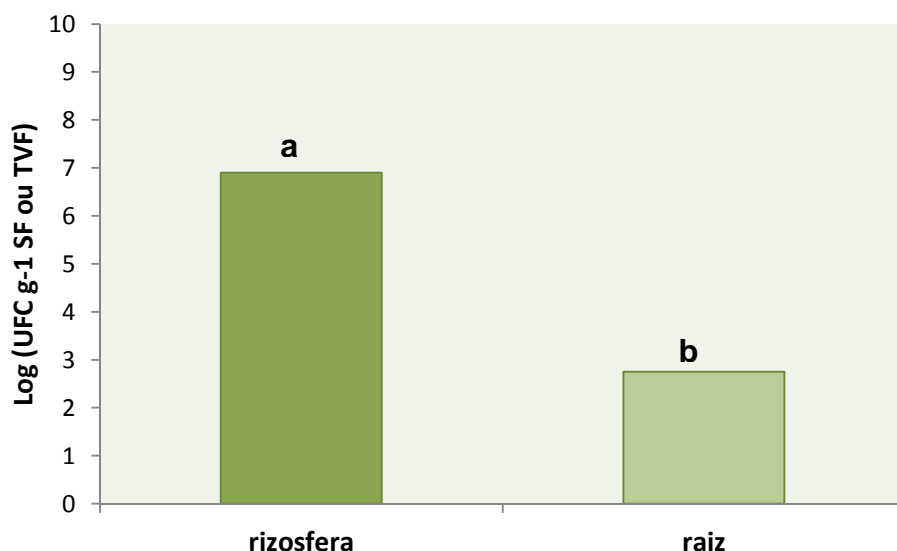
## **4.3 RESULTADOS**

### **4.3.4 Comunidade Bacteriana Cultivável Associada à Cana Soca**

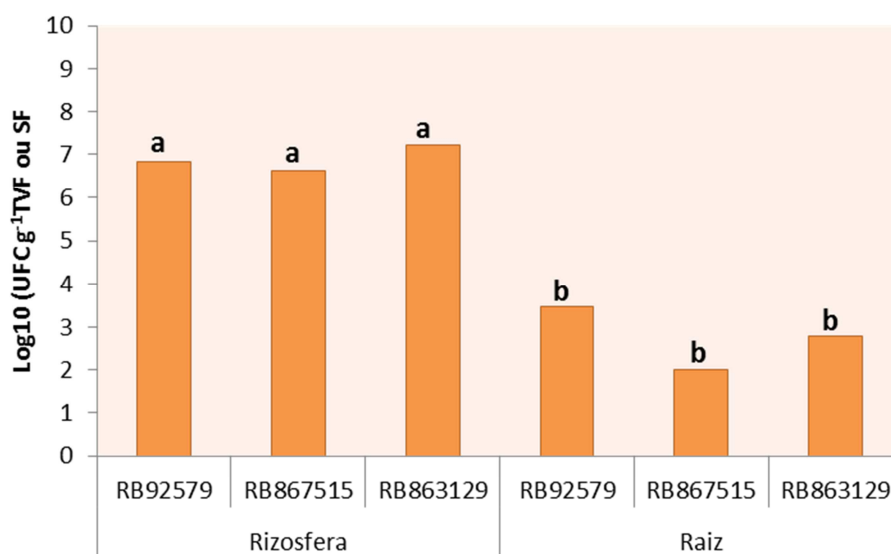
O isolamento de bactérias cultiváveis, tanto endofíticas de raiz quanto da rizosfera, resultou em alta diversidade morfológica de colônias em meio de cultura TSA (Figura 4.1). Quanto a densidade populacional bacteriana observada, verificou-se que a rizosfera apresentou maior densidade, 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup> SF, diferindo estatisticamente da densidade observada para as bactérias endofíticas de raiz, que variou entre 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup> UFC.g<sup>-1</sup> TVF (Figura 4.2). Considerando-se a densidade populacional bacteriana em relação as variedades em função de cada nicho de colonização bacteriana (Figura 4.3), foi observado que não houve diferença entre as variedades dentro de cada nicho, só entre os nichos, confirmando o exposto anteriormente.



**Figura 4.1.**Placas de Petri do isolamento de bactérias associadas às raízes e rizosfera de plantas de cana soca, em meio de cultura TSA sólido.



**Figura 4.2.** Densidade populacional bacteriana em relação ao nicho de colonização bacteriana (rizosfera e endofíticas de raiz) de plantas de cana soca. Médias de três repetições. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ).



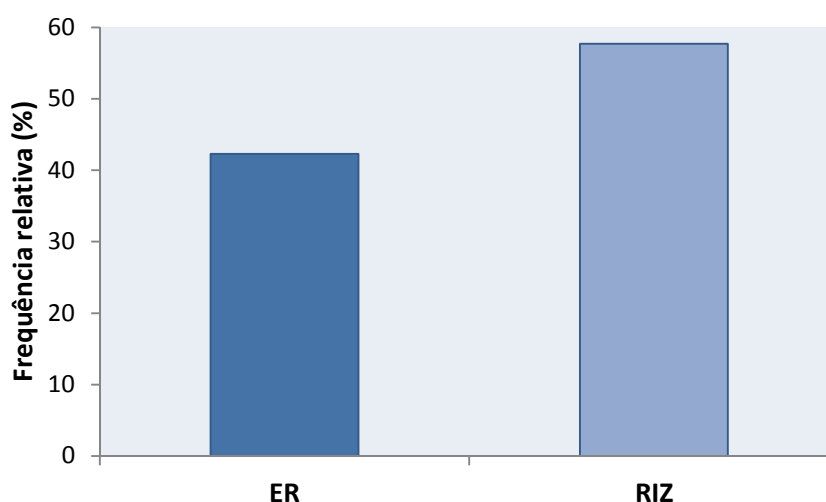
**Figura 4.3.** Densidade populacional bacteriana em relação às variedades de cana soca (RB92579; RB867515; RB863129) em cada nicho de colonização bacteriana (rizosfera e endofíticas de raiz). Médias de três repetições. Médias com a mesma letra não diferem significativamente entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.5 *Bactérias Produtoras de Ácido Indol Acético* 4.3.2.1 *Via dependente de triptofano*

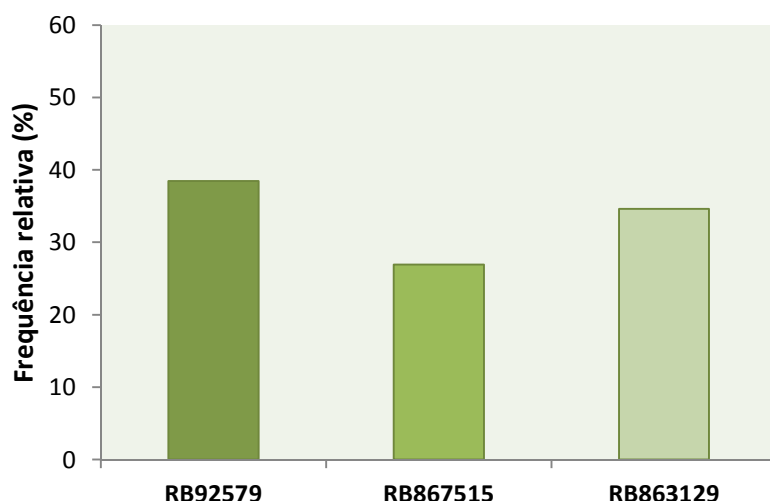
Foram avaliadas 52 bactérias isoladas das variedades RB92579, RB 867515 e RB3129 de cana-de-açúcar, aos 3 meses de cultivo da fase soca, dos nichos endofítica de raiz e da rizosfera. Destas, foram avaliados a distribuição das linhagens produtoras de AIA quanto ao nicho de colonização bacteriana e a variedade de cana-de-açúcar.

Foi observado que 100% das linhagens avaliadas apresentaram capacidade de produzir AIA em meio com acréscimo de triptofano. Quando foi analisada a distribuição das linhagens em relação ao nicho de colonização bacteriana (Figura 4.4), foi observado que a maior frequência de bactérias produtoras de AIA apresentou-se na rizosfera, que englobou cerca de 60% das linhagens, e esta diferença foi confirmada através da aplicação do teste  $\chi^2$ .

A distribuição das linhagens produtoras de AIA em relação às variedades de cana revela que a variedade RB92579 deteve cerca de 39% das linhagens, seguida da variedade RB863129, com 35% das linhagens produtoras de AIA (Figura 4.5). No entanto, o teste de  $\chi^2$  mostrou não haver diferença entre as variedades.

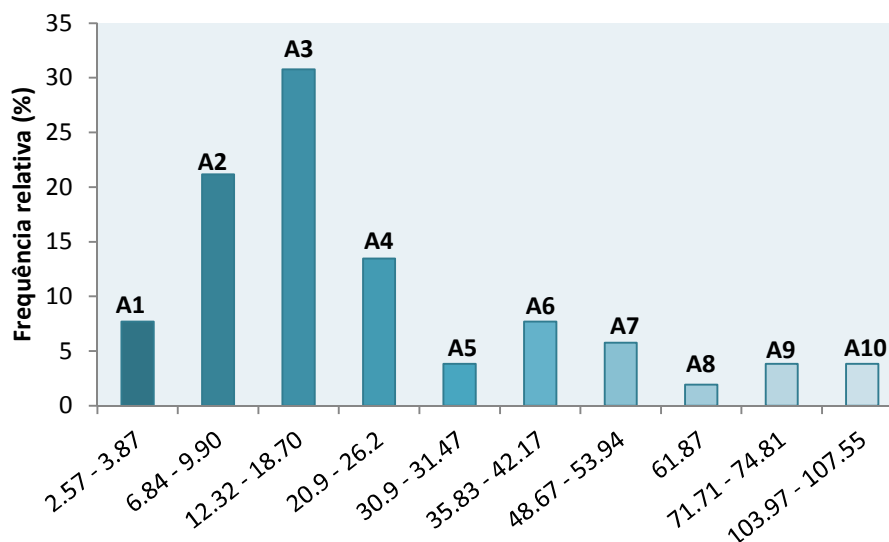


**Figura 4.4.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, via dependente de triptofano, em relação ao nicho do qual foram isoladas. **ER:** endofítica de raiz e **RIZ:** rizosfera. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência dos nichos ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.5.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA, evia dependente de triptofano, em relação a três variedades de cana soca (RB92579; RB867515; RB863129)das quais foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou quenão houve influência das variedades ( $p < 0,05$ ).

Além da frequência das bactérias produtoras de AIA, também foi avaliada a quantificação da produção desta auxina. Os dados resultantes da quantificação foram inicialmente submetidos ao teste de Scott-Knott, levando em consideração apenas as suas respectivas produções. O teste agrupou as produções em 10 grupos distintos (Figura 4.6), onde o grupo A3 apresentou a maior frequência, comportando cerca de 31% das linhagens, e apresentaram intervalo de produção entre 12 e 18  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , seguido do grupo A2 com 21% , onde as linhagens pertencentes a este grupo produziram entre 6 e 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  , e do grupo A7 com 13,5% das linhagens, com produção entre 20 e 27  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Contudo, o grupo A8 apresentou apenas 1,92% das linhagens produtoras de AIA (Figura 4.6).

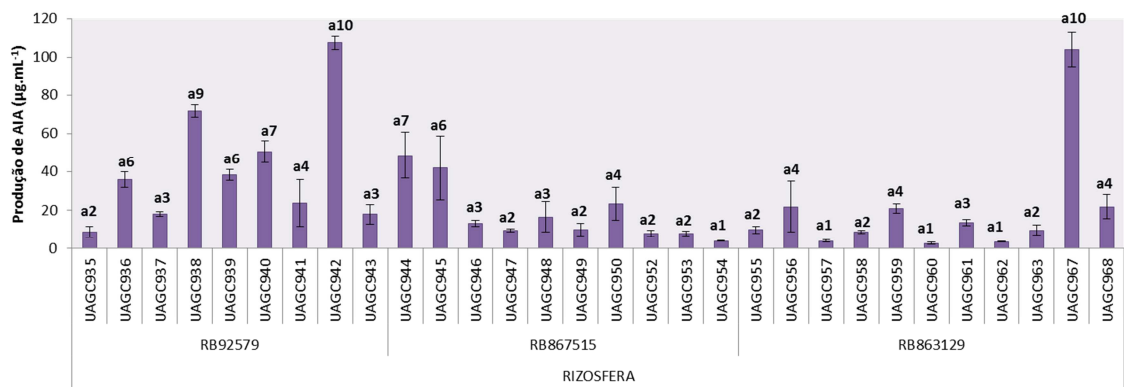


**Figura 4.6.** Distribuição das linhagens bacterianas segundo os níveis de produção de AIA, via dependente de triptofano, agrupadas de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

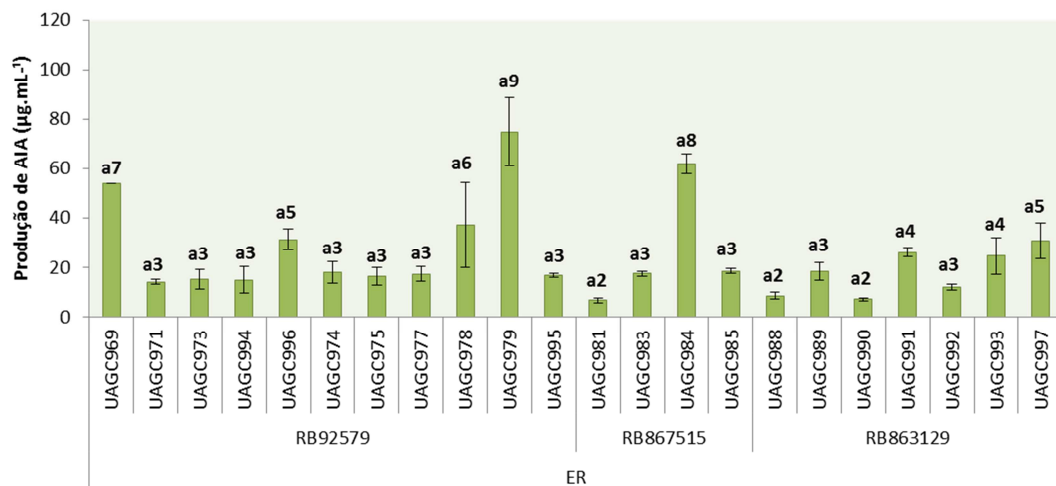
Considerando a produção de AIA por bactérias isoladas da rizosfera, foi observado que as linhagens UAGC942, UAGC967 e UAGC938 obtiveram destaque na produção, com concentrações de  $107,99 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $103,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e  $71,71 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente (Figura 4.7). É interessante ressaltar que em relação à variedade de cana, houve mais linhagens que apresentaram maior produção de AIA isoladas da variedade RB92579 do que nas demais variedades (Figura 4.7).

A produção de AIA pelas bactérias endofíticas foi bem menor (Figura 4.8), em relação às da rizosfera, destacando-se apenas a linhagem UAGC979, com produção que não ultrapassou os  $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , seguido da linhagem UAGC984, com cerca de  $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Com relação às variedades, notamos que a produção das linhagens foi um pouco mais uniforme que as demais.

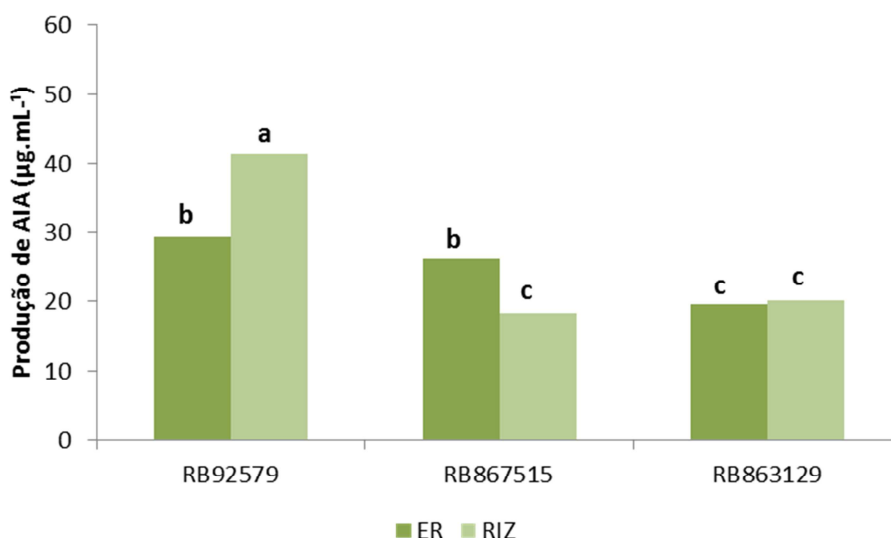
O nicho de colonização bacteriana e o genótipo da planta hospedeira influenciaram a distribuição de bactérias produtoras de AIA, além de ter sido observado interação entre nicho e genótipo. Contudo, de acordo com a análise de variância, os efeitos principais não foram significativos, mas a interação entre nicho e genótipo foi significativa, e quando submetido ao teste de Scott-Knott, verificou-se que a variedade RB92579 se destacou na produção, com médias em torno dos  $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 4.9).



**Figura 4.7.** Produção de AIA, via dependente de triptofano, por bactérias isoladas da rizosfera de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579; RB867515; RB863129), cultivadas na EECAC aos três meses de rebrota na fase soca. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.8.** Produção de AIA, via dependente de triptofano, por bactérias endófitas isoladas de raízes de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579; RB867515; RB863129), cultivadas na EECAC aos três meses de rebrota na fase soca. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.9.** Influência do nicho de colonização bacteriana (ER: endofítica de raiz; Riz: rizosfera) em função das variedades de cana-de-açúcar (RB92579; RB867515; RB863129), sobre a produção de AIA, em meio de cultura com o acréscimo de L-triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

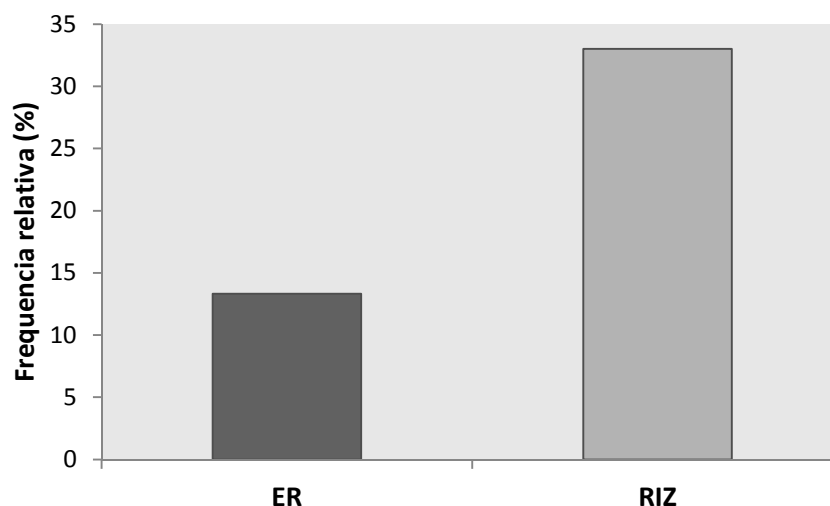
#### 4.3.2.2 Via independente de triptofano

Dentre as linhagens produtoras de AIA, com capacidade de utilizar o triptofano como precursor, 15 bactérias foram selecionadas para a avaliação da capacidade de produzir AIA por via metabólica alternativa, ou seja, independente de triptofano. Destas, 46,7% apresentaram a capacidade de produzir AIA em meio de cultura sem o acréscimo de L- triptofano.

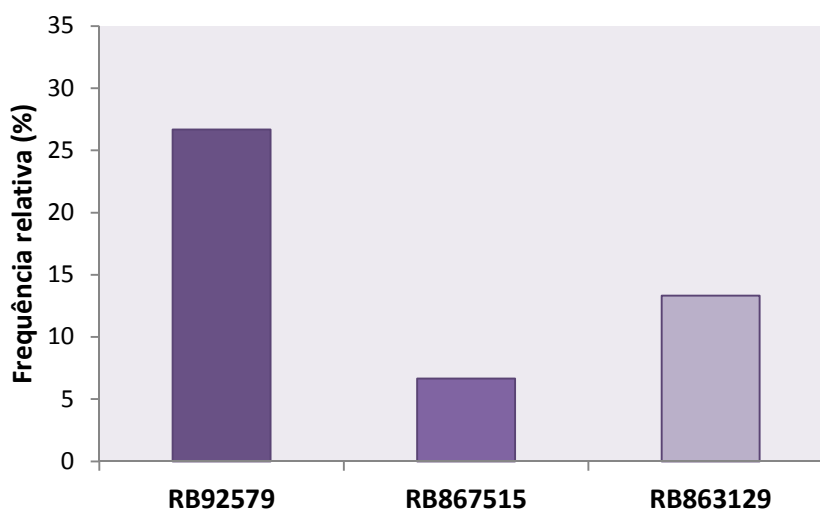
De acordo com a figura 4.10, a distribuição as linhagens produtoras de AIA, em meio de cultura sem a adição de L-triptofano, apresentou-se semelhante a frequência das linhagens com a adição do aminoácido, onde, das linhagens produtoras, 33% foram oriundas da rizosfera, tendo a diferença comprovada através do teste de  $\chi^2$ .

Quanto a distribuição das linhagens produtoras em relação às variedades de cana, como nas linhagens que produziram AIA pela via dependente de triptofano, a RB92579 também deteve a maior frequência, com cerca de 27 % das linhagens, e a diferença entre estas foi comprovada através da aplicação do teste de  $\chi^2$  (Figura 4.11).



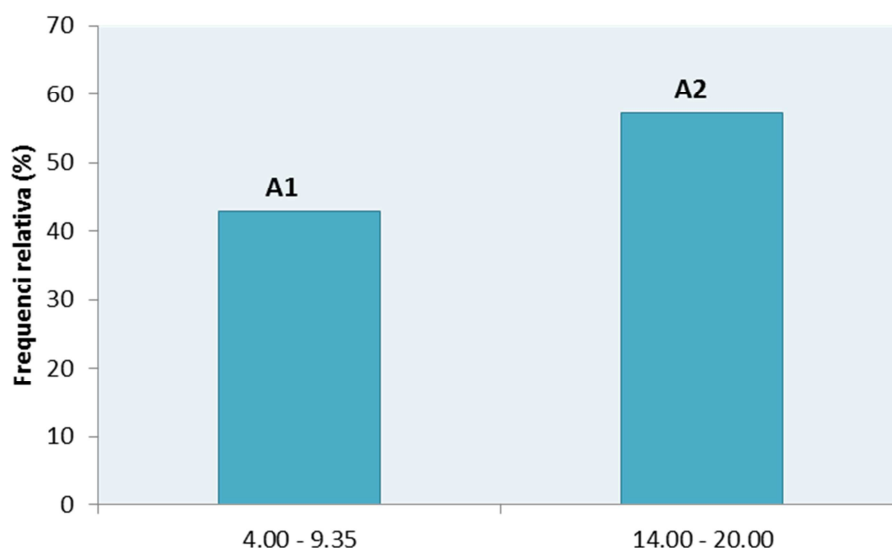


**Figura 4.10.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA via independente de triptofano, em relação ao nicho qual foram isoladas. **ER**: endofítica de raiz e **RIZ**: rizoplano A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência do nicho ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.11.** Distribuição das linhagens bacterianas produtoras de AIA via independente de triptofano, em relação às variedades (RB92579; RB867515; RB863129) de cana que foram isoladas. A análise pelo teste do  $\chi^2$  mostrou que houve influência das variedades ( $p < 0,05$ ).

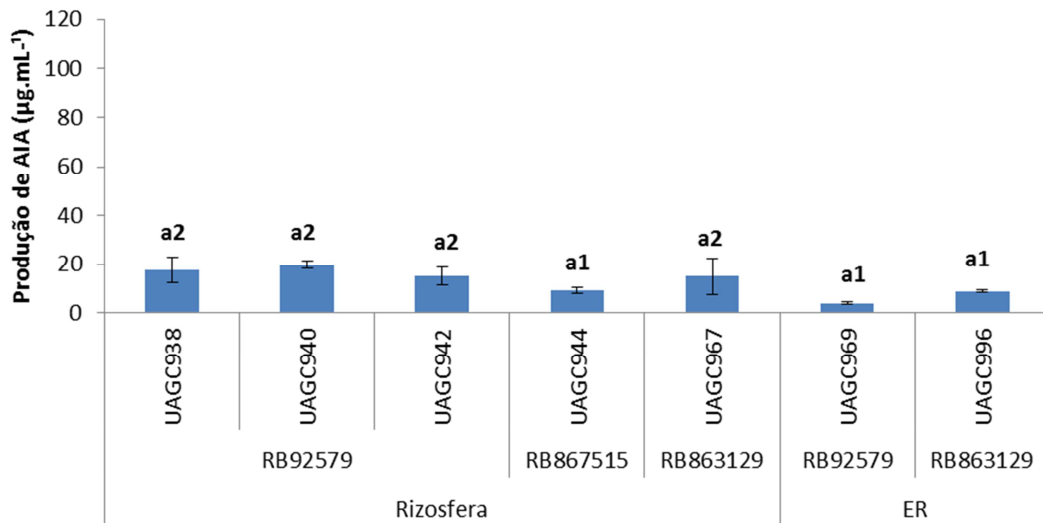
Quanto à quantificação da produção de AIA sem a adição de L-triptofano, os dados da mesma também foram submetidos ao teste de Scott-Knott, que agrupou as linhagens em dois grupos (Figura 4.12), onde o grupo A2 deteve aproximadamente 60% das linhagens, com produção entre 14 e 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .



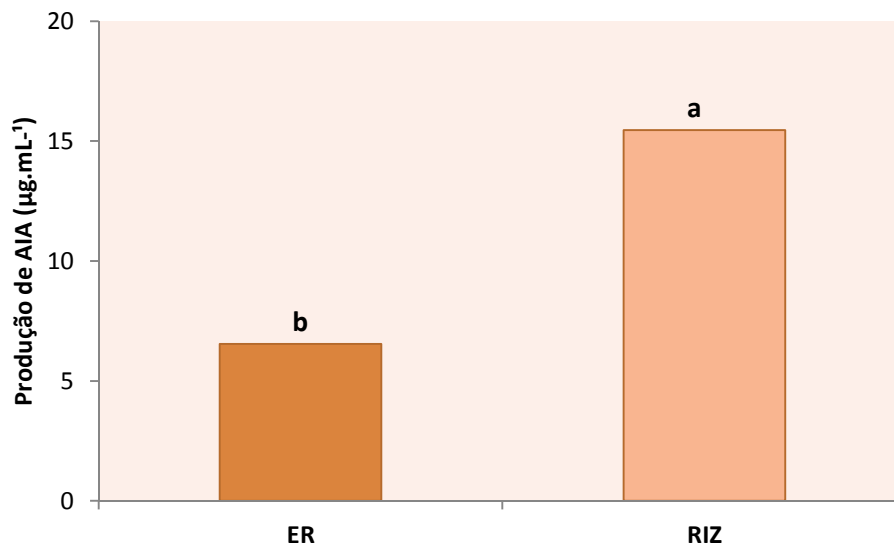
**Figura 4.12.** Distribuição das linhagens bacterianas segundo os níveis de produção de AIA, via independente de triptofano, agrupadas de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Em relação à produção de AIA por bactéria, via independente de triptofano, sobressaíram-se as linhagens UAGC940, com produção média de 19,82  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , seguida da linhagem UAGC938, com média de 17,80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , ambas isoladas da rizosfera da variedade RB92579 (Figura 4.13).

Quanto à influência das variáveis na produção de AIA, apenas o nicho de colonização bacteriana se mostrou significativo, ao nível de 5% de probabilidade de acordo com o teste de Scott-Knott (Figura 4.14). Tanto a variedade, quanto a interação entre nicho e variedade não foram significativas de acordo com a análise de variância.



**Figura 4.13.** Produção de AIA ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), via independente de triptofano, por bactérias endofíticas de raízes e da rizosfera de variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515, RB863129), cultivadas na EECAC, aos três meses de rebrota na fase soca. **ER:** Endofítica de raiz. Média de três repetições. Letras seguidas de números iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).



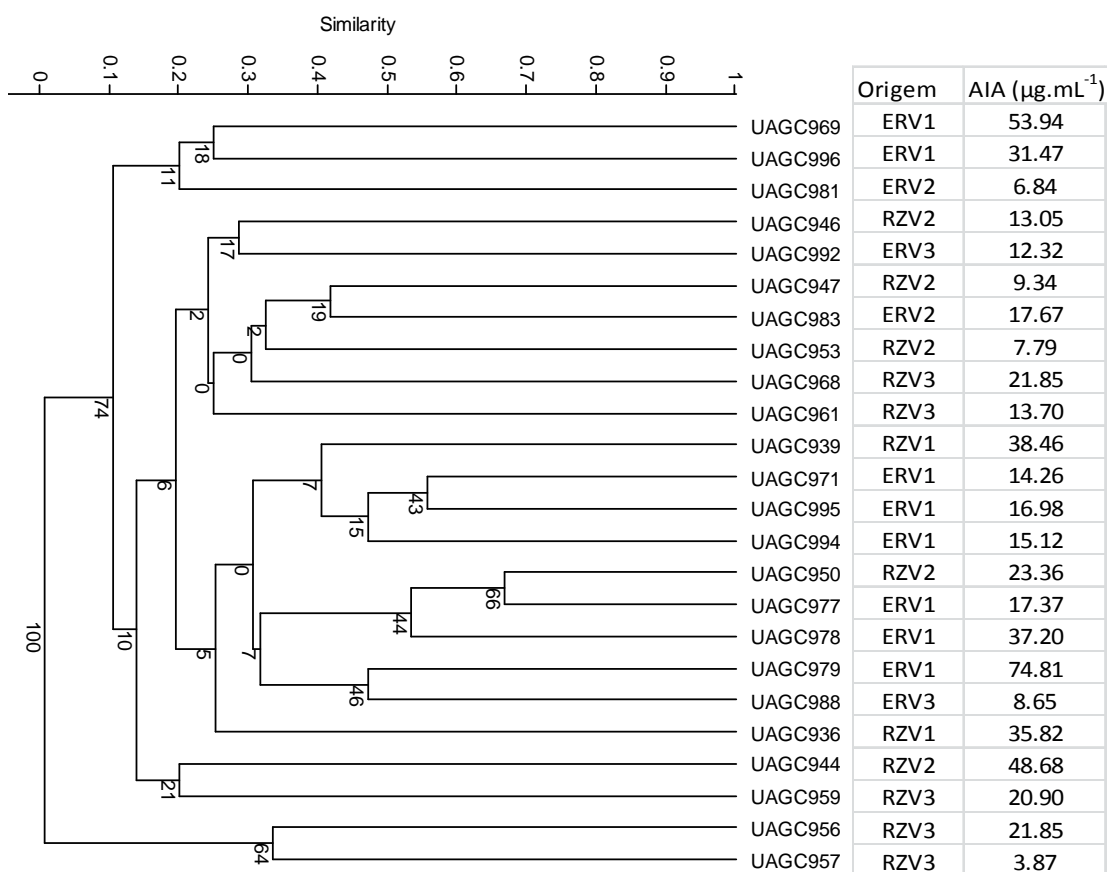
**Figura 4.14.** Influência do nicho de colonização bacteriana (ER: endofítica de raiz; Riz: rizosfera) sobre a produção de AIA, via independente de triptofano. Letras iguais não diferem entre si, de acordo com o Teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

#### **4.3.6 Análise da Variabilidade Genética Bacteriana por BOX-PCR**

A análise da variabilidade genética, pela técnica de BOX-PCR, foi realizada em 13 linhagens endofíticas de raiz e 12 da rizosfera, expressando níveis de produção de AIA diferentes. A técnica utilizada permitiu a visualização de perfis de banda, variando entre 250 e 8000 pb, que foram gerados pela amplificação de regiões repetitivas do genoma bacteriano, através da utilização do *primer* BOX A1R.

A análise foi realizada através da construção de um dendrograma (Figura 4.15) de similaridade, construído através de uma matriz de presença-ausência, de acordo com os perfis de banda das linhagens. O dendrograma indicou alta variabilidade genética entre as linhagens, apenas as linhagens UAGC950 e UAGC977 apresentaram alta similaridade, próximo a 70%. O restante das linhagens apresentou similaridade abaixo de 55%, de acordo com o índice de Jaccard.

As linhagens UAGC950 e UAGC977 foram isoladas de variedades diferentes e de nichos diferentes, a primeira é oriunda da rizosfera da variedade RB867515, produzindo 23  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto que a segunda é endofítica de raiz originada da variedade RB92579 e produziu 18  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Figura 4.15).



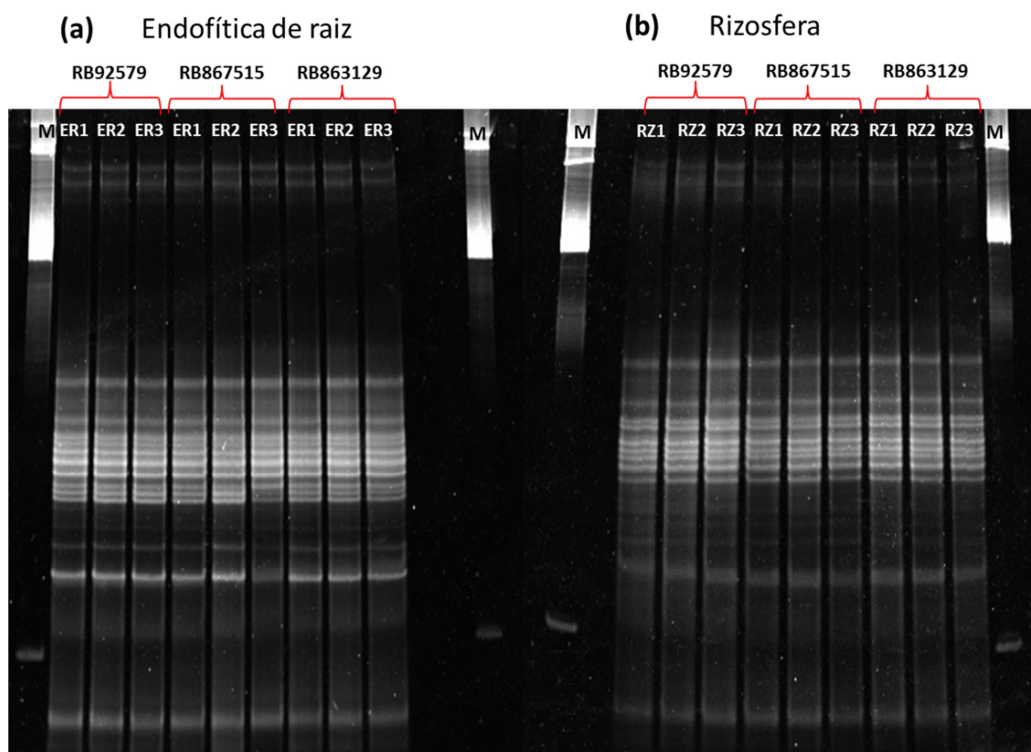
**Figura 4.15.** Dendrograma de similaridade mostrando o agrupamento das linhagens bacterianas produtoras de AIA associadas a plantas de cana soca, com base nas sequências obtidas pelo *primer* BOX A1R, através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com *bootstrap* de 1.000 vezes. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso. **ER**: endofítica de raiz; **RZ**: rizosfera; **V1**: RB92579; **V2**: RB867515 e **V3**: RB863129.

#### 4.4 Análise da Comunidade Bacteriana Não Cultivável por DGGE

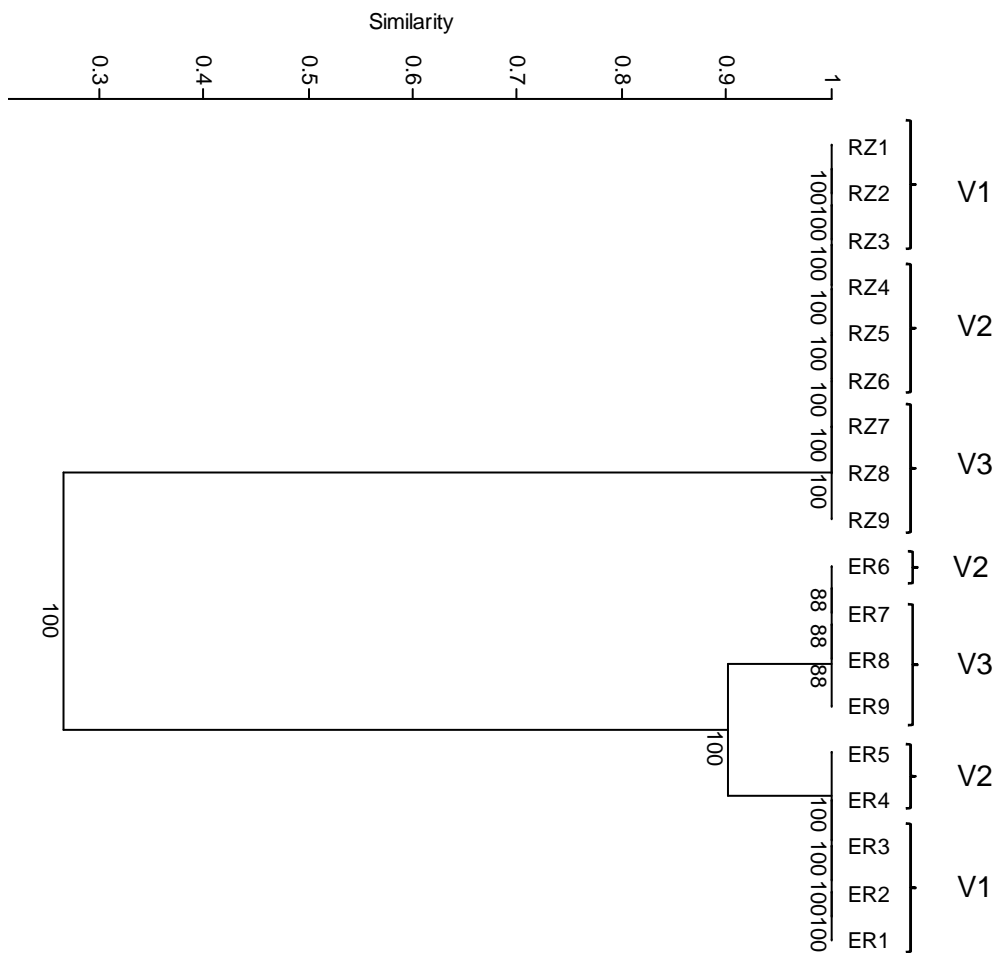
Diferente dos resultados obtidos pela técnica de BOX-PCR, a análise da diversidade genética por DGGE, através do gene 16S rRNA, onde os *primers* amplificaram a região 338 - 518 do 16S rDNA, visualmente, observou-se grande homogeneidade nos perfis entre as variedades dentro de cada nicho, mas apresentaram pequenas diferenças entre os nichos abordados (Figura 4.16).

Apesar disso, dentro das variedades no nicho endofítica de raiz houve um agrupamento entre as amostras, mostrando que houve pequenas diferenças entre as variedades, mas, no entanto, a similaridade continuou acima de 80%, mostrando que são altamente similares (Figura 4.17).

A similaridade encontrada dentro de cada nicho pode representar grupos bacterianos dominantes, já que foi amplificado o DNA total bacteriano dos nichos estudados, ou então, são grupos bacterianos que apresentam funções específicas dentro de cada nicho.



**Figura 4.16.** Perfis de DGGE obtidos após amplificação com *primers* universais para o gene 16S rRNA. **ER:** endofítica de raiz e **RZ:** rizosfera, de três variedades (RB92579, RB867515, RB863129) de cana-de-açúcar. Cada variedade apresenta três repetições.



**Figura 4.17.** Dendrograma de similaridade mostrando o agrupamento das linhagens com baseadas nas sequências obtidas por primers específicos para o gene 16S rDNA, através do coeficiente de Jaccard e pelo método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Average*) com *bootstrap* de 1.000 vezes. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso. **ER**: endofítica de raiz; **RZ**: rizosfera; **V1**: RB92579; **V2**: RB867515 e **V3**: RB863129.

#### 4.4 DISCUSSÃO

A interação bactéria/planta é influenciada por diversos fatores (bióticos e abióticos) (COMPANT et al., 2010; BERG & SMALLA, 2009; ROSENBLUETH & MARTINEZ-ROMERO, 2006; HALLMANN et al., 1997) e o seu conhecimento irá auxiliar a utilização dessas bactérias para o benefício da produção agrícola. A densidade populacional de bactérias endofíticas de raízes e da rizosfera de variedades de cana-de-açúcar, da primeira rebrota, cultivadas em Pernambuco, foi estudada. Foi semelhante aos do trabalho de Mendes et al. (2007), onde a rizosfera apresentou várias ordens de magnitude maior que a densidade das endofíticas de raiz. Não houve diferença entre as variedades, resultado semelhante ao observado por Kuklinsky-Sobral et al. (2004), em duas variedades de soja. Resultado contrário ao observado por Dias et al. (2009), trabalhando com três diferentes variedades de morango.

Tanto a densidade populacional bacteriana quanto seu papel funcional podem ser afetados por vários fatores, como a espécie vegetal, o tipo de solo, o genótipo da planta, o clima, estação do ano ou fase em que se encontra a planta (LEELAHAWONGE & PONGSILP, 2009; SPAEPEN et al., 2007; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004). Foi observado que os nichos de colonização bacteriana exibiram forte influência sobre a média de produção de AIA das bactérias e por cada linhagem, além de que afetou a densidade populacional.

De acordo com os resultados descritos, foi observado que a comunidade bacteriana associada às raízes de cana-de-açúcar é diferenciada em relação à produção de substâncias promotoras de crescimento, como o ácido indol acético, que é um fitormônio pertencente ao grupo das auxinas, e, segundo Patten & Glick (1996), 80% das bactérias existentes no solo possuem a capacidade de produzi-lo. Esta intensa associação das raízes de cana-de-açúcar com a comunidade bacteriana pode estar relacionada com os compostos exsudados pelo sistema radicular, ricos em açúcares, polissacarídeos, compostos fenólicos e alifáticos que atraem estes micro-organismos (COMPANT et al., 2010; BADRI et al., 2009; LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009).

A auxina é responsável pela diferenciação das células, alongamento celular, diferenciação das raízes e promoção do desenvolvimento radicular



(TSAVKELOVA et al.,2006). No entanto, Spaepen et al. (2007) afirmam que a produção e utilização do AIA bacteriano pelo vegetal pode variar da fitoestimulação até a patogenicidade. Contudo, isto depende da espécie bacteriana que está colonizando o hospedeiro, podendo ser patogênica ou não e, também, de acordo com a via metabólica. Geralmente, nas bactérias benéficas a via metabólica utilizada é a via do ácido indol pirúvico e nas patogênicas, a via indol acetamida, onde ambas as vias são dependentes do aminoácido triptofano. Além destas, existe uma via independente deste aminoácido, cuja capacidade de síntese não é tão comum entre os microorganismos (SPAEPEN et al., 2007; TSAVKELOVA et al., 2006; LAMBRECHT et al., 2000; PATTEN & CLICK, 1996). Os resultados do presente trabalho corroboram com o afirmado acima, pois nem todas as linhagens testadas, seja endofíticas ou da rizosfera, mesmo apresentando a capacidade de produzir AIA na presença de triptofano, não demonstraram a mesma habilidade sem a presença do aminoácido.

A frequência observada de bactérias associadas a plantas de cana-de-açúcar capazes de produzir AIA via dependente de triptofano foi alta (100%) quando comparada ao trabalho de Mendes et al. (2007), que também avaliaram bactérias isoladas de cana-de-açúcar, no qual das 59 linhagens endofíticas de raiz e da rizosfera, apenas 28 apresentaram habilidade de produzir AIA. Outros trabalhos avaliando diferentes hospedeiros também encontraram frequências menores, como Taurian et al. (2011), que trabalharam com 110 linhagens solubilizadoras de fosfato isoladas de amendoim, e apenas 9 apresentaram a aptidão para produzir AIA com a adição do triptofano, representando 8%, ou Becerra-Castro et al. (2011) que encontraram 45% das isoladas de citros como positivas para a produção de AIA.

Quanto à variabilidade genética bacteriana avaliada através da utilização da técnica de BOX-PCR, foi observada alta variabilidade entre as linhagens associadas à cana soca, sendo assim, pode-se especular que não há o tendenciamento, ou preferência da interação para determinados genótipos bacterianos e nichos de colonização, pois tanto linhagens endofíticas de raiz, quanto da rizosfera, ficaram agrupadas de forma muito heterogênea.

Esta técnica tem sido muito utilizada para o estudo da variabilidade genética de bactérias associadas ao solo e às plantas, pois apresenta alto poder discriminatório, como por exemplo, Naik et al. (2008) que avaliaram

bactérias do gênero *Pseudomonas*, isoladas de solo rizosférico de arroz e banana, e com a aplicação da técnica de BOX-PCR conseguiu separar as linhagens em três *clusters* distintos, com cerca de 80% de similaridade e 26 perfis de BOX-PCR distintos entre si. Assim como Li et al. (2008), que isolaram cerca de 98 linhagens de bactérias endofíticas de nódulos de soja, estas foram agrupadas em 12 *clusters* apresentando acima de 80% de similaridade, com 21 perfis de BOX. Enquanto que Torres et al. (2008), estudando 20 isolados de nódulos de diferentes variedades de feijão, foram agrupados em 4 *clusters* diferentes, apresentando, no máximo, 40% de similaridade, manifestando também alto grau de variabilidade entre as linhagens avaliadas.

Segundo Van Elsas & Boersma (2011), apenas 1% da comunidade bacteriana que habita o solo pode ser acessada através de técnicas dependentes de cultivo. A técnica de PCR-DGGE, dependendo do grupo de *primers* utilizados, permite acessar a função ou composição de espécies da comunidade microbiana presente no solo diretamente da amostra ambiental, sem a necessidade do cultivo microbiano. No presente trabalho, foram utilizados *primers* ditos universais que apresentam a capacidade de amplificar o gene 16S rRNA de qualquer procaríoto, logo o número de bandas geradas no perfil de cada amostra corresponde a quantidade de gêneros ou espécies predominantes nesta comunidade (HIRSCH et al., 2010; MUYZER & SMALLA, 1998).

A análise da comunidade microbiana pela técnica de DGGE permite conhecer o DNA de gêneros bacterianos que não seriam encontrados se fossem utilizadas técnicas cultiváveis para acessar esta comunidade. Os *primers* utilizados neste ensaio são conhecidos como *primers* universais, que amplificam partes do gene 16S rRNA, região conservada do ribossomo, comum a todas as bactérias.

O PCR-DGGE permitiu a análise da comunidade bacteriana associada endofiticamente às raízes e à rizosfera de plantas de cana soca, cultivadas em Pernambuco. Foi observada grande semelhança na comunidade bacteriana que habita a rizosfera das variedades RB92579, RB867515 e RB863129, o que permite a especulação de que há alguns poucos grupos bacterianos dominantes, impedindo a diferenciação entre as variedades. Resultado semelhante ao encontrado na comunidade endofítica de raiz, pois a variação dos perfis de banda entre as variedades foi ínfima, o que também confirma a

presença de grupos bacterianos dominantes. Contudo, quando comparados os nichos, percebe-se que houve diferença entre os mesmos, revelando que os grupos que dominam na rizosfera são diferentes dos que dominam no interior das raízes. Resultados semelhantes foram observados por Dini-Andreote et al. (2010), que também trabalhando com a comunidade bacteriana total do solo associado a raízes de cana-de-açúcar, não encontraram diferença entre os perfis de banda gerados pelo PCR-DGGE. Berg & Smalla (2009) afirmam que tanto o tipo de solo quanto a espécie cultivada podem ser os principais fatores que poderiam influenciar nesta comunidade dominante.

Diante do exposto, foi possível obter melhor compreensão do comportamento da comunidade bacteriana produtora de AIA associada a raízes de cana-de-açúcar, sendo possível inferir o quão grande é a diversidade destes micro-organismos, e o grande potencial biotecnológico existente nesta comunidade.

#### 4.5 CONCLUSÕES

- A densidade populacional bacteriana de plantas de cana soca foi maior no solo rizosférico do que endofítica de raiz;
- Plantas de cana soca apresentam alta frequência de bactérias com capacidade de produzir AIA *in vitro*;
- Bactérias associadas a plantas de cana soca apresentam a capacidade de produzir AIA via dependente e independente da utilização do triptofano como precursor;
- Bactérias produtoras de AIA associadas a plantas de cana expressam a produção em diferentes níveis de concentração, variando de 2.57 a 107.55  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ;
- A técnica de BOX-PCR revelou alta variabilidade genética entre as bactérias produtoras de AIA;
- A análise pela técnica de PCR-DGGE revelou a predominância de grupos bacterianos dominantes no solo e no interior das raízes de cana soca, cultivadas em Pernambuco.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F. F. & GUERREIRO, R. T. (2010). Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo natural e autoclavados. **Ciências Agropecuárias** 34(4):837-844.
- ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L.. 2010. **Guia prático: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**.Piracicaba: CALO, 167p.
- BADRI, D. V.; WEIR, T. L.; VAN DER LELIE, D.; VIVANCO, J. M. (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant–microbe interactions.**Current Opinion in Biotechnology** 20:642–650
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. E.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. (2010). Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 34:349-360.
- BARBOSA, M. V. (2010). **Interação entre bactérias produtoras de auxinas e diferentes variedade de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) cultivadas em Pernambuco**. Monografia (Graduação). Curso de Agronomia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 72f.
- BECERRA-CASTRO, C.; KIDD, P. S.; PRIETO-FERNÁNDEZ, A.; WEYENS, N.; ACEA, M.-J.; VANGRONSVELD, J. (2011). Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterization. **Plant Soil** 340:413–433.
- BERG, G. & SMALLA, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology** 68:1–13.
- BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S. (1991). Rapid in situ assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on anitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology** 57: 535-538.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, S.; SESSITSCH, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry** 30: 669-678.

- DIAS, A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPCÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. (2009). Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology Biotechnology** 25:189–195.
- DINI-ANDREOTE, F.; ANDREOTE, F. D.; COSTA, R.; TAKETANI, R. G.; VAN ELSAS, J.D.; ARAÚJO, W. L. (2010). Bacterial soil community in a Brazilian Sugarcane field. **Plant Soil** 336:337–349.
- GARBEVA, P.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN VUURDE, J.W.L.; VAN ELSAS, J.D. (2001). Analysis of Endophytic Bacterial Communities of Potato by Plating and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA Based PCR Fragments. **Microbial Ecology** 41:369-383.
- HALLMAN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOPPER, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**. 43: 895 -914.
- HIRSCH, P. R.; MAUCLINE, T. H.; CLARK, I. M. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. **Soil Biology & Biochemistry** 42: 878-887.
- KUKLINSKY –SOBRAL, J. ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. (2004). Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology** 6(12): 1244-1251.
- LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. **Trends in Microbiology** 8(7): 298-300.
- LI, J. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. (2008). Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology & Biochemistry** 40:238 – 246.
- LUGTENBERG, B. & KAMILOVA, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. **Annuals Review of Microbiology** 63:541–556.
- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAÚJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. (2007). Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia*

- Complex Isolates. **Applied And Environmental Microbiology** 73 (22): 7259–7267.
- MORGAN , J. A. W.; BENDING, G. D.; WHITE, P. J. (2005). Biological costs and Benefits to plant–microbe interactions in the Rhizosphere. **Journal of Experimental Botany** 56(417): 1729–1739.
- MUYZER, G. & SMALLA, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek** 73: 127–141.
- NAIK, P. R.; RAMAN, G.; NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. (2008). Assessment of genetic and functional diversity of phosphatesolubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BMC Microbiology** 8:230.
- PATTEN, C. L. & GLICK, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology** 42: 207-220.
- ROSENBLUETH, M & MARTÍNEZ-ROMERO, E. (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **The American Phytopathological Society** 19(8): 827-837.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Review** 31: 425–448.
- TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; ET AL. (2010) .Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant Soil** 329:421–431.
- TORRES, A. R.; ARAÚJO, W. L.; CURSINO, L.; HUNGRIA, M.; PLOTEGHER, F.; MOSTASSO, F. L.; AZEVEDO, J. L. (2008). Diversity of Endophytic Enterobacteria Associated with Different Host Plants. **The journal of Microbiology** 46(4): 373-379.
- TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. YU.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV A. I.(2006). Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology** 42(2): 117–126.
- VAN ELSAS, J. D.; BOERSMA, F. G. H. (2011). A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology** 47: 77-87.

**5 CAPITULO III**

**FILOGENIA E CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE  
ÁCIDO INDOL ACÉTICO *IN VITRO* POR  
BACTÉRIAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR**



RAMOS, ANDRESA PRISCILA DE SOUZA. Msc. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Agosto de 2011. Capítulo 3 - Filogenia e cinética da produção de ácido indol acético *in vitro* por bactérias associadas à cana-de-açúcar. Orientadora: Profa. Dra. Júlia Kuklinsky Sobral. Conselheiros: Prof. Dr. Fernando José Freire e Prof. Dr. Fernando Dini Andreote.

## RESUMO

As plantas, assim como os solos, são nichos extremamente diversificados e habitados por diferentes micro-organismos, principalmente pelas bactérias. Bactérias benéficas podem promover o crescimento vegetal através da produção de substâncias promotoras de crescimento vegetal, como o ácido indol acético (AIA). Contudo, a produção deste depende da linhagem bacteriana e da fase de crescimento em que esta se encontra, entre outros fatores que influenciam a produção. Portanto, os objetivos deste trabalho foram identificar e analisar filogeneticamente algumas linhagens de bactérias produtoras de AIA associadas a plantas de cana-de-açúcar e avaliar a produção de AIA bacteriana em função tempo de cultivo. Foram avaliadas seis bactérias endofíticas de raiz de plantas de cana-de-açúcar e produtoras de AIA. Todas as linhagens pertenceram ao Filo *Proteobacteria*, sendo três da Classe *Betaproteobacteria* e as outras três da Classe *Gammaproteobacteria*. As bactérias pertencentes à Classe *Betaproteobacteria*, encontram-se na Ordem *Burkholderiales*, família *Burkholderiaceae*, gênero *Burkholderia*. E as pertencentes à Classe *Gammaproteobacteria*, encontraram-se na Ordem *Enterobacteriales*, família *Enterobacteriaceae*, gênero *Enterobacter*. Tanto as linhagens de *Burkholderia* quanto as de *Enterobacter* agruparam-se nas respectivas árvores filogenéticas com membros das respectivas famílias. Em relação à produção de AIA, via dependente de triptofano, em função do tempo de cultivo, a linhagem UAGC70 (*Enterobacter sp.*) entrou na fase estacionária as 24 horas de cultivo, enquanto que a produção de AIA foi máxima às 72 horas de cultivo ( $140\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Já a produção de AIA via independente de triptofano também foi máxima às 72 horas de cultivo, com produção máxima de  $31\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A linhagem UAGC78 (*Burkholderia sp.*) não apresentou produção de AIA via independente de triptofano. No entanto, a produção por meio da utilização do triptofano como precursor foi máxima às 72 horas de cultivo

(140 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Portanto, a produção de AIA *in vitro*, via dependente e independente de triptofano, varia de acordo com o tempo de cultivo das linhagens endofíticas de raiz de cana-de-açúcar avaliadas.

**Palavras-chave:** auxina, *Burkholderia sp.*, endofíticos, *Enterobacter sp.*, *Saccharum spp.*, triptofano

RAMOS, ANDRESA PRISCILA DE SOUZA. Msc. at Universidade Federal Rural de Pernambuco. August 2011. Chapter 3 - Phylogeny and kinetics of indole acetic acid production in vitro by bacteria associated with cane sugar. Advisor: Profa. Dra. Julia Kuklinsky Sobral. Co-Advisers: Prof. Dr. Fernando and Prof. José Freire. Dr. Fernando Dini Andreote.

## ABSTRACT

Plants, as well as soils are extremely diverse and niches inhabited by different micro-organisms, mainly by bacteria. Beneficial bacteria can promote plant growth by producing plant growth-promoting substances like indole acetic acid (IAA). Nevertheless, this production depends on the bacterial strain and growth phase, among other factors that influence the production. Therefore, this study aimed in identify some strains and phylogenetic analysis of bacteria associated with producing IAA plants sugarcane production and evaluate the IAA according bacterial cultivation time. We evaluated six endophytic root sugarcane plants and production of IAA. All strains belong to the phylum *Proteobacteria*, three of them pertaining to *Betaproteobacteria* class and the other three of them pertaining *Gammaproteobacteria* class. Bacteria belonging to the *Betaproteobacteria* class, are in the *Burkholderiales* order, *Burkholderiaceae* family, *Burkholderia* genus. The strains grouped in *Gammaproteobacteria* class were found in the *Enterobacteriales* order, *Enterobacteriaceae* family, *Enterobacter* genus. Both strains of the *Enterobacter* and *Burkholderia* were grouped in the respective phylogenetic trees with members of their families. For the production of IAA, tryptophan dependent pathway, depending on the cultivation time, the UAGC70 strain (*Enterobacter sp.*) stayed in the stationary phase 24 hours of cultivation, while the production of IAA was higher at 72 hours of culture ( $140\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The production of IAA through tryptophan pathway was also independent of the maximum 72 hours of cultivation, with maximum production of  $31\mu\text{g.mL}^{-1}$ . The UAGC78 strain (*Burkholderia sp.*) did not produce IAA through tryptophan-independent. However, the production through the use of tryptophan as a precursor was higher 72 h of cultivation ( $140\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Therefore, the

production of IAA in vitro, dependent and independent pathway of tryptophan, varies with time of cultivation of root endophytic strains of sugar cane evaluated.

**Key words:** auxin, *Burkholderia sp.*, endophytic, *Enterobacter sp.*, *Saccharum spp.*, tryptophan.

## 5.1 INTRODUÇÃO

As plantas, assim como os solos, são nichos extremamente diversificados, que podem promover o desenvolvimento e colonização por micro-organismos, principalmente bactérias, tanto no interior quanto na superfície externa dos tecidos vegetais, principalmente nas regiões que estão sob a influência direta das raízes, que são considerados grandes reservatórios microbianos (TREVORS, 2010; ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Bactérias benéficas associadas às plantas podem promover o crescimento vegetal através da produção de substâncias promotoras de crescimento, como o ácido indol acético (AIA), pertencente ao grupo das auxinas, que é responsável por diversos processos durante o ciclo de vida do vegetal, como diferenciação e alongamento celular, promoção do desenvolvimento do sistema radicular, assim como dos pelos radiculares, que são responsáveis pela absorção de água e nutrientes (TSAVKELOVA et al., 2006). A produção de AIA bacteriana *in vitro* pode ser afetada por diversos fatores, como por exemplo, o tempo de crescimento da cultura bacteriana no meio de cultura, onde a máxima produção de AIA geralmente ocorre na fase estacionária do crescimento bacteriano (LEELAHAWONGE et al., 2009; TIEN et al., 1979).

O estudo das comunidades bacterianas associadas às plantas é importante para entendermos o funcionamento deste complexo sistema, possibilitando conhecer a diversidade de gêneros que influenciam o desenvolvimento vegetal e suas funções dentro de cada nicho (VAN ELSAS & BOERSMA, 2011). Há grande diversidade de gêneros bacterianos que já foram identificados em associação com plantas de cana-de-açúcar. Magnani (2010) encontrou gêneros como *Citrobacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiela*, *Pantoea*, e *Staphylococcus*, mas predominantemente várias espécies de *Pseudomonas*, vivendo endofiticamente, tanto na folha quanto no colmo da cana-de-açúcar. Já Velázquez et al. (2008) encontraram espécies dos diferentes filos, como os gêneros *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Gluconacetobacter*, *Pantoea*, *Rhizobium* e *Xanthomonas*.

Os objetivos deste trabalho foram: i) identificar e analisar filogeneticamente algumas linhagens de bactérias produtoras de AIA associadas a plantas de cana-de-açúcar; ii) avaliar a produção de AIA bacteriana em função do tempo de cultivo.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 *Linhagens bacterianas*

Foram avaliadas seis linhagens bacterianas, produtoras de AIA (Tabela 5.1). As linhagens estavam estocadas a -20°C e para utilizá-las foi necessário cultivá-las em placas de Petri contendo meio sólido TSA 10% (*Trypcase Soy Agar*) para a obtenção das colônias isoladas, que foram utilizadas para a inoculação em meio líquido.

**Tabela 5.1.** Linhagens bacterianas produtoras de AIA, isoladas de plantas de cana-de-açúcar, cultivadas na Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina (EECAC).

Nicho	Variedade da planta hospedeira	Linhagem
ER*	RB863129	UAGC70
ER	RB863129	UAGC76
ER	RB863129	UAGC78
RIZ*	RB867515	UAGC103
RIZ	RB867515	UAGC114
RIZ	RB863129	UAGC140

\*ER: endofítica de raiz; RIZ:rizoplano.

### 5.2.2 *Identificação e análise filogenética bacteriana*

Para a identificação de isolados bacterianos produtores de AIA, amostras do cultivo bacteriano, em meio sólido, foram enviados ao Laboratório do Dr. Fernando Andreote (ESALQ/USP) para sequenciamento parcial do 16S rRNA com o *primer* 1378R. As seqüências foram analisadas pelo BLASTn contra a base de dados do NCBI (*National Center for*

*Biotechnology Information website* [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>] e as árvores filogenéticas pelo programa MEGA versão 5.0 (KUMAR et al., 2008).

### **5.2.3 Produção de AIA em relação ao tempo de cultivo bacteriano**

As linhagens UAGC78 e a UAGC70 foram selecionadas para a avaliação da produção de AIA *in vitro* em função do tempo de cultivo bacteriano, sendo analisadas por meio da curva de crescimento e curva de produção de AIA. Para a produção do inóculo bacteriano, as linhagens foram inoculadas, a partir de colônias isoladas, em meio líquido TSA 10% e incubadas a 28°C sob agitação constante (125 rpm), na ausência da luz, por 24 horas. Deste inóculo, retirou-se alíquotas de 10uL que foram transferidas para 5 mL do mesmo meio, com e sem o acréscimo de L-triptofano (5mM), incubadas a 28°C sob agitação constante (125 rpm), na ausência da luz, por até 144h.

Para a avaliação do crescimento bacteriano, a densidade ótica (D.O.) foi avaliada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600nm, após 0; 24; 48; 72; e 144 horas, com 3 repetições para cada tempo.

Para a quantificação do ácido indol acético, via dependente e independente de triptofano, as amostras foram submetidas à reação colorimétrica. Dois mililitros da cultura foram centrifugados a 11764g por 5min, destes, retirou-se uma alíquota de 1 mL do sobrenadante e homogeneizou-se com 1 mL do reagente de Salkowski (2% de FeCl<sub>3</sub> 0,5M em 35% de ácido perclórico), incubou-se no escuro a 28°C durante 30 minutos. A reação foi submetida à leitura da absorbância em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 530nm (BRIC et al., 1991). A concentração de AIA foi estimada por meio de uma curva padrão previamente estimada, utilizando valores conhecidos de AIA sintético (Vetec) 0; 50; 100; 150; 200; 250; 300 e 350 µg mL<sup>-1</sup>, em meio de cultura esterilizado não inoculado (BARBOSA, 2010; ARAUJO & GUERREIRO 2010; BALDOTTO et al., 2010), após 0; 24; 48; 72; e 144 horas, com 3 repetições para cada tempo.

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Identificação e análise filogenética bacteriana

As bactérias foram identificadas com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (aproximadamente 650pb). As sequencias foram analisadas pelos Blastn e as árvores filogenéticas foram geradas pelo programa MEGA 5.0. A análise das sequencias revelou que as linhagens pertencem ao Filo *Proteobacteria*. Das seis linhagens analisadas, três pertencem a Classe *Betaproteobacteria* e as outras três pertencem a Classe *Gammaproteobacteria*.

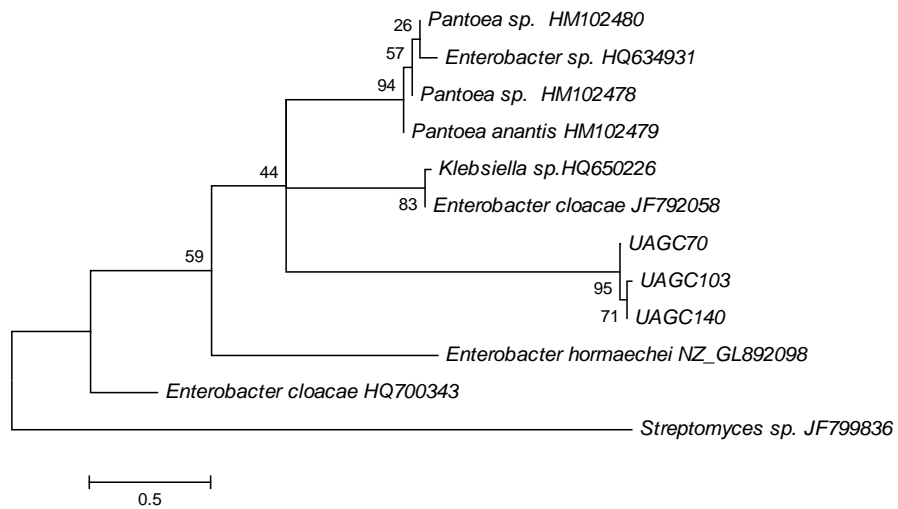
As pertencentes à Classe *Betaproteobacteria*, encontram-se na Ordem *Burkholderiales*, família *Burkholderiaceae*, e a identificação permitiu diferenciar os isolados até o nível de gênero, que foi o gênero *Burkholderia*. Enquanto que as linhagens pertencentes à Classe *Gammaproteobacteria*, encontraram-se na Ordem *Enterobacteriales*, família *Enterobacteriaceae*. Nestas bactérias, a identificação também permitiu caracterizar os isolados até o nível de gênero, onde todas pertenceram ao gênero *Enterobacter*.

A árvore filogenética agrupou as linhagens UAGC70, UAGC103 e UAGC140 (Figura 5.1), sendo observada alta similaridade entre estes. O agrupamento foi feito dentro da família *Enterobacteriaceae*.

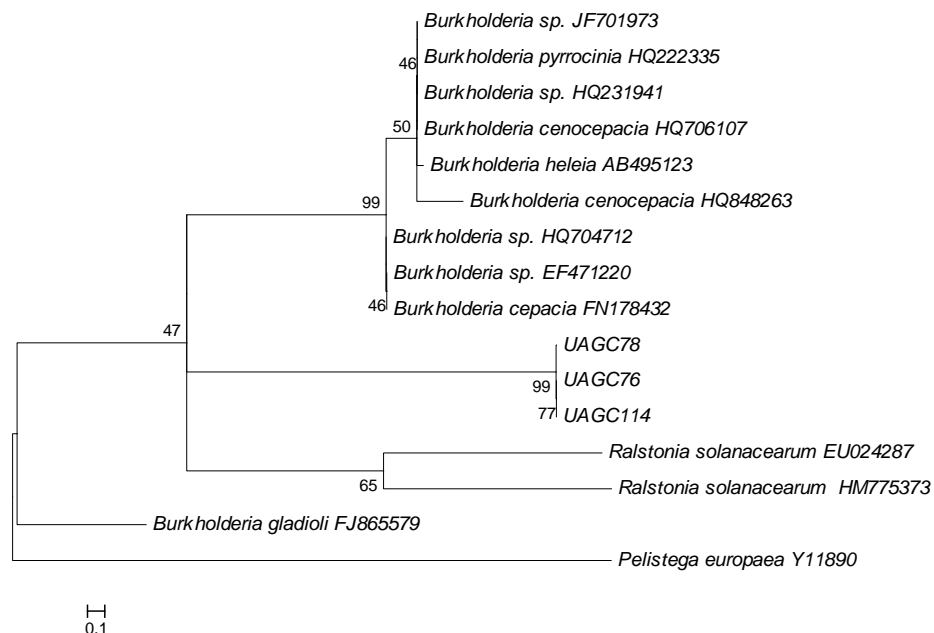
As linhagens UAGC76, UAGC78 e UAGC140 (Figura 5. 2) também foram agrupadas e consideradas altamente similares. Foram agrupadas dentro da família *Burkholderiaceae*, ligando-se a espécies de *Burkholderia* encontradas no banco de dados do Blastn.

Não houve diferenciação nos agrupamentos entre os gêneros que foram encontrados no interior das raízes da cana-de-açúcar ou que habitam o rizoplano das raízes da mesma.





**Figura 5.1.** Subdivisão *Gammaproteobacteria*, família *Enterobacteriaceae*. Árvore filogenética construída pelo programa MEGA 5.0 através das sequências do 16S rDNA das linhagens UAGC70, UAGC103 e UAGC140, endofíticas de raiz e do rizoplano da cana-de-açúcar. Os números nos nós em questão indicam a porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso (*bootstrap* de 1.000 vezes). A sequência de *Streptomyces sp.*JF799836 foi utilizada para enraizar a árvore filogenética, como grupo externo.



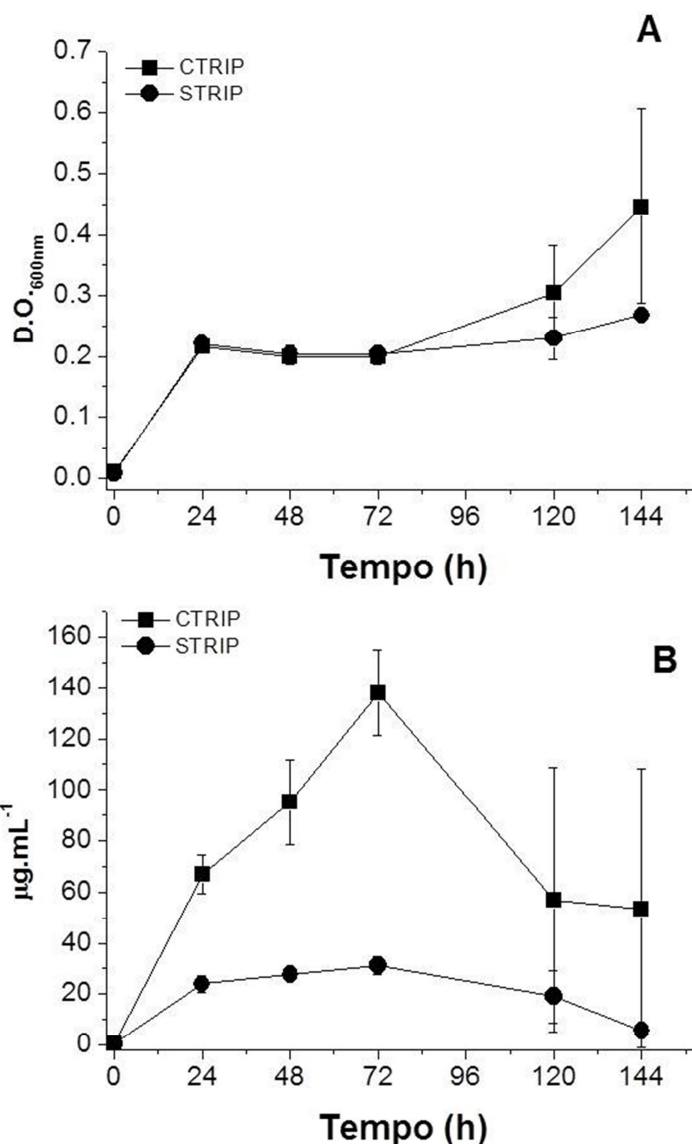
**Figura 5.2.** Subdivisão *Betaproteobacteria*, família *Burkholderiaceae*. Árvore filogenética construída pelo programa MEGA 5.0 através das sequências do 16S rDNA das linhagens UAGC76, UAGC78 e UAGC114, endofíticas de raiz e do rizoplano da cana-de-açúcar. Os números nos nós em questão indicam a

porcentagem de vezes que o grupo permaneceu no consenso (*bootstrap* de 1.000 vezes). A sequência de *Pelistega europaea* Y11890 foi utilizada para enraizar a árvore filogenética, como grupo externo.

### **5.3.2 Produção de AIA em relação ao tempo de cultivo bacteriano**

As bactérias UAGC70 e UAGC78, ambas endofíticas de raiz, identificadas como *Enterobacter sp.* e *Burkholderia sp.*, respectivamente, foram selecionadas para a avaliação da produção de AIA *in vitro* em função do tempo. A linhagem UAGC70 (Figura 5.3A) entrou na fase estacionária após 24 horas de incubação e durante o ensaio, a D.O.<sub>600nm</sub> não ultrapassou o valor de 0,2 até as 72 horas de incubação, em ambos os meios de cultura, com e sem o acréscimo de triptofano, mas após este período, a D.O.<sub>600nm</sub> é menor sem triptofano. Considerando a produção de AIA (Figura 5.3B), foi observado que a produção começou a aumentar no momento em que a linhagem entrou na fase estacionária e atingiu o pico de produção de AIA, via dependente de triptofano, às 72 horas de cultivo, com uma produção de 138 µg.mL<sup>-1</sup>. No entanto, após as 72 horas, a D.O.<sub>600nm</sub> começou a aumentar enquanto que a produção de AIA entrou em declínio.

Considerando a produção de AIA, via independente de triptofano, da bactéria UAGC70, a linhagem apresentou a capacidade de produzir AIA sem adição de L-triptofano, no entanto, a produção máxima apresentada não ultrapassou 31 µg.mL<sup>-1</sup>, medida das 72 horas de incubação (Figura 5.3B). Como nas leituras da produção via dependente de triptofano, após 72 horas de incubação, a produção de AIA também declinou.

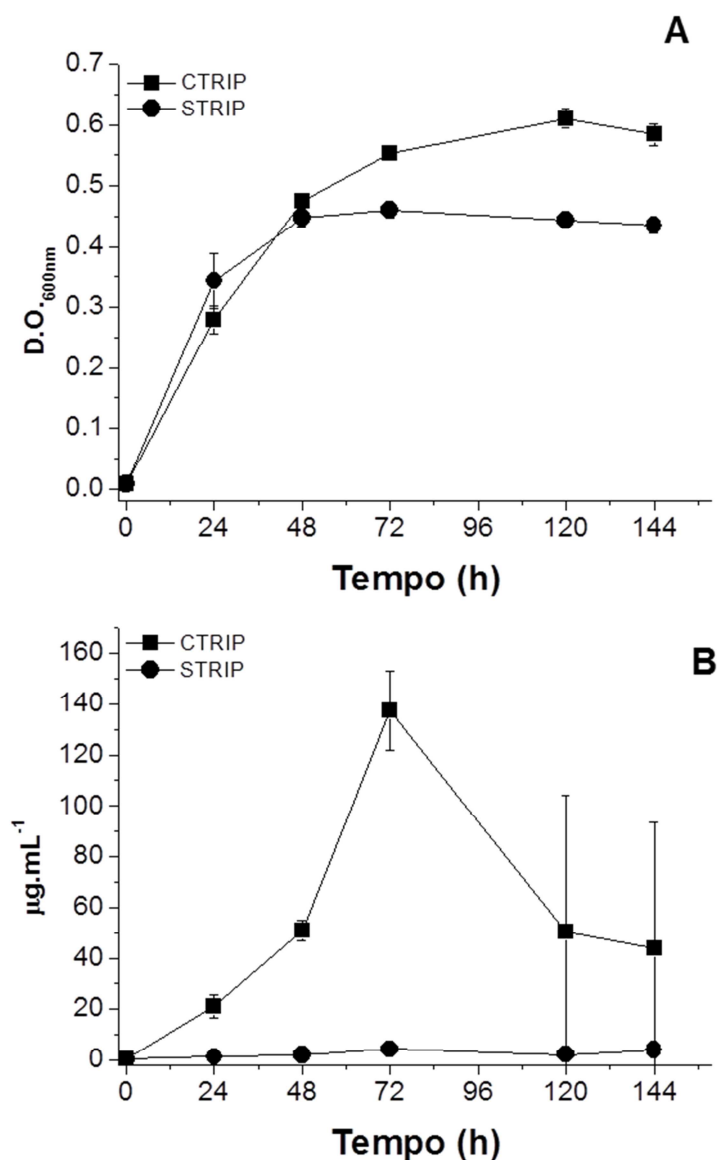


**Figura 5.3.** Curvas de crescimento e de produção de AIA em função do tempo de cultivo da linhagem UAGC70. **A:** densidade ótica (D.O.<sub>600nm</sub>) do crescimento, com e sem acréscimo de L-triptofano; **B:** produção de AIA em µg.mL<sup>-1</sup> com e sem acréscimo de L-triptofano. Médias de três repetições.

A linhagem UAGC78 (Figura 5.4A) apresentou diferença entre o crescimento em meio de cultura com e sem a adição de L-triptofano, ocorrendo principalmente a partir das 48 horas de incubação, onde a D.O.<sub>600nm</sub> de ambos foram 0,44 e 0,48, respectivamente. Às 72 horas de incubação, este quadro mudou, pois quando adicionado o triptofano, a linhagem continuou crescendo, enquanto que sem a adição do aminoácido, a linhagem entrou na fase estacionária do seu crescimento (Figura 5.4A).

Com relação à produção de AIA da UAGC78 (Figura 5.4B), foi observado que a linhagem não apresentou a capacidade de produzir AIA via

independente de triptofano. Contudo, em relação à produção de AIA via dependente de triptofano, foi observado comportamento semelhante ao da linhagem UAGC70, onde a produção máxima foi atingida às 72 horas de cultivo, apresentado aproximadamente  $140\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA. A partir das 72 horas, a produção de AIA declinou.



**Figura 5.4.** Curvas de crescimento e de produção de AIA em função do tempo de cultivo da linhagem UAGC78. **A:** densidade ótica ( $D.O_{600nm}$ ) do crescimento, com e sem acréscimo de L-triptofano; **B:** produção de AIA em  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  com e sem acréscimo de L-triptofano. Médias de três repetições.

## 5.4 DISCUSSÃO

O estudo da diversidade da comunidade bacteriana que interage diretamente com as plantas e das funções realizadas pelas bactérias é importante para a compreensão do funcionamento de todo agroecossistema; e irá permitir a utilização de inoculantes bacterianos na produção agrícola, podendo reduzir a aplicação de produtos químicos. Uma das funções da comunidade bacteriana associadas às raízes de cana-de-açúcar é a produção de substâncias promotoras de crescimento. Dentre estas substâncias, encontra-se o ácido indol acético, que produzido pelas bactérias é semelhante ao produzido pelos vegetais. Este fitormônio, que pertencente ao grupo das auxinas, pode promover o alongamento celular radicular, promover o desenvolvimento dos pelos radiculares, além de aumentar resistência a fatores de estresse, quando em baixos níveis, entre outras funções, que facilitam o desenvolvimento do vegetal, e a busca por água e nutrientes (NIMNOI & PONGSILP, 2009; TSAVKELOVA et al.,2006; TAIZ & ZEIGER, 2004; PATTEN & GLICK, 1996).

A comunidade bacteriana associada à cana-de-açúcar pode ser afetada por diferentes fatores que causam o desequilíbrio deste sistema, entre estes, a produção de AIA. O presente trabalho revelou que a produção de AIA *in vitro*, por bactérias associadas a plantas de cana, é influenciada pela de crescimento bacteriano, nas linhagens estudadas. Neste caso, apesar das duas linhagens terem se comportado de forma semelhante, a produção da UAGC78 (*Burkholderia sp.*) foi mais brusca, apresentando pico de produção entre as 24 e 72 horas de cultivo quando comparada com a linhagem UAGC70 (*Enterobacter sp.*), que apresentou produção mais sutil, no mesmo período de tempo.

Leelahawonge & Pongsilp (2009) trabalharam com bactérias produtoras de AIA, isoladas de variedades de soja, onde, semelhante aos resultados aqui observados, também apresentaram produção máxima de AIA às 72 horas de cultivo, contudo, as produções não ultrapassaram  $45\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto as associadas a cana-de-açúcar produziram aproximadamente  $140\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Considerando as espécies bacterianas e a produção de AIA, Merzaeva et al. (2010) observaram que bactérias, isoladas de centeio, apresentaram dinâmica de crescimento bacteriano variável de acordo com a espécie, assim

como a produção de AIA. Eles avaliaram seis bactérias: *Agrobacterium radiobacter*, *Cellulomonas sp.*, *Curtobacterium plantarum*, *C. plantarum II*, *Flavobacterium sp.* e *Pseudomonas fluorescens*, e a produção de AIA variou de acordo com as espécies e com o tempo de crescimento. Contudo, apenas as duas linhagens de *Curtobacterium plantarum* apresentaram produção de AIA em tempo semelhante ao das *Burkholderia sp.* e da *Enterobacter sp.* avaliadas (UAGC 78 e UAGC70, respectivamente), porém com produção máxima de 80 µg.mL<sup>-1</sup>. Logo, a produção de AIA *in vitro* é influenciada pelo tempo de cultivo bacteriano, levando à especulação que o mesmo possa ocorrer durante a interação bactéria/planta. Então, estas informações poderão auxiliar o processo de produção de inóculo bacteriano, visando sua aplicação no cultivo da cana e com a expectativa de obter melhores resultados.

Weisburg et al. (1991) afirmam que a utilização do gene 16S rRNA, que se localiza na subunidade menor do ribossomo, sendo uma região bastante conservada, permite diferenciar, tanto filogeneticamente quanto na escala evolutiva, os micro-organismos procarióticos que apresentam um ancestral comum. Neste aspecto, o presente trabalho avaliou o sequenciamento parcial do 16S rDNA para identificação e análise filogenética de bactérias endofíticas de raiz de plantas de cana-de-açúcar, revelando que as mesmas pertencem as Classes *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*, família *Burkholderiaceae* e *Enterobacteriaceae*, e aos gêneros *Burkholderia* e *Enterobacter*, respectivamente.

O gênero *Burkholderia* também foi encontrado por Mendes et al. (2007) entre bactérias endofíticas de raiz e da rizosfera de cana-de-açúcar cultivadas no estado de São Paulo, assim como Govindarajan et al. (2007) que identificou bactérias endofíticas de raiz de cana-de-açúcar cultivadas em Tamilnadu, na Índia. Em relação ao gênero *Enterobacter*, Mirza et al (2001) identificaram bactérias associadas a raízes de cana-de-açúcar cultivadas em Faisalabad, Paquistão, mas também foi encontrado nos caules da cultivar avaliada. Magnani et al. (2010) também encontraram o mesmo gênero habitando o interior das raízes de cana-de-açúcar cultivadas no estado do Paraná.

Entretanto, Velázquez et al. (2008), avaliando linhagens bacterianas isoladas do caule de cana-de-açúcar cultivadas em Havana, Cuba, não encontraram bactérias do gênero *Burkholderia* nem do gênero *Enterobacter*, mostrando que a comunidade bacteriana pode variar de acordo com a região,

espécie ou nicho da qual foi isolado, e que também pode variar dentro da planta analisada (COMPANT et al; 2010; ROSENBLUETH & MARTINEZ-ROMERO, 2006).

Diante do exposto, foi possível confirmar que, tanto a espécie bacteriana quanto o tempo de cultivo da mesma influenciam na expressão de suas funções, e que estas também podem variar dentro da mesma espécie, ou seja, entre as linhagens. Estes resultados tornam-se importantes para avaliar o comportamento destas linhagens em futuras inoculações, testando seu potencial *in vivo*, ou seja, como se comportará a interação entre estas linhagens e as plantas inoculadas.

## 5.5 CONCLUSÕES

- Bactérias endofíticas de raiz de cana-de-açúcar, cultivadas em Pernambuco, com capacidade de produzir AIA, foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Enterobacter*.
- A produção de AIA *in vitro*, via dependente e independente de triptofano, varia de acordo com o tempo de cultivo das linhagens UAGC70 (*Enterobacter sp.*) e UAGC78 (*Burkholderia sp.*), endofíticas de raiz de cana-de-açúcar;



## 5.6 REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F. F. & GUERREIRO, R. T. (2010). Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo natural e autoclavados. **Ciências Agropecuárias** 34(4):837-844.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. E.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. (2010). Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 34:349-360.
- BARBOSA, M. V. (2010). **Interação entre bactérias produtoras de auxinas e diferentes variedade de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) cultivadas em Pernambuco**. Monografia (Graduação). Curso de Agronomia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 72f.
- BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S. (1991). Rapid in situ assay for indolacetic acid production by bacteria immobilized on anitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology** 57: 535-538.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, S.; SESSITSCH, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry** 30: 669-678.
- GOVINDARAJAN, M.; KWON, S.; WEON, H.(2007). Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella sp.* GR9. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 23: 997-1006.
- KUMAR, S.; NEI, M; DUDLEY, J.; TAMURA, K. (2008). MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in bioinformatics** 9(4):299 –306.
- LEELAHAWONGE, C.; PONGSILP, N.; NUNTAGIJN. (2009). Factors Influencing Indole-3-Acetic Acid Biosynthesis of Root-Nodule Bacteria Isolated from Various Leguminous Plants. **Thammasat International Journal of Sugarcane Technology** 14(2): 1-12.
- MAGNANI, G. S.; DIDONET, C. M.; CRUZ, L. M.; PICHTH, C.F.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.(2010). Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetic and Molecular Research** 9 (1): 250-258

- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAÚJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. (2007). Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. **Applied And Environmental Microbiology** 73 (22): 7259–7267.
- MERZAEVA, O. V. & SHIROKIKH, G. I. (2010). The Production of Auxins by the Endophytic Bacteria of Winter Rye. **Applied Biochemistry and Microbiology** 46(1): 44–50.
- MIRZA, M. S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K. (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant and Soil** 237: 47–54.
- NIMNOI, P. & PONGSILP, N. (2009). Genetic Diversity and Plant-growth Promoting Ability of the Indole-3-acetic Acid (IAA) Synthetic Bacteria Isolated from Agricultural Soil as Well as Rhizosphere, Rhizoplane and Root Tissue of *Ficus Religiosa* L., *Leucaena Leucocephala* and *Piper sarmentosum* Roxb. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences** 5(1): 29-41.
- PATTEN, C. L. & GLICK, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology** 42: 207-220
- ROSENBLUETH, M & MARTÍNEZ-ROMERO, E. (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **The American Phytopathological Society** 19(8): 827-837.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. (2006). **Fisiologia vegetal**. 3ª Ed. Artmed. Porto Alegre.
- TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D.H. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology** 37:1016-1024.
- TREVORS, J. T. (2010). One gram of soil: a microbial biochemical gene library. **Antonie van Leeuwenhoek** 97:99–106
- TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, S. YU.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV A. I. (2006). Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology** 42(2): 117–126.

- VAN ELSAS, J. D.; BOERSMA, F. G. H. (2011). A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology** 47: 77-87.
- VELÁZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M. J.; RIVAS, R. ZURDO-PIÑERO, J.L.; HEYDRICH, M.; BEDMAR, E.J.(2008). Genetic diversity of endophytic bacteria which could be found in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of Basic Microbiology**, 48: 118–124.
- WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology** 173(2): 697-703.

## 6. CONCLUSÕES FINAIS

- Plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco apresentam alta frequência de bactérias com capacidade de produzir AIA *in vitro*;
- Bactérias associadas a raízes de cana-de-açúcar apresentam a capacidade de produzir AIA via dependente e independente de triptofano;
- Bactérias produtoras de AIA, associadas a raízes de cana, apresentaram níveis de produção entre 1 e 190  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em meio de cultura com o acréscimo de triptofano;
- Bactérias produtoras de AIA, associadas a raízes de cana, apresentaram níveis de produção entre 8 e 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em meio de cultura sem o acréscimo de triptofano;
- Bactérias produtoras de AIA, associadas a raízes de cana, apresentaram alta variabilidade genética;
- O local e tempo de cultivo da planta hospedeira e o nicho de colonização bacteriana influenciaram na distribuição das bactérias produtoras de AIA,
- O local, tempo de cultivo e genótipo da planta hospedeira e o nicho de colonização bacteriana influenciaram nos níveis de produção de AIA por bactérias associadas a cana-de-açúcar;
- A densidade populacional bacteriana de plantas de cana soca foi maior no solo rizosférico do que endofítica de raiz;
- A análise pela técnica de PCR-DGGE revelou a predominância de grupos bacterianos dominantes no solo e no interior das raízes de cana soca, cultivadas em Pernambuco.
- Bactérias endofíticas de raiz de cana-de-açúcar, cultivadas em Pernambuco, com capacidade de produzir AIA, foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Burkholderia* e *Enterobacter*.
- A produção de AIA *in vitro*, via dependente e independente de triptofano, varia de acordo com o tempo de cultivo.