

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA

DISSERTAÇÃO

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Rhizobium* (BR 10268) NA
BROTAÇÃO DE MINI-TOLETES DE CANA-DE-AÇÚCAR cv. RB867515**

NATÁLIA DOS SANTOS FERREIRA

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE *Rhizobium* (BR 10268) NA
BROTAÇÃO DE MINI-TOLETES DE CANA-DE-AÇÚCAR cv. RB867515**

NATÁLIA DOS SANTOS FERREIRA

Sob a Orientação do Pesquisador

Dr. Luc Felicianus Marie Rouws

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Biotecnologia Aplicada.

Seropédica, RJ

Agosto 2018

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

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

F383 FERREIRA, Natália dos Santos Ferreira, 1992-
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE Rhizobium (BR 10268)
NA BROTAÇÃO DE MINI-TOLETES DE CANA-DE-AÇÚCAR cv.
RB867515 / Natália dos Santos Ferreira FERREIRA. -
2018.
52 f.

Orientador: Luc Felicianus Marie Rouws Rouws.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Pós Graduação em Fitossanidade e
Biotecnologia Aplicada, 2018.

1. Hormônios vegetais . 2. Colonização endofítica. 3.
Microscopia confocal. I. Rouws, Luc Felicianus Marie
Rouws, 1976-, orient. II Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro. Pós Graduação em Fitossanidade e
Biotecnologia Aplicada III. Título.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

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

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA

NATÁLIA DOS SANTOS FERREIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Biotecnologia Aplicada.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 09/08/2018



Luc Felicianus Marie Rouws (Dr.) Embrapa Agrobiologia
(Orientador)



Irene da Silva Coelho (Dra.) UFRRJ,



Cleiton de Paula Soares (Dr.) UENF

DEDICO

Aos meus pais .

Maria Anizia Ramos dos Santos e Pedro Leal Ferreira

Que nunca mediram esforços em me dar o melhor de tudo:

Amor incondicional, carinho, apoio, educação e incentivo.

Meus espelhos e maiores inspirações.

Exemplo de vida.

São meu tudo.

Amo vocês!

OFEREÇO

Aos meus meus sobrinhos: **Maria Eduarda, João Pedro e Helena.**

Que hoje são crianças, mais irão crescer e ao ler este trabalho, vão saber que nesta etapa da minha vida, sempre estiveram em meus pensamentos e em meu coração.

Aos meus irmãos.

Cleber Luíz , Aldenora e Charles

Que sempre estiveram ao meu lado.

E por acreditarem que seria capaz de concluir este trabalho.

Por vocês fui capaz de acreditar no meu potencial.

E aprendi que nenhum esforço é em vão.

Sou imensamente feliz pela linda família que tenho!

É preciso saber esperar

É preciso saber esperar...! Principalmente quando as coisas estão mais difíceis, quando parecem não ter mais soluções. Pois muitas vezes a dor pela espera é necessária para o nosso crescimento.

(Autor: Desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS que sempre me deu força, saúde, determinação para superar todas as obstáculos.

Aos meus pais, Pedro Leal e Maria Anizia que venceram todas as dificuldades para me proporcionarem uma formação de qualidade e por me incentivarem sempre.

Aos meus irmãos (a), sobrinhos (a) pelo amor, carinho recebido ao longo deste período.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada e Embrapa Agrobiologia pela formação.

A CAPES pelo suporte financeiro à pesquisa, através da concessão de bolsa.

Ao meu orientador Dr. Luc Felicianus Marie Rouws, pela grandiosa colaboração, atenção, sugestões e ensinamentos transmitidos.

Aos Drs. Cleiton de Paula, Irene Coelho, Jean Simões e Márcia Vidal pela participação como membros titulares e suplentes da banca.

A Janaina Rouws pela ajuda nas análises estatísticas e por todo carinho.

Ao Dr. Carlos Meneses pela ajuda em análise de amostras.

Aos pesquisadores da Embrapa Agrobiologia por compartilharem seus conhecimentos.

Aos técnicos Lúcio e Wilson e aos bolsistas do Laboratório de Gramíneas, em especial, Nathalia Guimarães e Gabriela, pelo auxílio nos experimentos e pela amizade.

As analistas Carol e Patricia e todos os bolsistas do Laboratório de genética e bioquímica que sempre me receberam super bem nos momentos de minhas atividades e pela ajuda.

A Damaris e Eliane pelo apoio em um momento bem difícil no final de minhas atividades.

À equipe de apoio aos experimentos da Embrapa Agrobiologia, em especial, ao Claudinho, Marildo, Ernane, Aurélio, Roberto Carlos “rei”.

Aos meus amigos da Embrapa Amapá: Leandro, Nonato, Emília e Bené, que mesmo longe sempre se preocuparam comigo.

A minha amiga Adriane Lemos “Cacau”, pelo ombro amigo e apoio incondicional.

Aos colegas de alojamento pelos bons momentos vividos, convivência maravilhosa ao longo deste período, em especial: Hágabo Honorato, Murilo Gonçalves, Edevaldo de Castro, Antônio Carlos, Ricardo, Priscila Bahia, Cleudson Gabriel, Lívia, Jessica e Luana.

A todos os funcionários e colegas do Programa de Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, sobretudo ao secretário Roberto Tadeu pela disponibilidade em diversos momentos.

As minhas amigas Lúcia e Lucero por todo carinho, apoio, cuidado e pelo bons momentos compartilhados.

A todos os colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana, que estiveram comigo ao longo de minha jornada em especial, João Luíz, que alegrava minhas manhãs com um grande sorriso e a frase “Oi Natália, a quanto tempo não te vejo”. Essa frase juntamente com todos seus conselhos, incentivos, em momentos tristes fizeram muita diferença.

A Marta Bahia pelas mensagens de conforto, companhia e por todo carinho.

Aos meus irmãos da pós graduação: Ivan de Alencar e Gustavo Feitosa, que me ajudaram em diversos momentos ao longo das minhas atividades e por todo carinho que recebi.

A minha amiga e irmã de coração Kerly Martinez que esteve sempre ao meu lado em dias de alegria, tristeza, cansaço, momentos de efermidade, agradeço imensamente todos estes momentos vividos ao seu lado.

A minha outra grande amiga, irmã de coração Jaqueline Fernandes que me ajudou desde sempre no ambiente de trabalho e no dia-a-dia, me acolhendo em diversos momentos, me proporcionando momentos maravilhosos ao lado de sua família. Agradeço e louvo os momentos vividos com seus filhos, mãe, irmã e sobrinhas.

E a todos que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado durante a construção deste trabalho, digo que sou imensamente grata. Muito Obrigada!

RESUMO

FERREIRA, Natália dos Santos. **Potencial biotecnológico de *Rhizobium* (BR 10268) na brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar cv. RB867515**. 2018. 52 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A aplicação de mudas pré-brotadas a partir de mini-toletes é uma tendência recente nos sistemas de produção de cana-de-açúcar. Este sistema juntamente com a inoculação de microrganismos promotores de crescimento vegetal podem ser consideradas práticas sustentáveis para incrementar a produtividade da cultura da cana-de-açúcar. O presente trabalho buscou caracterizar a estirpe *Rhizobium* (BR 10268) em nível filogenético, avaliar seu potencial em promover o processo de germinação de arroz IR 42 e brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar cv RB867515, verificar a colonização de mini-toletes de cana e ainda investigar possíveis mecanismos químicos responsáveis pelo efeito promotor de crescimento. Análises filogenéticas de genes *housekeeping glnII* e *recA* posicionaram a estirpe em um clado com cinco espécies de *Rhizobium*. Experimentos conduzidos com inoculação da estirpe em arroz, promoveram o crescimento da parte aérea quando inoculado com o sobredandante da estirpe. Outro experimento conduzido sob condições axênicas com mini-toletes inoculados com a estirpe BR 10268 avaliados aos 3, 6, 8, 10, 12, e 14 dias após inoculação (DAI) demonstraram melhor brotação quando comparados ao não inoculado, com aumentos significativos ($p < 0,05$) do comprimento da parte aérea e aumento da massa seca da parte aérea entre os dias coletas. Posteriormente para caracterização de colonização endofítica da estirpe, procedimentos de reisolamento e quantificação de amostras de tecidos frescos, com desinfestação superficial de gema desenvolvida neste trabalho e desinfestação de raízes por metodologia tradicional foram realizados. Os resultados indicaram que $[(1,8 \pm 0,92) * 10^7 \text{ UFC.g}^{-1}$ a 7 DAI e $(4,9 \pm 2,7) * 10^6 \text{ UFC.g}^{-1}$ a 20 DAI] de gema e raízes $[(2,1 \pm 0,75) * 10^5 \text{ UFC.g}^{-1}$ a 7 DAI e $(5,6 \pm 4,59) * 10^4 \text{ UFC.g}^{-1}$ a 20 DAI] puderam ser recuperados. Análises por BOX-PCR confirmaram a identidade das bactérias recuperadas e a estirpe não foi detectada no controle não inoculado. A colonização endofítica em 3 e 8 DAI também foi confirmada por microscopia confocal de varredura a laser usando um derivado da BR 10268 expressando mCherry. Após identificação de aceleração da brotação e elevada colonização da estirpe no tecido interno de cana, análises utilizando uma solução de sobrenadante da estirpe em meio definido, foi realizada através de cromatografia de gás espectrometria de massa em monitoramento seletivo iônico (GC-MS/SIM). Os resultados indicaram a presença de fitohormônios produzidos pela estirpe: ácido indol acético (30,23) citocinina (3,39) e ácidos giberélicos ativos e inativos GA₃, GA₄, GA₇, GA₉, GA₁₂ e GA₂₀ (22,52; 33,45; 20,59; 5,71; 10,11; 3,22 e 13,66 ng.mL⁻¹, respectivamente. Portanto, o presente estudo confirma que *Rhizobium* sp. (BR 10268) é um endófito, efetivo da cana-de-açúcar, que estimula a brotação da parte aérea de mini-toletes, através da produção de fitohormônios vegetais que podem ser utilizados para fins biotecnológicos.

Palavras-Chaves: hormônios vegetais ; colonização endofítica; microscopia confocal.

ABSTRACT

FERREIRA, Natália dos Santos. **Biotechnological potential of *Rhizobium* (BR 10268) in the germination of mini-setts of sugarcane cv. RB867515**. 2018. 52 p. Dissertation (Master in Applied Biotechnology and Plant Health). Institute of Biological Sciences and Health, Department of Entomology and Plant Health, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2018.

The application of pre-germinated seedlings from mini-toletes is a recent trend in sugarcane production systems. This system together with the inoculation of plant growth promoting microorganisms can be considered sustainable practices to increase the productivity of the sugar cane crop. The present work aimed to characterize the *Rhizobium* strain (BR 10268) at a phylogenetic level, to evaluate its potential in promoting the process of germination of IR 42 rice and sprouting of sugarcane mini-setts cv.RB867515, to verify the colonization of mini- and investigate possible chemical mechanisms responsible for the growth promoter effect. Phylogenetic analyzes have positioned the strain in a clade with five microsymbionte species of legumes based on tree topologies of *housekeeping* genes *glnII* and *recA* indicating that the strain is not a new species of *Rhizobium*. Experiments conducted with inoculation of the rice strain promoted shoot growth when inoculated with the overdose of the strain. Another experiment conducted under axenic conditions with mini-toletes inoculated with the BR 10268 strain evaluated at 3, 6, 8, 10, 12, and 14 days after inoculation (DAI) demonstrated better sprouting when compared to uninoculated, with significant increases ($p < 0.05$) of the aerial part length and increase of the dry mass of the aerial part between the collection days. Subsequently, for characterization of endogenous colonization of strain, repositioning and quantification of fresh tissue samples, with yolk disinfection in this work and root disinfection by the work. The results indicate that $[(1.8 \pm 0.92) * 10^7 \text{ CFU.g}^{-1}$ at 7 DAI and $(4.9 \pm 2.7) * 10^6 \text{ CFU.g}^{-1}$ at 20 DAI] of yolk and roots $[(2.1 \pm 0.75) * 10^5 \text{ CFU.g}^{-1}$ to 7 DAI and $(5.6 \pm 4.59) * 10^4 \text{ CFU.g}^{-1}$ to 20 DAI] could be recovered. Analyzes by BOX-PCR confirm the identity of the recovered cells and the undetected strain in the uninoculated control. Endophytic colonization at 3 and 8 DAI was also confirmed by laser scanning confocal microscopy using a derivative of BR 10268 expressing mCherry. After identification of shoot acceleration and high colonization of the strain in cane internal tissue, analyzes using a supernatant solution of the strain in defined medium were performed by gas chromatography mass spectrometry in ionic selective monitoring (GC-MS / SIM). The results indicate the presence of phytohormones in the range: indoleacetic acid (30,23) cytokinin (3.39) and active and inactive gibberellic acids GA₃, GA₄, GA₇, GA₉, GA₁₂ and GA₂₀ (22,52; 33, 45; 20,59; 5,71; 10,11; 3,22 and 13,66, ng.mL⁻¹, the obligatory motif of the present study confirmed by *Rhizobium* (BR 10268) is an effective endophyte of sugarcane, which stimulates the sprouting of the aerial part of mini-toletes, through the production of vegetable phytohormones that can be used for biotechnological purposes.

Key words: plant hormones; endophytic colonization; confocal microscopy.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celcius
μ(g, L, M)	Micro (grama, litro, metro)
AIA	Ácido-3- indol acético (auxina)
BLAST	<i>Basic Local Aligment Search Tool</i>
cm	Centímetro
CK	Citocinina
D.O _(xxx)	Densidade ótica (comprimento de onda em nanômetro)
DBO	Demanda biológica de oxigênio
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxiribonucléico)
DNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Etilenodiaminotetracetato de sódio
g	Gramma
GA, GA _(x)	Giberelinas
h	Hora (s)
ha	Hectare
kb	Quilobase
kV	Quilovolts
kg	Kilograma
L	Litro
m	Metro
M	Molar
Mg	Megagramas
min	Minuto (s)
n (g, m)	Nano (grama, metro)
Pb	Pares de base
PCR	Polymerase Hain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
RDM	<i>Rhizobium Definied Medium</i> (Meio definido para <i>Rhizobium</i>)
RPM	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
s	Segundo
T	Tonelada
TAE	Tampão Tris-Acetato de EDTA
TAQ	DNA polimerase de <i>thermus aquaticus</i>
TY	<i>Yeast-Tripton</i> (Levedura Triptona)
U	Unidade da enzima
V	Volt
W	Watts
YMA	<i>Yeast Mannitol Agar</i>
Ω	Ohm

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Relação dos genes, iniciadores, sequências e ciclos utilizados para caracterização genética da estirpe BR 10268. 08
- Tabela 2:** Relação dos fitohormônios identificados através de análises de espectrometria de massa com cromatografia gasosa em monitoramento seletivo de íons (GC-MS / SIM) após cultivo da estirpe BR 10268 em meio seletivo (RDM) durante 24h de crescimento 19
- Tabela 3:** Quantificação de células recuperadas da estirpe BR 10268, obtida através de maceramento e trituração de tecidos internos desinfestados superficial de segmentos de mini-toletes de cana-de-açúcar, 7 e 20 DAI, sob condições controladas 23

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Sequência de etapas do sistema MPB: corte do mini-tolete (A), tratamento químico (B), caixa de brotação (C), aclimatação 1 (D), aclimatação 2 (E), MPB finalizado (F) (Adaptado de XAVIER et al., 2014). 04
- Figura 2:** Dendograma da análise filogenética molecular da estirpe BR 10268 ao gene *housekeeping glnII*. A árvore foi construída no Programa MEGA versão 6.0, o método utilizado foi da máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei. Considerando um bootstrap de 1000 repetições. 17
- Figura 3:** Dendograma da análise filogenética molecular da estirpe BR 10268 ao gene *housekeeping recA*. A árvore foi construída no Programa MEGA versão 6.0, o método utilizado foi da máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei. Considerando um bootstrap de 1000 repetições 18
- Figura 4:** Efeito da inoculação da estirpe BR 10268 em sementes de arroz sob diferentes tratamentos (da esquerda para direita): T₀ (controle), T₁(ácido giberélico sintético), T₂ (sobrenadante da BR 10268) e T₃ (cultura da BR 10268). a) contagem de germinação (CG); b) índice de velocidade de emergência (IVG); c) comprimento de parte aérea (CPA), d) massa seca de parte aérea (MSPA), e) massa fresca e seca de raiz (MFR e MSR). médias seguidas de letras iguais, dentro de cada data, não diferem entre si pelo teste t (LSD) a 5% de probabilidade 20
- Figura 5:** Efeito da inoculação da estirpe BR 10268 sobre a brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar cv. RB867515, provenientes de usina de produção de cana Zilor em Quatá (SP), primeiro experimento. **a)** comprimento de parte aérea (CPA), **b)** massa seca da parte aérea seca (MSPA), **c)** comprimento da raiz (CR) e **d)** massa seca da raiz (MSR) avaliados sobre diferentes pontos de coleta (3, 6, 8, 10, 12 e 14 DAI). Médias seguidas de letras iguais, dentro de cada data, não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, a 5% de probabilidade 21
- Figura 6:** Efeito da inoculação de BR 10268 sobre a brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar cv.RB867515 provenientes do campo experimental da Embrapa Agrobiologia, segundo experimento, **a)** comprimento de parte aérea (CPA) e **b)** massa de parte aérea seca (MPAS), avaliada sobre diferentes pontos de coleta (3, 6, 8, 10 e 14 DAI). Médias seguidas de letras iguais, dentro de cada data, não diferem entre si pelo teste t (LSD) a 5% de probabilidade 22
- Figura 7:** Dendrograma obtido a partir da técnica BOX-PCR *fingerprinting* das amostras representativas de estirpes recuperadas (tratamento inoculado) e estirpes com características que apresentaram um morfotipo semelhante a estirpe (tratamento não inoculado), pela contagem de células depois de diluições em série de gema e raiz de mini-toletes de cana-de-açúcar aos (7 e 20 DAI), (discriminação realizada a nível dos tratamentos utilizados). Os agrupamentos foram obtidos através do programa bionumerics 7.6. O algoritmo foi calculado com base no Dice's, coeficiente de similaridade usando o método grupo par não ponderada com o agrupamento de média aritmética pelo (UPGMA). 23

Figura 8: Comparação da morfologia de colônias obtidas após diluições em série. **a)** colônias contendo o plasmídeo pLMB 426 após transformação pela técnica de eletroporação com visualização de coloração vermelha cultivadas em meio TY contendo o antibiótico gentamicina (setas em vermelho indicam contaminantes, células não transformadas); **b)** células selvagem da estirpe BR 10268 cultivadas em meio TY sem antibiótico. 24

Figura 9: Análises de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) da estirpe BR 10268 transformada com o plasmídeo pLMB 426 (mCherry). Imagens mostram a colonização da estirpe nos tecidos internos de gema de cana-de-açúcar em corte longitudinal **a)** imagens ilustrativas dos tecidos internos de gema de cana-de-açúcar: **1** e **4:** protoxilema, **2:** vaso do metaxilema, **3:** vaso do protoxilema(Adaptado de CLEMENTS, 1980); de tecidos internos de gema inoculada com estirpe selvagem: **b)** segmento de gema inoculado com estirpe selvagem; **c** e **d)** 3 DAI (espaço intercelular e vaso do protoxilema, respectivamente); **e, f)** 8 DAI (vaso do protoxilema e espaço intercelular, respectivamente) 25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO GERAL	2
2.1 Objetivo Específico	2
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1 Aspectos gerais da cultura da cana-de-açúcar	3
3.2 Sistema de mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar	3
3.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal	5
3.4 Rizóbios endofíticos associados a plantas não-leguminosas.....	5
4 MATERIAL E MÉTODOS	7
4.1 Localização experimental.....	7
4.2 Estirpe bacteriana, meios e condições de cultivo	7
4.3 Caracterizações genéticas	7
4.3.1 Extração de DNA e análises de PCR e BOX-PCR.....	7
4.3.2 Eletroforese em gel.....	7
4.3.3 Sequenciamento e análises de sequências de genes	9
4.4 Ensaio de germinação com arroz e detecção de fitohormônios.....	9
4.4.1 Cultivo bacteriano e preparo de sobrenadante.....	9
4.4.2 Inoculação de sementes de arroz	9
4.4.3 Variáveis analisadas ensaio com arroz	10
4.5 Análise de cromatografia gasosas acoplada a espectrometria de massa	10
4.6 Ensaios de brotação com mini-toletes de cana-de-açúcar.	11
4.6.1 Preparo e inoculação de mini-toletes.....	11
4.6.2 Delineamento experimental dos ensaios com mini-toletes.....	11
4.6.3 Variáveis avaliadas do ensaio com mini-toletes.....	11
4.7 Reisolamento da estirpe BR 10268 de tecidos de mini-toletes brotados.....	12
4.7.1 Condução experimental	12
4.7. 2 Desinfestação superficial dos mini-toletes após inoculação.....	12
4.7.3 Quantificação de colônias recuperadas.....	12
4.7.3.1 “ <i>Fingerprint</i> ” BOX-PCR de colônias inoculadas	13
4.8 Obtenção da estirpe BR 10268 com mcherry	14
4.8. 1 Preparação de células eletrocompetentes.	14
4.8.2 Eletroporação da Estirpe.....	14

4.8.3 Inoculação da estirpe BR 10268 (pLMB 426).....	15
4.8.4 Microscopia de varredura confocal a laser (CLSM)	15
5 RESULTADOS	16
5.1 Caracterização Genética	16
5.2 Detecção e quantificação de fitohormônios bacteriano	19
5.3 Promoção de crescimento vegetal de sementes de arroz inoculação.....	20
5.4 Brotação de mini-toletes inoculados com a estirpe BR 10268	21
5.5 Confirmação da identidade e quantificação da estirpe BR 10268.....	22
5.6 Análise microscópica da interação bactéria-planta	24
5.6.1 Transformação da estirpe BR 10268	24
6 DISCUSSÃO	26
6.1 Análise filogenética da estirpe BR 10268	26
6.2 Promoção de crescimento vegetal de mini-toletes e sementes de arroz após inoculação da estirpe BR 10268	26
6.3 Nicho de colonização endofítica.....	28
7 CONCLUSÕES.....	30
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
9 ANEXOS.....	37

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o maior produtor de cana-de-açúcar a nível mundial, em sua última safra 2016/2017 chegou a alcançar 657,18 milhões de toneladas de produção. Esta cultura apresenta uma posição de destaque no agronegócio brasileiro, servindo como fonte de açúcar e etanol para os mercados interno e externo (CONAB, 2017).

O sistema de plantio de cana mecanizada mais adotado no país utiliza como material de plantio colmos de cana picotados. Esses colmos são enterrados nos sulcos de plantio e contêm as gemas que após a brotação dão origem às plantas. Pelo fato do processo de brotação ser de eficiência variável, para garantir um estande homogêneo e com um mínimo de falhas, grandes quantidades, frequentemente superiores a 20 t.ha⁻¹, de colmos são comumente usados nos sistemas mecanizados de plantio (LANDELL et al., 2012). No sentido de melhorar esse panorama, uma tendência é o uso de mudas pré-brotadas (MPB), desenvolvida pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC).

Esse método visa a multiplicação de mudas sadias com alto padrão de fitossanidade e robustez de plantas para formação de viveiros de canaviais, a partir de gemas obtidas de colmos de cana, os chamados minirrebolos, mini-gemas ou ainda mini-toletes. Essa técnica busca a produção de mudas de forma mais eficiente com potencial de diminuição de difusão de pragas e doenças, e com a possibilidade da introdução de novas variedades no campo. Esse método permite uma maior padronização do material de plantio e diminui substancialmente para o plantio de um hectare de cana, o consumo de mudas desce de 18 a 20 t.ha⁻¹ do plantio mecanizado para 2 t.ha⁻¹ adotando o sistema MPB (LANDELL et al., 2012).

A fase da produção das mudas pré-brotadas a partir de mini-toletes representa ainda uma oportunidade para melhorar o desempenho desse material pela introdução de agentes promotores de crescimento vegetal, como pelo uso de bactérias promotoras de crescimento (BPC). A inoculação de culturas com bactérias benéficas que possuem capacidade de induzir o crescimento da planta através da fixação biológica de nitrogênio e produção fitohormônios é uma prática adotada em leguminosas com resultados comprovados e na cultura da cana-de-açúcar estudos indicam benefícios como incrementos na massa seca e produtividades dos colmos dessa cultura (OLIVEIRA et al., 2003; SCHULTZ et al., 2012). Esta prática para a cultura da cana-de-açúcar, têm sido estudado pela Embrapa Agrobiologia, que com base em avanços nas pesquisas, em 2008, recomendou para esta cultura um inoculante, composto por uma mistura de cinco estirpes de bactérias: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe BR11281^T), *Herbaspirillum seropedicae* (BR11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504), *Nitrospirillum amazonense* (BR11145) e *Paraburkholderia tropica* (BR11366^T).

Essas bactérias são diazotróficas endofíticas que possuem capacidade de promover efeitos positivos, que indicam melhoria do crescimento da cana de forma significativa levando ao aumento de produtividade (REIS et al., 2009). A combinação dessas duas tecnologias, sistema de MPB e inoculação de bactérias que possuam potencial de crescimento de planta, podem ser uma tecnologia de baixo custo e de favorecimento vegetal que ajudariam a um aumento de produtividade e prolongamento do canavial. As pesquisas de desenvolvimento de inoculantes, no Brasil, ao longo dos anos, foram realizadas de forma mais dirigida para atender às leguminosas. Recentemente, estudos têm sido elaborados visando também os inoculantes para as gramíneas. Embora exista a recomendação de um inoculante para a cultura da cana-de-açúcar, envolvendo as cinco estirpes, poucas são as informações que possibilitem cultivos nas indústrias das estirpes recomendadas. Estudos recentes relataram o isolamento de rizóbios dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* de raízes de cana-de-açúcar (ROUWS et al., 2013). Ensaios de promoção de crescimentos com algumas dessas bactérias indicaram o potencial de um isolado de *Rhizobium* sp. (P5-2 = BR 10268) de acelerar a brotação de mini-gemas de cana-de-açúcar (MATOS, 2017).

2 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho buscou caracterizar a estirpe *Rhizobium* sp. (BR 10268) em nível filogenético, avaliar seu potencial em promover o processo de germinação de arroz IR 42 e brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar cv.RB867515, verificar a colonização da estirpe em cana e ainda investigar possíveis mecanismos químicos responsáveis pelo efeito promotor de crescimento vegetal.

2.1 Objetivos Específicos

- a) Inferir o posicionamento filogenético da estirpe.
- b) Avaliar o efeito da inoculação na germinação de arroz e brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar em experimentos controlados.
- c) Quantificar e confirmar a densidade da estirpe em plantas de cana-de-açúcar inoculadas através do reisolamento da bactéria.
- d) Confirmar o estabelecimento da estirpe nos tecidos de mini-toletes de cana-de-açúcar através do uso da estirpe marcada e visualização por microscopia de varredura confocal a laser (CLSM).
- e) Verificar a produção de fitohormônios ou outras substâncias produzidas pela estirpe.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais da cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea tropical semiperene, pertencente ao Reino Plantae; Divisão Magnoliophyta; Classe Liliopsida; Ordem Cyperales; Família Poaceae, gênero *Saccharum*, suas principais espécies são: *Saccharum officinarum* L, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense* e *S. barberi*. Possui a forma da inflorescência tassel, que é um panicle de ramo aberto, o crescimento do caule é em colmos e as folhas apresentam lâminas de sílica em suas bordas e bainha aberta (SALLA, 2008). Seu metabolismo é do tipo C4, adaptado a altas temperaturas e intensidade luminosa devido sua eficiência na conversão de energia radiante em energia química.

O clima ideal para produção de cana-de-açúcar é constituído de duas estações: quente e úmida. A estação quente proporciona a brotação, perfilhamento e desenvolvimento da planta e a estação fria e seca contribui para a maturação e acúmulo de sacarose (SILVA, 2009). No país sua expansão ocorre em diversas regiões tropicais e subtropicais, essa promoção de diferentes ambientes para o cultivo da mesma, proporciona a produção de cana de açúcar e etanol o ano inteiro. No Nordeste, a safra acontece nos meses de outubro a março e no Sudeste, Sul e Centro-oeste nos meses de abril a agosto, surgindo épocas de plantio que variam de uma região para outra (SALLAS, 2008). Essas épocas são conhecidas como: cana de ano-e-meio (18 meses) período de plantio de fevereiro a abril, plantio de cana de ano (12 meses) que equivale a setembro e novembro, cana de inverno (12 meses) período de plantio de maio a agosto, plantio de dois verões (24 meses) período de plantio de dezembro a janeiro (DE MARIA et al., 2016).

Seu cultivo ocorre em mais de 120 países, hoje o maior produtor desta cultura é o Brasil, seguido pela Índia, China, Tailândia e Paquistão (FAO, 2017). O Brasil possui liderança na produção e exportação de açúcar e ocupa segundo lugar na produção e exportação de etanol, chegando a produzir na safra de 2016/2017 um total de 38.691.100 de toneladas de açúcar e 27.807.523,0 litros de etanol proveniente de cana-de-açúcar.

A produção brasileira para safra de 2017/2018 está estimada em produtividade de 72.734 kg.ha⁻¹, sendo observado um aumento de 0,2% em relação à safra passada que alcançou uma produtividade de 72,623 kg.ha⁻¹. Este pequeno aumento é considerado relevante, pois demonstra a expectativa de recuperação das lavouras nas regiões Norte/Nordeste de 8,1% (CONAB, 2017).

3.2 Sistema de mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar

O plantio convencional de cana-de-açúcar utiliza uma metodologia robusta para introdução de material em campo, adotando o uso da mecanização onde ocorre a sulcação, distribuição, deposição e cobertura de unidades propagativas no solo (JADOSKI et al., 2012). As mudas utilizadas são partes do colmo que podem variar de 1 a 3 gemas chamadas de “colmo-semente”. A utilização desta metodologia exige altos consumos de matéria-prima e dependendo da época de plantio, até 10 a 20 toneladas de material podem ser requeridos por hectare. Esse material nem sempre possui um padrão fitossanitário adequado e podem apresentar desuniformidades, oriundas de fatores fisiológicos, morfológicos, climáticos e de manejo (XAVIER et al., 2014).

Neste contexto, em 2012 o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), desenvolveu uma tecnologia denominada de sistemas de mudas pré-brotadas (MPB). Este sistema representa um novo conceito no método de multiplicação de cana-de-açúcar, que visa reduzir o volume de material usado convencionalmente no plantio, através da produção de mudas em

tubetes nas condições de viveiro que podem contribuir para a obtenção de plantas saudias, vigoras, apresentando alto padrão fitossanitário que posteriormente podem ser utilizados em condições de campo (LANDELL et al., 2012). Com esse sistema, a partir de uma tonelada poderiam ser plantados aéreas com até 300 hectares por pelo menos 17 meses, sendo que o convencional não alcançaria 30 hectares (COPLANA PRODUTOR, 2013).

Para formação deste sistema MPB as gemas devem ser oriundas de viveiros completamente livres de doenças, sem mistura varietal, tendo idade de seis a dez meses, acompanhados de tratamento térmico e procedimentos de “*roguing*” contendo amostras para diagnósticos de doenças. A produção deste sistema consiste em: **corte do mini-toletes**: ocorre a fragmentação da cana em nó, onde ficam localizados as gemas, através do uso de sistema de guilhotina com lâmina dupla desinfestada contendo espaçamento de 3 cm; **tratamento dos mini-toletes**: ocorre a seleção visual das canas cortadas com gemas saudáveis e tratamento fúngico e térmico (52°C por 30 min); **Brotação**: os mini-toletes são plantados em “caixas de brotação” contendo substrato adequado para produção de mudas (**repicagem**: após o período de pré-brotação as gemas são colocadas em tubetes individualizados); **aclimatação fase 1**: as mudas são colocadas em estufa ou casa de vegetação por 21 dias, sendo que após sete dias há o aumento de incidência de luz para primeira adaptação a temperatura ambiente; **aclimatação fase 2**: esta é considerada a etapa final, onde as mudas são colocadas em bancadas e exposta completamente ao sol, para adaptação às condições de plantio no campo; **mudas pré-brotadas finalizadas**: ao final de 60 dias , período do ciclo completo as mudas são retiradas dos tubetes e estão prontas para serem plantadas (LANDELL et al., 2012).

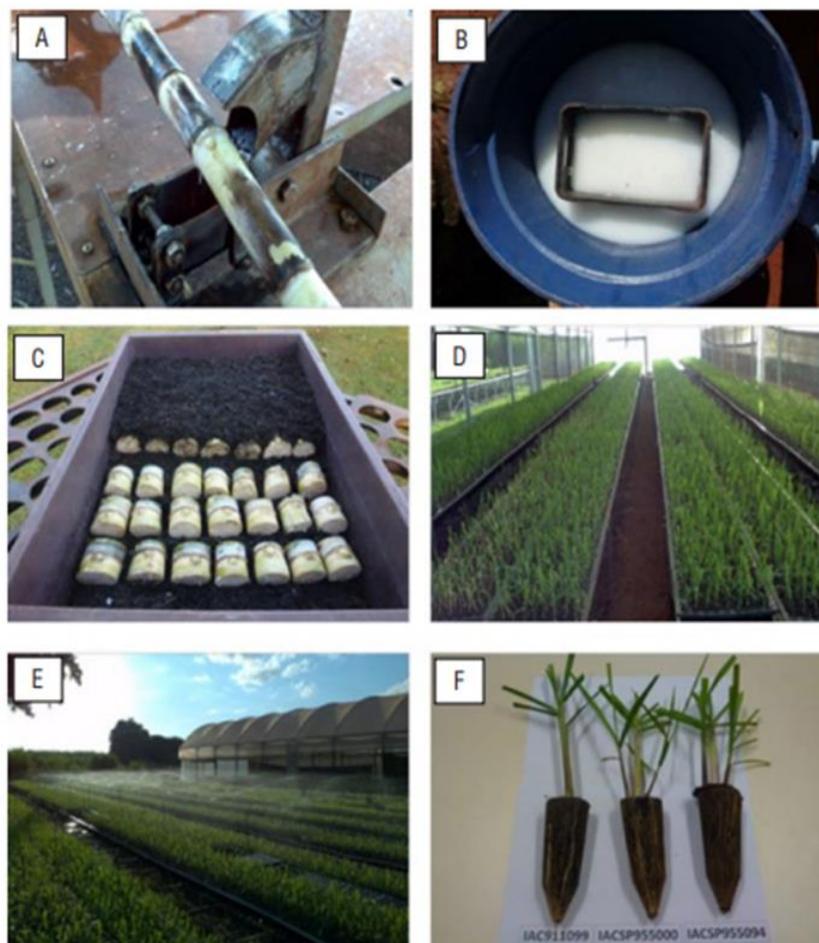


Figura 1. Sequência de etapas do Sistema MPB: corte do mini-tolete (A), tratamento químico (B), caixa de brotação (C), aclimatação 1 (D), aclimatação 2 (E), MPB finalizado (F) (Adaptado de XAVIER et al., 2014).

3.3 Bactérias promotoras de crescimento vegetal

Uma forma muito conhecida de promoção de crescimento vegetal ocorre entre plantas da família de leguminosas e rizóbios, que se envolvem em uma relação endossimbiótica em que a planta forma nódulos nas raízes para hospedar as bactérias que convertem nitrogênio molecular (N₂) em amônio que pode ser usada pela planta. Porém diversos estudos estão voltados para a compreensão sobre esse processo em plantas da família Poaceae (gramíneas), pois as mesmas assim como as leguminosas apresentam potencial para estabelecer interações com bactérias presentes no microbioma das plantas. Essas bactérias pertencem a diversos gêneros, como por exemplo: *Azoarcus*, *Burkholderia*, *Gluconobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Rahnella* (KANDEL et al., 2017).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal (*Plant Growth Promoting Bacteria* ou PGPB em Inglês), são definidas como um grupo heterogêneo de bactérias que podem se associar a rizosfera, rizoplane e tecidos internos de plantas através de mecanismos que podem influenciar e/ou facilitar o crescimento da planta (ESTRADA et al., 2013; FAN et al., 2011). No caso da colonização interna, esses microrganismos são conhecidos como endofíticos. Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal podem ser conceituados como mecanismos diretos e indiretos (GAMALERO & GLICK, 2011, GLICK, 2012).

Os mecanismos diretos são processos que ocorrem após interação entre bactéria e as plantas, onde a planta é capaz de suprir alguns de seus nutrientes, incluindo nitrogênio, fósforo e ferro ou quando as bactérias estimulam o crescimento da planta através do fornecimento ou regulação de hormônios vegetais que incluem a auxina, citocinina, giberelina e etileno. Os mecanismos indiretos são efeitos da promoção de crescimento vegetal decorrentes da atividade de grupos microrganismos que limitam ou previnem os danos às plantas que poderiam ser causados por vários agentes patogênicos. Entre esses efeitos destacam-se a produção de antibióticos, síntese de compostos voláteis, indução de resistência sistêmica para patogênicos de plantas (o estresse biótico) e proteção contra condições ambientais prejudiciais (estresse abiótico) (ARRUDA et al., 2013; LIU et al., 2013; VARGAS et al., 2012, GLICK, 2012, KANDEL et al., 2017).

As bactérias que colonizam a planta externamente e as endofíticas, utilizam mecanismos semelhantes para induzir o crescimento vegetal através de mecanismos acima citados. Uma diferença do ponto de vista ecológico, entre os dois tipos é que as bactérias externas estão mais suscetíveis a mudanças abióticas nas condições do solo diferentemente dos endofíticos que estariam em um ambiente protegido (GLICK, 2012).

3.4 Rizóbios endofíticos associados a plantas não-leguminosas

Rizóbios (gêneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* entre outros), conhecidos como microsimbiontes de plantas leguminosas também têm sido encontrados em associação com plantas de outras famílias como as Poaceae (ROUWS et al., 2013; BENEDUZI et al., 2013). Diversos estudos demonstram a colonização de rizóbios em raízes de gramíneas e seu efeitos na promoção de crescimento destas plantas. YANNI et al. (1997) foram os primeiros a isolar rizóbio endofítico em raízes de gramíneas. O mesmo isolou o *Rhizobium leguminosarum* by. *Trifoli* de tecidos internos de raízes de arroz cultivados em rotação com trevo de berssem (*Trifolium alexandrinum* L.). Em seus estudos verificou que o rizóbio promoveu a promoção de crescimento em plantas inoculadas sob condições gnotóbicas/campo e que o possível efeito poderia estar relacionada a produção de fitohormônios.

CHARENTREUIL et al. (2000) investigaram a presença de rizóbios endofíticos dentro das raízes do arroz selvagem *Oryza breviligulata*, que é o ancestral do arroz cultivado

africano *Oryza glaberrima*, os resultados indicavam que a colonização de rizóbios em raízes de arroz, ocorria através a penetração destas bactérias nas raízes de plantas ocasionadas por rupturas no tecido vegetal e fissuras criadas durante a emergência. FISCHER et al. (2012) utilizaram a análise de transcrito 16S e *nifH* em diferentes tecidos vegetais da variedade de cana-de-açúcar cv.RB867515 para verificação do microbioma da cana e obtiveram como resultados a descoberta de uma ampla diversidade de sequências *nifH* de *Ideonella/Herbaspirillum* anteriormente não caracterizada filotipos relacionados em brotos, bem como *Bradyrhizobium* sp. e *Rhizobium* nas raízes.

BURBANO et al. (2011) investigaram a comunidade bacteriana diazotrófica ativas em raízes de cana-de-açúcar cultivada no campo e outras plantas de três continentes por transcrição reversa do gene *nifH*. Os autores encontraram nas raízes filotipos de transcrição *nifH* muito predominante *Rhizobium rosettiformans*, sugerindo que este microrganismo estaria envolvido na fixação de nitrogênio associada à raiz com cana-de-açúcar, planta que não forma simbioses raiz-nódulo.

Recentemente ROUWS et al. (2013) isolaram por duas estratégias de cultivos (extração direta de extrato diluído e planta isca) *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* colonizando os tecidos internos de raiz da cultura da cana-de-açúcar da variedade RB867515. ARMANHI et al. (2018) utilizaram métodos independentes de cultivos para estudar a diversidade do microbioma de talos e raízes de cana-de-açúcar, indicando forte abundância do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* colonizando endofiticamente e externamente compartimentos da cultura. Estes trabalhos reforçam a idéia de que microrganismos endofíticos possuem grande potencial para serem explorados e utilizados em fins biotecnológicos para cultura de interesse agrônomico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Localização Experimental

Os experimentos do presente trabalho, foram realizados nos Laboratórios de: Ecologia Microbiana (LEMI), Genética e Bioquímica (LGB), Multiusuário de Biologia Molecular (LMBM), Gramíneas (LG) e Núcleo de Microscopia Avançada (NMA), localizados no Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), situada no município de Seropédica-RJ e análises de espectrometria de massa com cromatografia gasosa em monitoramento seletivo de íons (GC-MS / SIM), foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) em Campina Grande, PB em colaboração com Professor Doutor Carlos H.S.G. Meneses.

4.2 Estirpe bacteriana, meios e condições de cultivo

A estirpe *Rhizobium* sp. (P5-2 = BR 10268), foi obtida da Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD). Os meios de culturas utilizados para seu cultivo foram (Anexo): YM (*Yeast Mannitol*, VICENT, 1970), TY (*Yeast-Tryptone*, VICENT, 1970) e RDM (*Rhizobium Defined Medium*; BISHOP et al., 1976) modificado. Para obtenção de culturas puras o seu cultivo foi realizado em meio de cultura sólido de acordo com o fim de interesse em 28-30°C por 1-3 dias. Culturas líquidas foram incubadas em incubadora tipo 'shaker' com rotação de 150 rpm a 30°C.

4.3 Caracterização genética

4.3.1 Extração de DNA e análises de PCR

Células para extração de DNA foram obtidas por cultivo da estirpe BR 10268 em meio TY líquido conforme descrito em item 4.2. Uma alíquota de 1 mL da cultura foi transferida para um microtubo, as células foram precipitadas em uma centrífuga de bancada a 12000 rpm por 2 min. O precipitado celular foi usado para extração do DNA com a utilização do kit Wizard[®] Genomic DNA Purification (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As análises das reações de PCR dos genes *glnII*, *recA* e *nifH*, foram preparadas usando como molde o DNA extraído da estirpe em estudo, utilizando o Kit Go taq DNA polimerase (Promega). Água ultrapura estéril foi usada para completar o volume final 25 µL para cada reação. As condições de amplificação estão na Tabela 1.

4.3.2 Eletroforese em gel

O DNA extraído foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose (0,8%), durante 60 minutos a 100 Volts, preparado com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X). A amostra foi aplicada no gel sendo misturado 2 µL de tampão tipo *loading* (2x) (concentração inicial 10x) e 2 µL de DNA extraído. O gel foi corado com brometo de etídio. (0,5 µg. mL⁻¹) e descorados em água destilada. O mesmo procedimento foi utilizado nos produtos de PCR e BOX-PCR com algumas modificações: para os produtos de PCR dos genes 16S rRNA, *glnII*, *recA* e *nifH*, foram utilizados gel de agarose (2%) em tampão TAE 1X. Em cada poço do gel foi aplicado uma mistura de 2 µL de *loading* (2x) e 2 µL de produto de PCR (o mesmo para o controle negativo) e uma mistura de 1 µL de *loading* (2x) e 2 µL do marcador *low mass*. A eletroforese ocorreu a 90 V durante 90 minutos.

Tabela 1: Relação dos genes, iniciadores, sequências e ciclos utilizados para caracterização genética da estirpe BR 10268.

Genes	Iniciador	Sequência 5'-3'	Ciclos	Volume final por reação
⁽¹⁾ <i>glnII</i>	12 F	YAAGCTCGAGTACATYTTGGCT	95°C 5', 14 x (95°C 1', 62°C, 0,3°C/ciclo), 72°C 2', 18 x (95°C 1', 58°C 1', 72°C 2')	Buffer sem cor: 1 x; MgCl ₂ : 1,50 mM; dNTP: 0,20 mM; <i>glnII</i> 12 F: 0,20 µM; <i>glnII</i> 689R: 0,20 µM; Taq DNA polimerase: 1,25 U. (24 µL de Mix + 1 µL de DNA)
	689 R	TGCATGCCSGAGCCGTTCCA		
⁽²⁾ <i>recA</i>	6 F	CGKCTSGTAGAGGAYAAATCGGTGGA	95°C 5', 14 x (95°C 1', 62°C, 0,3°C/ciclo), 72°C 2', 18 x (95°C 1', 58°C 1', 72°C 2')	Buffer sem cor: 1 x; MgCl ₂ : 0,25 mM; dNTP: 0, 25 mM; <i>recA</i> 6 F: 0,50 µM; <i>recA</i> 555 R: 0,50 µM; Taq DNA polimerase: 1,50 U. (24µL de Mix + 1 µL de DNA)
	555 R	ATCGAGCGGTTCGTTCCGCAAGGG		
⁽³⁾ <i>nifH</i>	<i>nifH</i> I	AGCATGTCKCSAGYTCNTCCA	95°C 3', 18 x (95°C 1', 65°C, -0,5°C/ciclo), 72°C 2', 18 x (95°C 1', 56°C 1', 72°C 2') 72°C 5'	Buffer sem cor: 1 x; MgCl ₂ : 1,75 mM; dNTP: 0,25 mM; <i>nifH</i> I: 2,00 µM; <i>nifH</i> H (estoque 10 µM) 2,00 µM; Taq DNA polimerase: 1,25 U. (23 µL de Mix + 2 µL de DNA)
	<i>nifH</i> F	ACGGNAARGGSGGNATCGGCAA		

⁽¹⁾ VINUESA et al., 2005; ⁽²⁾ GAUNT et al., 2001; ⁽³⁾ LAGUERRE et al., 2001.

4.3.3 Sequenciamento e análises de sequências de genes

Os produtos de PCR foram sequenciados com o kit Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 3.1 v (Applied Biosystems – ABI) em sequenciador automático de DNA ABI 3730x1 (Applied Biosystems), de acordo com o manual do fabricante. As sequências foram analisadas manualmente com a ajuda do software BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Bélgica). As sequências de todos os genes foram verificadas com análises de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL et al., 1997). Alinhamento e análise filogenética foram conduzidos usando o *software* MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). Alinhamentos de sequências foram gerados usando a ferramenta *Muscle* (EDGAR, 2004) no MEGA 6. Utilizando o *software* MEGA 6, a sequência da estirpe foi alinhada com as sequências de genes de estirpes tipos de todas as espécies descritas do gênero *Rhizobium*. Em seguida, as sequências alinhadas porém não editadas, sendo utilizado a opção “*complete deletion*” no MEGA 6. As árvores filogenéticas foram calculadas usando o método de construção *maximum-likelihood* (ML), (FELSENSTEIN, 1985). O modelo mais adequado para o cálculo das árvores filogenéticas foi determinado para o alinhamento das sequências usando a ferramenta de seleção modelo integrado do MEGA 6. A confiabilidade da topologia das árvores filogenéticas foi avaliada utilizando o método de *bootstrap* com 1000 pseudoreplicatas (FELSENSTEIN, 1985).

4.4 Ensaio de germinação com arroz e detecção de fitohormônios

4.4.1 Cultivo bacteriano e preparo de sobrenadante

A estirpe BR 10268 foi cultivada em 50 mL de meio RDM modificado líquido, conforme indicações do item 4.2. Após o crescimento da estirpe, 25 mL de suspensão bacteriana foi centrifugado durante 10 min, 4.000 rpm a 4°C, (centrifuga Eppendorf 5810, rotor de ângulo fixo) para sedimentação de células. Dentro do gabinete de fluxo laminar o sobrenadante foi esterilizado por filtração (filtro millipore 0,22 µm). Alíquotas de 1,5 mL do sobrenadante foram secas a vácuo em aparelho *Speed Vac* (fabricante Labconco, modelo *Centrivap Cold Trap*) e enviadas para análises de fitohormônios. O restante do sobrenadante estéril, como também o restante da cultura de BR 10268 foram utilizados nos experimentos de inoculação de arroz.

4.4.2 Inoculação de sementes de arroz

O delineamento experimental foi composto por 4 tratamentos, 10 repetições e 1 ponto de coleta (6 DAI). Os tratamentos foram: T₀ (tratamento controle com apenas meio de cultura sem crescimento bacteriano), T₁ (tratamento com meio de cultura sem crescimento bacteriano + ácido giberélico (GA₃, 50 mg.L⁻¹), T₂ (tratamento com sobrenadante após crescimento da estirpe BR 10268), T₃ (tratamento com cultura da estirpe BR 10268). Para condução do experimento, utilizou-se sementes de arroz variedade IR 42. As sementes foram descascadas manualmente e desinfestadas superficialmente por imersão em álcool a 70% por 1 min, seguido por solução de peróxido de hidrogênio a 30% por 2 min e 5 lavagens sucessivas em água autoclavada estéril. As sementes desinfestadas foram imersas em 20 mL de solução dos respectivos tratamentos pelo período de 24 h e cobertos com papel alumínio para proteção das sementes e soluções da luz. Após as 24 h de inoculação, foi realizada a semeadura das sementes em caixa gerbox (caixas de poliestireno transparente de 12 x 12 cm) as quais foram previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio NaClO a 3 %, com sucessivas lavagens em água destilada estéril. Duas folhas de papel germitest estéreis umedecidas com

água destilada autoclavada foram posicionadas no fundo das caixas. Dentro do gabinete de fluxo laminar, 15 sementes de arroz por repetição de cada tratamento foram dispostos em 3 fileiras contendo 5 sementes em forma equidistante. Para manter a umidade as caixas gerbox foram lacradas com filme PVC e posteriormente mantidas em incubadora do tipo DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), a uma temperatura de 30°C e fotoperíodo de 12 h de luz branca, conforme recomendações das Regras para Análises de Sementes-RAS (BRASIL, 2009).

4.4.3 Variáveis analisadas ensaio com arroz

Para o ensaio de arroz realizou-se a contagem de germinação (CG), índice de velocidade de emergência (IVE). No dia da coleta (6 DAI), determinou-se a massa de parte aérea fresca (MPAF), massa de parte aérea seca (MSPA), massa de raiz fresca (MRF) e massa de raiz seca (MSR). Essa determinação foi realizada para o conjunto de 15 plântulas de cada tratamento/repetição. As medições foram realizadas com um paquímetro dentro do gabinete de fluxo laminar, sendo a porcentagem determinada pelo número de sementes germinadas em relação ao número total de sementes. A CG foi realizada 24 h após a inoculação, as plântulas germinadas foram consideradas todas aquelas que emitiram parte aérea maior que 2,0 mm de comprimento. O IVE foi determinado pela contagem diária do número de plântulas germinadas, até o dia da coleta. O material vegetal foi acondicionado em sacos de papel, os quais foram conduzidos a uma estufa de circulação de ar-forçado para secagem a 60°C por um período de 24 h e posteriormente foi efetuada a pesagem em balança analítica. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação múltiplas de média pelo teste t (LSD) a 5% de probabilidade.

4.5 Análise de cromatografia gasosas acoplada a espectrometria de massa (GC/MS)

As análises foram realizadas na UECG pela equipe de Dr. Carlos Menezes, de acordo com os seguintes procedimentos. A amostra de sobrenadante liofilizada foi dissolvido em 1,5 mL metanol (MeOH). Essa solução foi submetida a cromatografia de alta performance (C18-HPLC) de fase reversa usando uma coluna BonDAIak C18 3,9 x 300 m (Waters Corp., EUA) e eluídos a 1,5 mL/min com as seguintes fases móveis: 0 a 5 min, isocrático 28% metanol (MeOH) em 1% de ácido acético aquoso; 5 a 35 min, gradiente linear de 28% a 86% de MeOH; 35 a 36 min, 86% a 100% de MeOH; 36 a 40 min, isocrático 100% MeOH. Até 48 frações de 1,5 mL cada foram coletadas. As frações foram preparadas para injeção em um cromatógrafo a gás / espectrômetro de massa (GC/MS) com modo seletivo de monitoramento de íons (SIM) (sistema GC de rede 6890N e detector seletivo de massa de rede 5973; Agilent Technologies, EUA). Para cada tipo de analito encontrado, 1 µL de amostra foi injetado em uma coluna capilar DB-1 com 30 m x 0,25 mm i.d. e espessura de filme de 0,25 µm (J & W Scientific Co., EUA). A temperatura do forno GC foi programada para 1 min a 60°C, depois para 15°C / min a 200°C seguido de 5°C / min a 285°C. O gás carreador de hélio foi mantido a uma pressão de 30°C. kPa. O GC foi diretamente conectado a um detector de massa seletiva com uma interface e temperatura de fonte de 280°C, uma tensão de ionização de 70 V e um tempo de permanência de 100 ms. O modo de varredura completa (o primeiro teste) e os três íons principais dos padrões internos de fitohormônios de citocinina (CG), ácido-3-indol-acético (IAA) e ácido giberélico (GA), suplementados com os compostos encontrados foram monitorados simultaneamente. O tempo de retenção foi determinado usando padrões de hidrocarbonetos para calcular o valor de KRI (Índice de Retenção de Kovats) e, a quantificação dos analitos foi baseada em razões de pico de cada composto não deuterados (extraídos) para os padrões deuterados.

4.6 Ensaios de brotação com mini-toletes de cana-de-açúcar

4.6.1 Preparo e inoculação de mini-toletes

Para avaliar a capacidade de promoção de crescimento vegetal de cana-de-açúcar, foram conduzidos dois ensaios com inoculação da estirpe BR 10268 em condições controladas. Nos dois ensaios utilizou-se a cultivar de cana-de-açúcar RB867515. O primeiro ensaio foi conduzido em setembro de 2016, sendo os colmos provenientes de uma usina de produção de cana-de-açúcar Zilor em Quatá (SP). O segundo ensaio foi realizado em março de 2017, os colmos foram coletados na área experimental da Embrapa Agrobiologia – Terraço. Os mini-toletes (gemas individualizadas) foram obtidos através de cortes realizados manualmente com a utilização de uma guilhotina com uma única lâmina. Gemas homogêneas com 3-3,5 cm de diâmetro foram selecionadas e submetidas a tratamentos térmico (52°C por 30 min) e antifúngico (Comet[®], a base de Piraclostrobina, 1 mL.L⁻¹ por 3 min) para diminuir a incidência de fitopatógenos. A estirpe BR 10268 foi cultivada em meio TY líquido, conforme descrito em 4.2 até atingir uma $D.O_{(600\text{ nm})} = 0,8$. Em seguida, a cultura foi diluída 100 x em água destilada autoclavada estéril e os mini-toletes foram imersos nessa suspensão por 1 h. Como controle os mini-toletes foram imersos em uma solução contendo apenas o meio de cultura, sem as bactérias. Foram separadas alíquotas de 1,0 mL para posterior quantificação de células inoculadas por meio de diluição seriada seguida por plaqueamento.

4.6.2 Delineamento experimental dos ensaios com mini-toletes

Para o primeiro ensaio utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), composto por 2 tratamentos (inoculado e não inoculado) com 6 pontos de coleta (3, 6, 8, 10, 12 e 14 dias após a inoculação, DAI) e 8 repetições, totalizando 96 parcelas experimentais. O segundo ensaio foi realizado em delineamento em blocos ao acaso (DBC), composto por 2 tratamentos (inoculado e não inoculado), com 5 pontos de coleta (3, 6, 8, 10, 14 DAI) com 7 repetições. Os mini-toletes foram plantados em recipientes descartáveis contendo 500 g de uma mistura autoclavada de areia e vermiculita na proporção 2:1 (v/v) colocados em uma incubadora (primeiro ensaio) e sala de crescimento vegetal equipada com lâmpadas fluorescente (segundo ensaio) a uma temperatura de 30°C com fotoperíodo de 12 h. As irrigações foram realizadas a cada dois dias, adicionando-se 30 mL (medida constante) com água filtrada estéril em cada recipiente.

4.6.3 Variáveis avaliadas dos ensaios com mini-toletes

Nos dois experimentos, nos diferentes pontos de coleta, foram avaliadas as seguintes variáveis: comprimento da parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR). Para as determinações do comprimento de raiz no primeiro ensaio, utilizou-se uma régua graduada com escala de valores em centímetros. No segundo ensaio além das variáveis acima citadas, avaliou-se: os sistemas radiculares dos mini-toletes, que foram escaneados e as imagens foram analisadas utilizando o programa *Winrhizo* (Regent Sytems, Quebec, Canadá), determinando aérea total projetada (ATP), volume de raiz (VR), e comprimento total de raiz (CTR). Para as determinações de massa seca o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel e seco em uma estufa de circulação de ar-forçado a 60°C por um período de 48 h e posteriormente efetuou-se a pesagem em balança analítica. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação múltiplas de média pelo teste não paramétrico de Wilcoxon e teste t (LSD) a 5% de probabilidade.

4.7 Reisolamento da estirpe BR 10268 de tecidos de mini-toletes brotados

4.7.1 Condução experimental

O material vegetal foi proveniente de um banco de germoplasma da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). O cultivo, tratamento (térmico e químico) e inoculação da estirpe foram realizados conforme a metodologia adotada no 3.2 e 3.3.1. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), composto por: 2 tratamentos (inoculado e não inoculado) x 5 repetições x 2 coletas (07 e 20 DAI). Os mini-toletes foram plantados em recipientes descartáveis contendo 500 g de uma mistura autoclavada de areia e vermiculita na proporção 2:1 (v/v) colocados em uma incubadora do tipo DBO a uma temperatura de 30°C com fotoperíodo de 12 h. As irrigações foram realizadas a cada dia, adicionando-se 30 mL de água filtrada estéril em cada recipiente até a data de coleta final

4.7.2 Desinfestação superficial dos mini-toletes após inoculação

Nas datas de coleta, três mini-toletes em processo de brotação por tratamento foram cuidadosamente retiradas do substrato e lavadas com água estéril para remoção do substrato aderente. Os mini-toletes foram separados em segmentos: broto, gema e raiz. As amostras foram pesadas em balança analítica em ambiente estéril (gabinete de fluxo laminar). Em seguida, os materiais de broto e de raiz foram imersas em solução de solução de hipoclorito de sódio NaClO a 2-3% durante 2 min, etanol 70% por 1 min, seguido de 5 lavagens sucessivas em água destilada estéril. Para garantir a eficácia da desinfestação, alíquotas da última fase de lavagem foram plaqueadas e os brotos e as raízes desinfestados foram colocados brevemente sobre placas de meio YMA que foram incubadas a 30°C por 3 dias. Posteriormente as amostras (brotos e raízes) foram transferidas para um graal, onde se adicionou-se 6 mL de água autoclavada estéril para maceramento manual com pistilo até obtenção de suspensão homogênea. As gemas foram imersas rapidamente em etanol (EtOH) 92,8 % e então flambadas. Em seguida, as partes externas foram removidas, usando-se uma faca estéril através de flambagem. O tecido interno obtido dessa forma de cada gema teve sua massa determinada com ajuda de uma balança analítica em ambiente estéril. Depois da pesagem, as gemas foram imersas novamente em EtOH a 92,8 % e flambadas (2x). O material de cada gema foi triturado com ajuda de um liquidificador industrial previamente desinfestado com solução NaClO a 2%. O liquidificador desinfestado foi lavado com sucessivas trocas de água estéril antes do uso e entre diferentes amostras. Como teste de esterilidade, antes do primeiro uso e entre as diferentes amostras, o aparelho foi acionado após adição de 200 mL de água estéril e alíquotas (50 µL) dessa água foram plaqueadas para verificar a ausência de bactérias. As amostras de gemas foram trituradas em um volume de 200 mL de água estéril durante aproximadamente 3 min.

4.7.3 Quantificação de colônias recuperadas

Alíquotas das suspensões homogêneas foram diluídas seriadamente em solução salina (NaCl 0,8 %) estéril até o nível 10^{-4} para o tratamento não inoculado e até 10^{-5} para o tratamento inoculado. Alíquotas de 50 µL das diluições seriadas foram espalhadas em placas de meio de cultura TY com uso de uma alça de Drigalski. Nesta etapa realizou-se também o plaqueamento cultura pura da estirpe BR 10268 nas diluições de 10^{-1} até 10^{-5} para servir como um controle positivo (comparação de colônias inoculadas com a estirpe pura). As placas

foram incubadas em DBO a uma temperatura de 28°C, durante 1-3 d para início de contagem de colônias. A contagem das unidades formadoras de colônias formadas (UFC) nas placas foi realizada através de contagem manual em contador de colônias e as colônias foram visualmente comparadas com uma cultura pura de BR 10268. O número de UFC por grama de amostra diluída foram calculados a partir da média dos valores obtidos, através da seguinte fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de UFC/g} = \frac{(X + Y)}{X} \times A \times B \times 20^*$$

Legenda:

X= massa dos segmentos (g)

Y= volume de água adicionado para a maceração/trituração (mL)

A= número de colônias formadas na placa do nível de diluição selecionado (unidades)

B= fator de diluição (10^2 , 10^3 , 10^4 ou 10^5)

*= fator de correção de alíquota para o volume plaqueado (50 µL) em relação ao volume total (1000 µL); $1000/50=20$.

UFC/g = número de UFC/ grama de tecido.

4.7.3.1 “*Fingerprint*” Box-PCR de colônias inoculadas

Colônias representativas da estirpe BR 10268 e morfotipos de colônias atípicos encontrados na contagem de colônias inoculadas foram colocadas em microtubos contendo 100 µL de água ultrapura para caracterização do perfil genômico. Para a realização dessa técnica 2 µL foram retirados desses 100 µL para a realização do Box-PCR. A reação foi realizada com reagentes do Kit Go Taq DNA com volume final de 25 µL. O programa no termociclador consistiu das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 min, anelamento a 53°C por 1 min, em seguida 65°C por 8 min e extensão final a 65°C por 16 min. O iniciador usado foi o Box A1R (5′ CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3′) (VERSALOVIC et al., 1994). Após a realização da PCR, Os produtos de BOX-PCR foram verificados em gel de agarose (2%) em tampão TAE 1X. Em cada poço do gel foi aplicado 10 µL de produto do BOX -PCR, 10 µL do controle negativo (somente a mistura da reação) e 4 µL do marcador 1 kb *Plus DNA ladder*. A eletroforese ocorreu a 70 V durante 300 m. Ao descorar os géis, utilizaram-se três lavagens de 30 minutos.

4.8 Obtenção da estirpe BR 10268 marcada com mCherry

4.8.1 Preparação de células eletrocompetentes

Para preparação de células eletrocompetentes a estirpe BR 10268 foi cultivada em tubo de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura TY, por 24 h a 30° C e 150 rpm. Após crescimento, 500 µL desta pré-cultura foram transferidos para um frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo um volume de 100 mL do respectivo meio de cultura, posteriormente foi incubada sobre as mesmas condições acima citada, durante 12 h até atingir uma densidade ótica $D.O_{(600)} = 0,6$. Subsequentemente as células foram transferidas para 2 tubos do tipo Falcon com um volume de 50 mL contendo meio de cultura líquido, sendo os tubos acondicionados em gelo por 30 min. Para preparação das células eletrocompetentes utilizou-se a metodologia adotada por ROUWS et al. (2006), sendo todos os procedimentos realizados em gelo, seguindo as etapas:

a) Sedimentação das células: os tubos Falcon contendo células crescida em meio TY, foram centrifugados durante 8 min a 4.000 rpm sob 4°C (centrifuga Eppendorf 5810R) com posterior drenagem e descarte do sobrenadante;

b) Primeira lavagem e ressuspensão de células com água estéril: foram adicionados 25 mL de água ultrapura (Milli-Q) estéril gelada em cada tubo, ocorrendo cuidadosamente a ressuspensão dos sedimentos bacterianos com pequenos movimentos do tubo. Logo em seguida foram adicionados mais 25 mL água Milli-Q estéril gelada para se obter um volume final de 50 mL de suspensão. Após ressuspensão total de células os tubos foram novamente centrifugados (08 minutos, 4.000 rpm sob 4°C) sendo descartado o sobrenadante.

c) Segunda lavagem e ressuspensão de células com glicerol: foram adicionados 25 mL de glicerol a 10% estéril gelado, sendo os sedimentos bacterianos ressuspensos (sem movimentos bruscos por cerca de 1 h), posteriormente as células foram centrifugadas sob as mesmas condições descritas anteriormente.

d) Término de lavagem e ressuspensão celular final: após centrifugação descartou-se o sobrenadante e ao sedimento bacteriano foi adicionado 1 mL de glicerol a 10%. Desta vez a ressuspensão foi realizada cuidadosamente com uma pipeta. Após a completa ressuspensão, as células eletrocompetentes foram distribuídas em tubos do tipo eppendorf e estocadas a -80°C.

4.8.2 Eletroporação da estirpe BR 10268

Para transformação das células, alíquotas de 50 µL de células eletrocompetentes foram descongeladas sobre gelo por aproximadamente 15 min. As células foram transferidas para eletrocubetas com espaço de 2 mm (BIO RAD) acondicionadas sobre gelo, foi colocado os 50 µL de células eletrocompetentes. Em seguida adicionou-se alíquotas de 0,5 µL de uma solução de DNA do plasmídeo pLMB 426 (mCherry). Após homogeneização a eletrocubeta foi submetida a pulso elétrico (186 Ω em modo “high voltage”, 2,5 kV, com constante de tempo de 0,8 ms) para permitir a entrada do plasmídeo na célula. Após a eletroporação as células foram rapidamente ressuspensas em 1 mL de meio, sendo homogeneizada e transferida para tubo Falcon contendo 25 mL de meio TY e incubada a 30°C com rotação de 150 rpm durante 2 h para recuperação de células. Em seguida, alíquotas da suspensão foram plaqueadas em meio TY contendo gentamicina (40 µg/mL) a fim de selecionar os transformantes.

4.8.3 Inoculação da estirpe BR 10268 (pLMB 426).

A estirpe selvagem BR 10268 (selvagem) e a estirpe marcada BR 10268 (mCherry) foram cultivadas conforme o item 4.2. Para o cultivo da estirpe transformada, o antibiótico seletivo gentamicina foi adicionado na concentração de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O material vegetal foi proveniente do banco de germoplasma da UFRRJ, os mesmos receberam tratamento térmico e químico. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado composto por 2 tratamentos (inoculado com estirpe selvagem e inoculado com estirpe mutante) x 2 pontos de coleta (3 e 8 DAI) e 4 repetições. Os mini-toletes foram plantados em recipientes descartáveis contendo 500 g de uma mistura autoclavada de areia e vermiculita na proporção 2:1 (v/v) colocados em uma incubadora do tipo DBO a uma temperatura de 30°C com fotoperíodo de 12 h. As irrigações foram realizadas a cada dois dias, adicionando-se 30 mL com água filtrada estéril em cada recipiente.

4.8.4 Microscopia de varredura confocal a laser (CLSM)

Nas datas de coleta, os mini-toletes foram cuidadosamente retirados do substrato e lavados com água estéril para remoção do substrato aderente. Posteriormente segmentos de raízes e gemas foram desinfestados superficialmente conforme o item 4.7. 2 e em seguida, foram cortados longitudinalmente com uma lâmina de barbear e visualizados em microscopia confocal a laser (CLSM) por microscopia de campo de epifluorescência no microscópio LSM 700 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha). Os cortes foram montadas em lâminas de microscópio de vidro com uma gota de tampão fosfato-salino (PBS, 1X). As lâminas foram visualizadas no escuro e examinadas no mesmo dia em que foram preparadas para minimizar a perda de fluorescência. As agregações de células com fluorescência (vermelha) no material vegetal foram visualizadas sob comprimentos de onda de excitação de 555 nm (canal 1) e 488 nm (canal 2).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização Genética

Para a caracterização filogenética da estirpe foram utilizados os genes *housekeeping glnII* e *recA*. Embora a amplificação por PCR do gene *nifH* teve êxito, o sequenciamento não pode ser realizado com sucesso e esses resultados não serão apresentados. As análises filogenéticas foram baseadas na comparação das sequências nucleotídicas da estirpe *Rhizobium* (BR 10268) e as estirpes de referência (estirpe-tipo) do gênero *Rhizobium*. As árvores filogenéticas construídas com as sequências do gene *glnII* e *recA* posicionaram a estirpe em um clado junto com cinco espécies já descritas: *Rhizobium multihospitium* CCBAU 83401^T (HAN et al., 2008), *Rhizobium hainanense* (CHEN et al., 1997), *Rhizobium freirei* PRF 81(DALL'AGNOL et al., 2016), *Rhizobium tropici* CIAT 889^T (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991), *Rhizobium miluonense* CCBAU 41251^T (GU et al., 2008).

A inferência das árvores filogenética obtidas em ambos os genes acima citados apresentaram baixo valor de bootstrap sendo que o clado obtido do agrupamento formado para o gene *glnII* foi de 75% e no agrupamento formado para o gene *recA* apresentou 41 % de possibilidades de confiabilidade do agrupamento. Existem algumas pequenas diferenças entre as filogenias para ambos os genes (Figura 2 e 3). Para o gene *glnII* (Figura 2) a estirpe se posicionou mais próxima do *Rhizobium tropici* CIAT 889^T, isolada de nódulos de *Phaseolus vulgaris* (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991) e *Rhizobium miluonense* CCBAU 41251^T isolada de nódulo raiz de Lespedeza (GU et al., 2008). Para o gene *recA* (Figura 3) a estirpe foi agrupada próximo de *Rhizobium freirei* PRF 81^T isolado de *Phaseolus vulgaris* (DALL'AGNOL et al., 2016) e *Rhizobium multihospitium* CCBAU 83401^T isolado de várias espécies de leguminosas nativas de Xinjiang, China. (HAN et al., 2008) e próxima ao *Rhizobium miluonense* CCBAU 41251^T (GU et al., 2008).

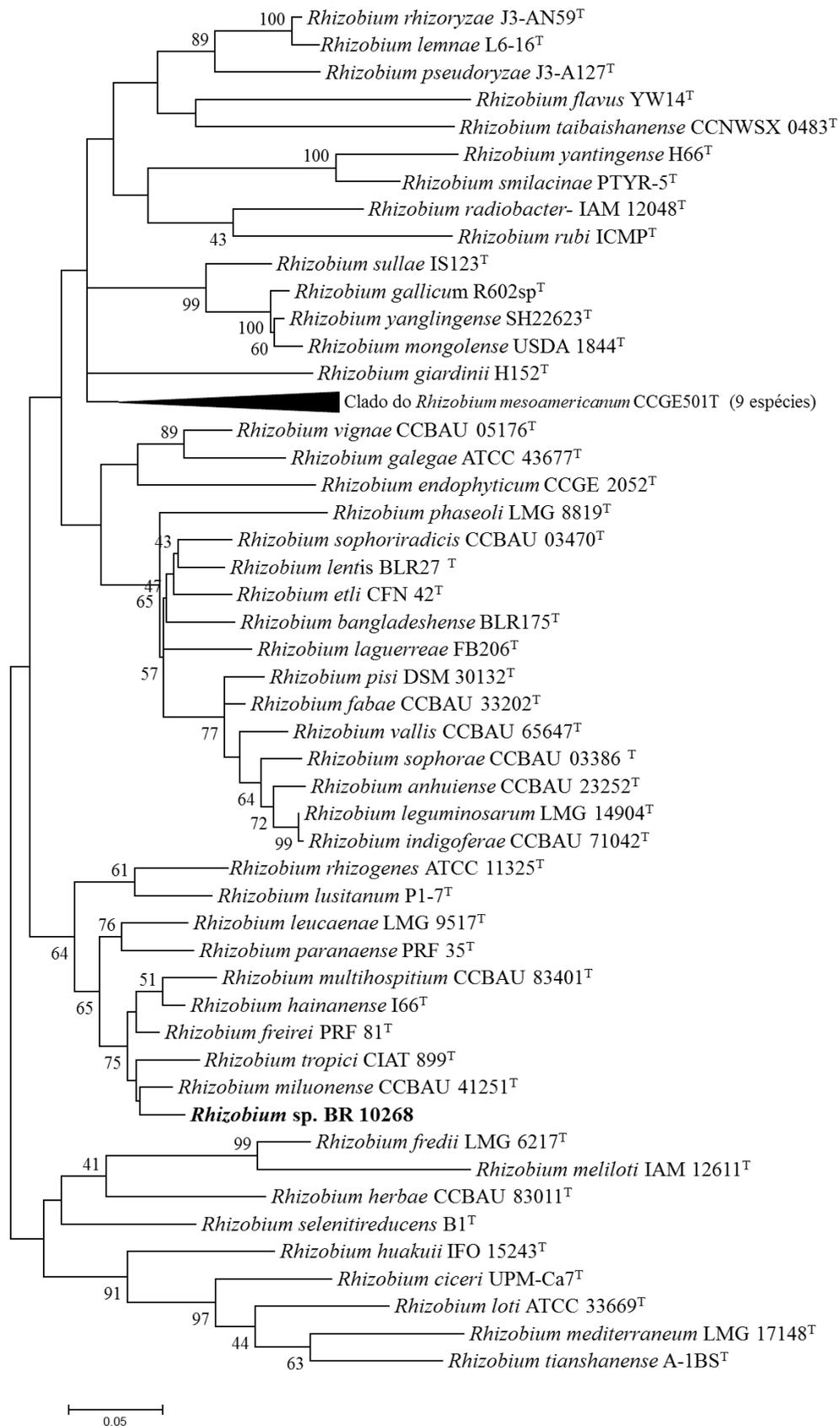


Figura 2: Dendrograma da análise filogenética molecular da estirpe BR 10268 ao gene *housekeeping glnII*. A árvore foi construída no Programa MEGA versão 6.0, o método utilizado foi da máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei. Considerando um bootstrap de 1000 repetições.

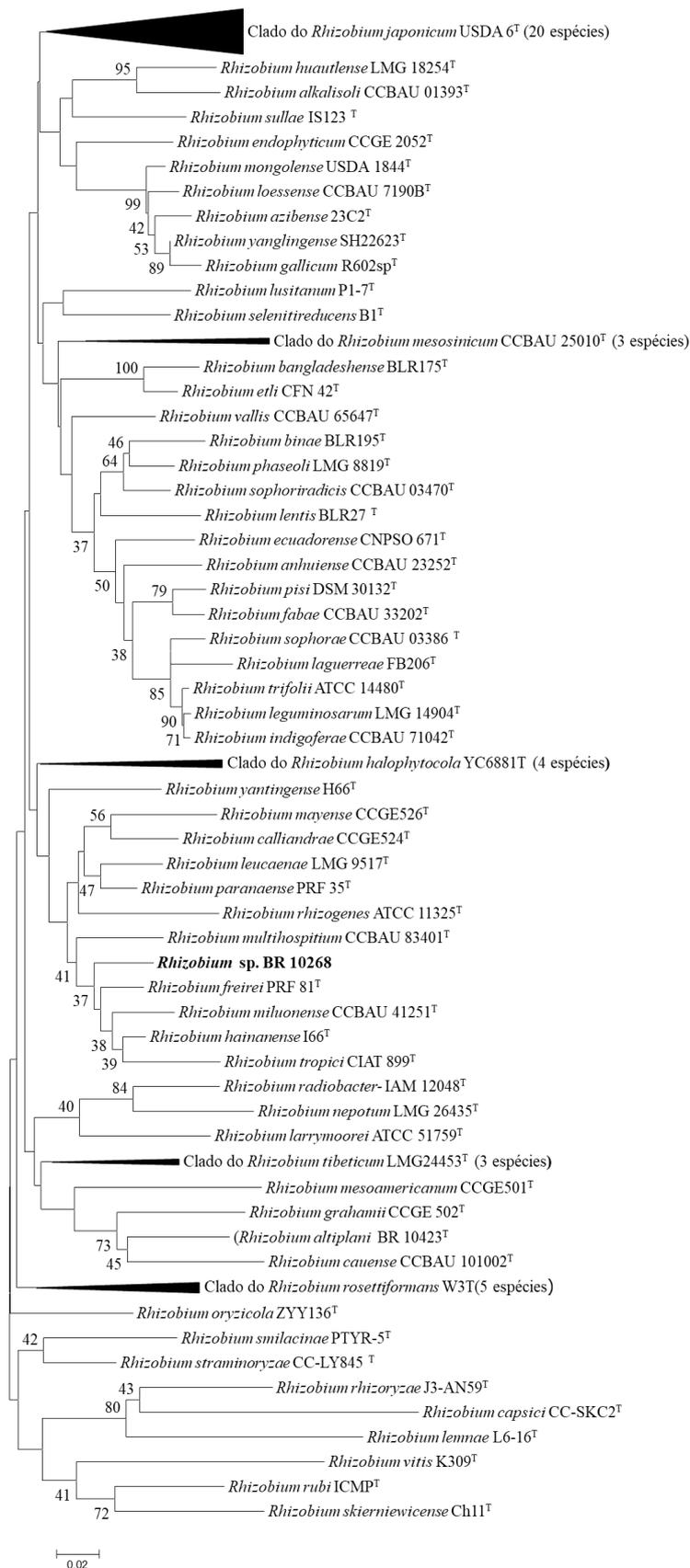


Figura 3: Dendograma da análise filogenética molecular da estirpe BR 10268 ao gene *housekeeping recA*. A árvore foi construída no Programa MEGA versão 6.0, o método utilizado foi da máxima verossimilhança baseado no modelo de Tamura-Nei. Considerando um bootstrap de 1000 repetições.

5.2 Detecção e quantificação de fitohormônios bacteriano

Para identificação e quantificação de fitohormônios um ensaio foi conduzido para as análises de cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa com sobrenadante da estirpe em estudo. No sobrenadante da estirpe de *Rhizobium* (BR 10268) foram encontrados os seguintes reguladores de crescimento vegetal: ácido giberélico (GA), ácido indol-3-acético (IAA) e citocinina (CK). As GAs foram os compostos encontrados em maiores quantidades, seguido do ácido indol-3-acético (IAA). Essa diferença é quase mínima, indicando que os dois compostos são os mais ativos na biossíntese da estirpe BR 10268. Embora tenham sido evidenciados que a predominância de fitohormônio produzidos pela estirpe sejam o GA e IAA, detecção de CK em poucas concentrações indicam que a estirpe produz mais de um fitohormônio durante seu crescimento (Tabela 2).

Tabela 2: Detecção e quantificação de fitohormônios através de análises de espectrometria de massa com cromatografia gasosa em monitoramento seletivo de íons (GC-MS / SIM) após cultivo da estirpe BR 10268 em meio seletivo (RDM) durante 24h de crescimento.

Tipos de hormônios	Concentração (ng.mL ⁻¹)
GA ₁	22,52
GA ₃	33,45
GA ₄	20,59
GA ₇	5,71
GA ₉	10,11
GA ₁₂	3,22
GA ₂₀	13,66
IAA	30,23
CK	3,39

GA_(x) giberilinas ativas e não ativas; IAA(ácido-3- indol acético); CK (citocinina)

5.3 Promoção de crescimento vegetal de sementes de arroz inoculados

Para o ensaio realizado com arroz, não foram evidenciadas diferenças significativas pelo teste de t a 5% de probabilidade para as variáveis: CG, IVE, MSPA, MFR e MSR (Figura 4a, b, d, e). Efeitos estatisticamente significativos foram encontrados somente para a variável CPA (Figura 3 c). Esse efeito foi observado ao primeiro ponto de coleta 1 DAI, onde os tratamentos embebidos com sobrenadante (T₂) e ácido giberélico (T₁) foram superiores ao tratamento controle (T₀) e ao tratamento inoculado com a estirpe BR 10268 (T₃) com incremento de 45% e 44% respectivamente (Figura 4C). Aos 6 (DAI) este aumento significativo não se mantém, ocorrendo uma baixa na atividade do tratamento contendo o sobrenadante (T₂). Estatisticamente somente o tratamento com ácido giberélico se mantém superior aos outros.

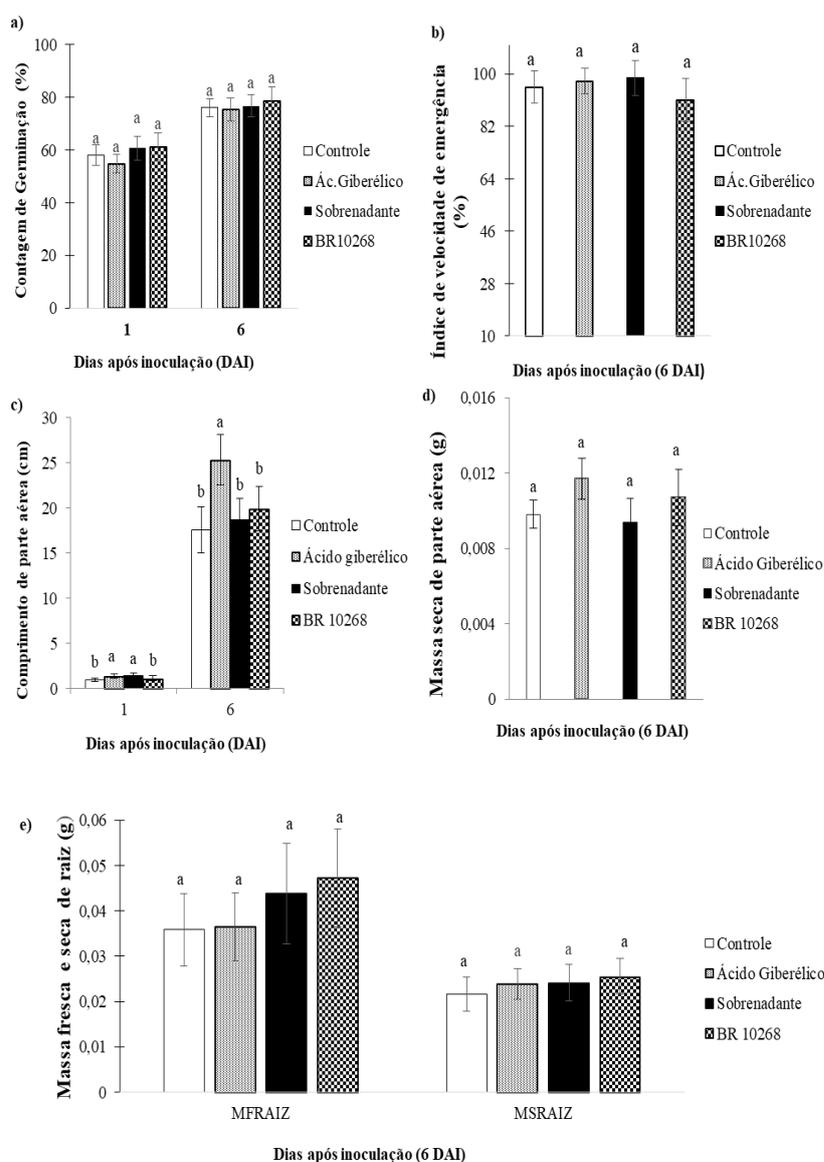


Figura 4: Efeito da inoculação da estirpe BR 10268 em sementes de arroz sob diferentes tratamentos (da esquerda para direita): T₀ (controle), T₁(ácido giberélico sintético), T₂ (sobrenadante da BR 10268) e T₃ (cultura da BR 10268). a) contagem de germinação (CG); b) índice de velocidade de emergência (IVE); c) comprimento de parte aérea (CPA), d) massa seca de parte aérea (MSPA), e) massa fresca e seca de raiz (MFR e MSR). Médias seguidas de letras iguais, dentro de cada data, não diferem entre si pelo teste t (LSD) a 5% de probabilidade.

5.4 Brotação de mini-toletes inoculados com a estirpe BR 10268

A estirpe BR 10268 foi avaliada quanto à capacidade de acelerar a brotação de mini-toletes em dois experimentos conduzidos em condições controladas. Para o primeiro experimento foram encontradas diferenças significativamente superiores para o tratamento inoculado nos diferentes pontos de coletas em algumas variáveis analisadas. Para a variável de comprimento de parte aérea (CPA) os efeitos significativos foram encontrados aos 10 e 14 DAI, sendo evidenciados incrementos de parte aérea de 30% e 24% respectivamente (Figura 5a). Para massa seca de parte aérea (MSPA) e massa seca de raiz (MSR) os efeitos ocorrem aos 8 e 14 dias após a inoculação (DAI), respectivamente com aumento de 104 % e 14 % de biomassa seca (Figura 5b e d). No entanto para o comprimento de raiz (CR) não foram evidenciadas diferenças significativas entre os tratamentos para os pontos de coletas (Figura 5c).

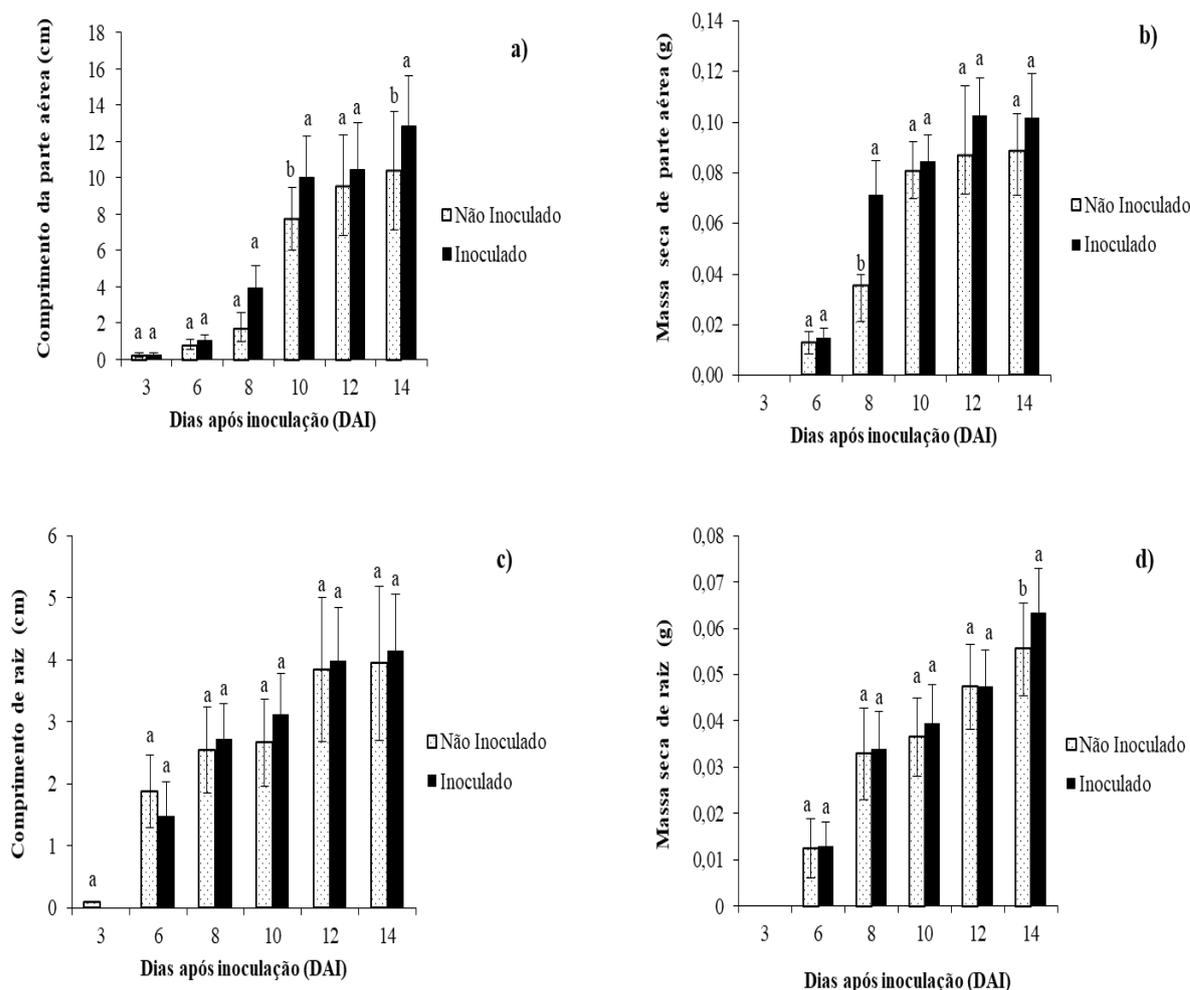


Figura 5: Efeito da inoculação da estirpe BR 10268 sobre a brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar cv. RB867515, provenientes de usina de produção de cana Zilor em Quatá (SP), primeiro experimento. **a)** comprimento de parte aérea (CPA), **b)** massa seca de parte aérea seca (MSPA), **c)** comprimento de raiz (CR) e **d)** massa seca de raiz (MSR) avaliados sobre diferentes pontos de coleta (3, 6, 8, 10, 12 e 14 DAI). Médias seguidas de letras iguais, dentro de cada data, não diferem entre si pelo teste não paramétrico de Wilcoxon, a 5% de probabilidade.

No segundo ensaio foram evidenciadas diferenças significativas para as variáveis comprimento de parte aérea (CPA), massa seca de parte aérea (MSPA) pelo teste t, a 5% de probabilidade. Para a CPA os efeitos foram encontrados aos 3 DAI, ocorrendo aumento de parte aérea de 136% seca (Figura 6a). Já para a MSPA essa diferença significativa é encontrada aos 6 DAI com incremento de 130,8% de biomassa seca (Figura 6 b). Para as variáveis: comprimento total de raiz (CTR), massa seca de raiz (MSR), aérea total projetada (ATP) e volume de raiz (VR) não foram encontrados diferenças estatisticamente significativas para nenhum ponto de coleta (dados não mostrados). Esses resultados indicam superioridade do tratamento inoculado em comparação com o tratamento não inoculado para ambos os ensaios.

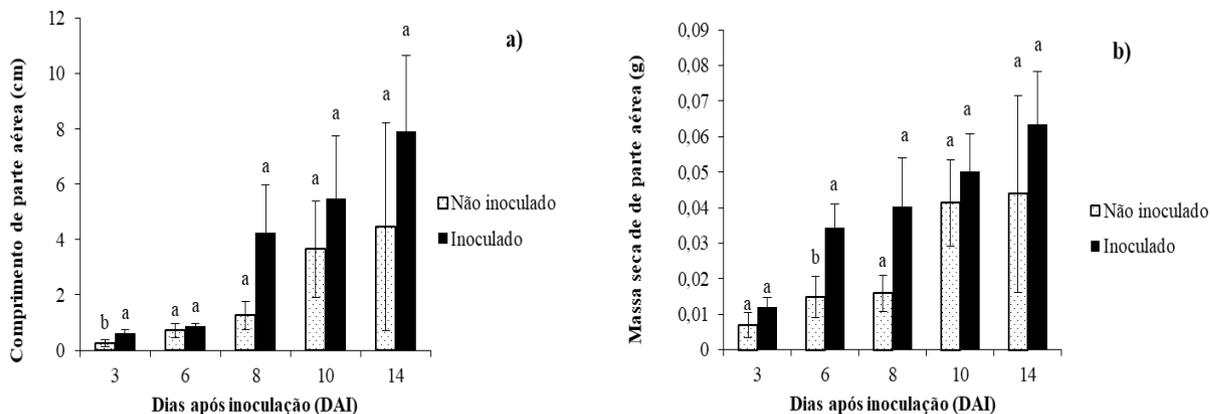


Figura 6: Efeito da inoculação de BR 10268 sobre a brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar cv. RB867515 provenientes do campo experimental da Embrapa Agrobiologia, segundo experimento, **a)** comprimento de parte aérea (CPA) e **b)** massa de parte aérea seca (MPAS), avaliada sobre diferentes pontos de coleta (3, 6, 8, 10 e 14 DAI). Médias seguidas de letras iguais, dentro de cada data, não diferem entre si pelo teste t (LSD) a 5% de probabilidade.

5.5 Confirmação da identidade e quantificação da estirpe BR 10268

Colônias bacterianas foram obtidas de tecidos de mini-toletes desinfestados superficialmente. Embora essas colônias apareceram tanto para mini-toletes inoculados como para os não inoculados, os números foram muito superiores para os inoculados. Realizou-se uma análise visual das colônias o que permitiu identificar aquelas parecidas com a estirpe inoculada BR 10268. Nos casos duvidosos, a técnica de BOX-PCR foi aplicada e permitiu confirmar o resultado da caracterização visual (Figura 7). Com base na contagem das colônias identificadas como BR 10268, foi possível estimar a densidade dessa estirpe no interior de raízes, parte aérea e tecido de colmo dos mini-toletes em processo de brotação (Tabela 3). Nos dois pontos de coleta (7 e 20 DAI), não foram observadas colônias da estirpe no segmento de broto ao nível de detecção estabelecido, ocorrendo a quantificação e recuperação de colônias somente para os segmentos de gema e raiz. Aos 7 DAI o número de bactérias BR 10268 foi mais de 10 vezes superior em tecidos de colmo do que nas raízes. Aos 20 DAI a colonização da gema se manteve superior ao tecido de raiz, porém em ambos os segmentos ocorreu diminuição de densidade de células (Tabela 3). Para o tratamento controle não foi observada a presença da estirpe, porém observou-se o crescimento de colônias com morfologia semelhante à estirpe inoculada. Isto porém não prejudicou a contagem de células inoculadas, uma vez que a análise de BOX-PCR permitiu a distinção dessas colônias a nível genético.

BOX-PCR

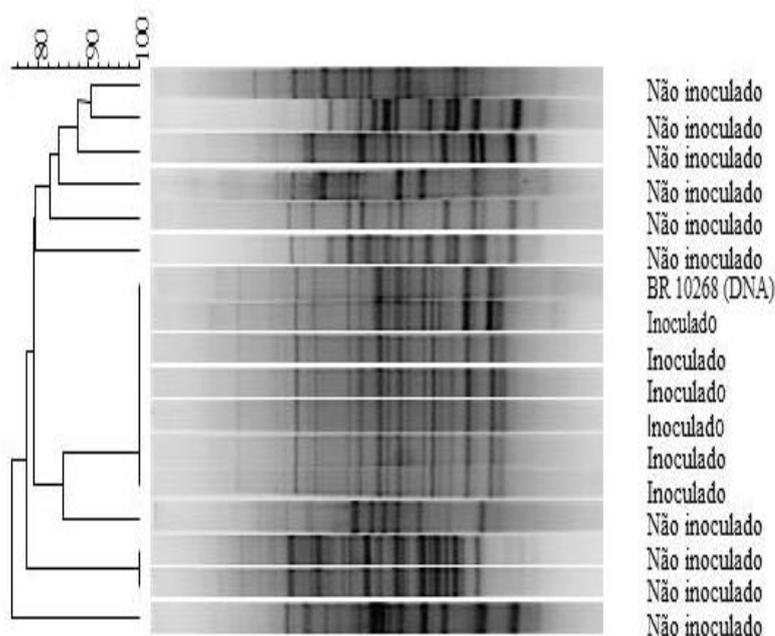


Figura 7: Dendrograma obtido a partir da técnica Box-PCR *fingerprinting* das amostras representativas de estirpes recuperadas (tratamento inoculado) e estirpes com características que apresentaram um morfotipo semelhante a estirpe (tratamento não inoculado), pela contagem de células depois de diluições em série de gema e raiz de mini-toletes de cana-de-açúcar aos (7 e 20 DAI), (discriminação realizada a nível dos tratamentos utilizados). os agrupamentos foram obtidos através do programa Bionumerics 7.6. o algoritmo foi calculado com base no Dice's, coeficiente de similaridade usando o método grupo par não ponderada com o agrupamento de média aritmética pelo (UPGMA).

Tabela 3: Quantificação de células recuperadas da estirpe BR 10268, após maceramento e trituração de tecidos internos de segmentos de mini-toletes de cana-de-açúcar aos 7 e 20 DAI.

Tratamento	Número de células da estirpe BR 10268 (UFC.g ⁻¹ de tecido fresco)*					
	7 DAI			20 DAI		
	Broto	Gema	Raiz	Broto	Gema	Raiz
Inoculado	N.D	1,8±0,9.10 ⁷	4,9±2,7.10 ⁵	N.D	2,1±0,7.10 ⁵	5,6 ±4,5.10 ⁴
Não inoculado	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

*dados expressos como médias arredondadas ± erro-padrão de duplicatas de placas, com valores expressos em UFC/ g de massa fresca de segmentos.

N.D não detectado nos níveis de diluições estabelecidos.

5.6 Análise microscópica da interação bactéria-planta

5.6.1 Transformação da estirpe BR 10268

Para o monitoramento da colonização endofítica da estirpe em estudo nos tecidos internos de cana-de-açúcar, foi realizado um experimento com visualização em microscopia confocal a laser, envolvendo a transformação da estirpe BR 10268 contendo o plasmídeo pLMB 426 que codifica a proteína vermelho-fluorescente mCherry. As observações mostraram que a transformação da estirpe foi eficiente pelo método de eletroporação e que os transformantes apresentaram alto nível de fluorescência vermelha. Após verificação de crescimento dos transformantes em placa contendo $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em meio de cultura TY. (Figura 8).

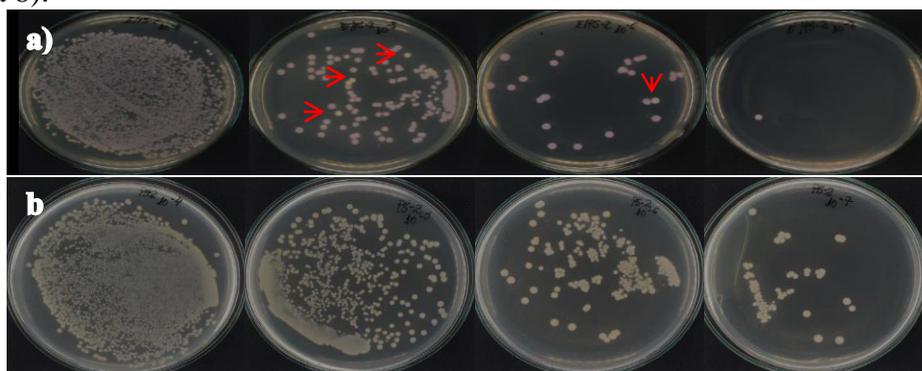


Figura 8: Comparação da morfologia de colônias obtidas após diluições em série. **a)** colônias contendo o plasmídeo pLMB 426 após transformação pela técnica de eletroporação com visualização de coloração vermelha cultivadas em meio TY contendo o antibiótico gentamicina (setas em vermelho indicam contaminantes, células não transformadas); **b)** células selvagem da estirpe BR 10268 cultivadas em meio TY sem antibiótico.

A dinâmica temporal da colonização endofítica dos segmentos de gema e raiz pela estirpe BR 10268 marcada com gene de fluorescência foi avaliada aos 3 e 8 DAI, utilizando a CLSM. Por meio desta análise, imagens de seções transversais de z-stacks e cortes ortogonais foram obtidas em tempo real. Para os cortes de lâminas realizadas com as plântulas do controle (plantas inoculadas com a estirpe selvagem) em ambos os dias, não ocorreu qualquer atividade de fluorescência nos segmentos analisados, quando foram submetidos a excitação com lasers a 555 nm (Figura 9 b). No entanto gemas de plântulas inoculadas com BR 10268 transformada (células bacterianas marcadas com o gene que codifica a proteína mCherry) foram visualizados colonizando os tecidos internos de cana-de-açúcar (Figura 9 c, d, e, f). Para o segmento de gema aos 3 DAI, as amostras analisadas mostravam unidades e agregados de bactérias, colonizando os tecidos internos de cana-de-açúcar (Figura 9 c, d). Aos 8 DAI a mesma verificação de colonização foi observada, em tecidos semelhantes, sendo possível visualizar números maiores de bactérias colonizando os tecidos (Figura 9 e, f). Após a comparação de imagens obtidas, com imagens ilustrativas dos tecidos internos de cana-de-açúcar, pôde-se identificar que os tecidos colonizados pela estirpe marcada eram: o protoxilema (vaso do xilema) e espaços intercelulares para o segmento de gema. Para o segmento de raiz foram encontradas colônias e poucos agregados de bactérias no tecidos internos, a visualizações obtidas não permitiram interir se a colonização das estirpe estava sobre a superfície dos espaços intercelulares (dados não mostrados).

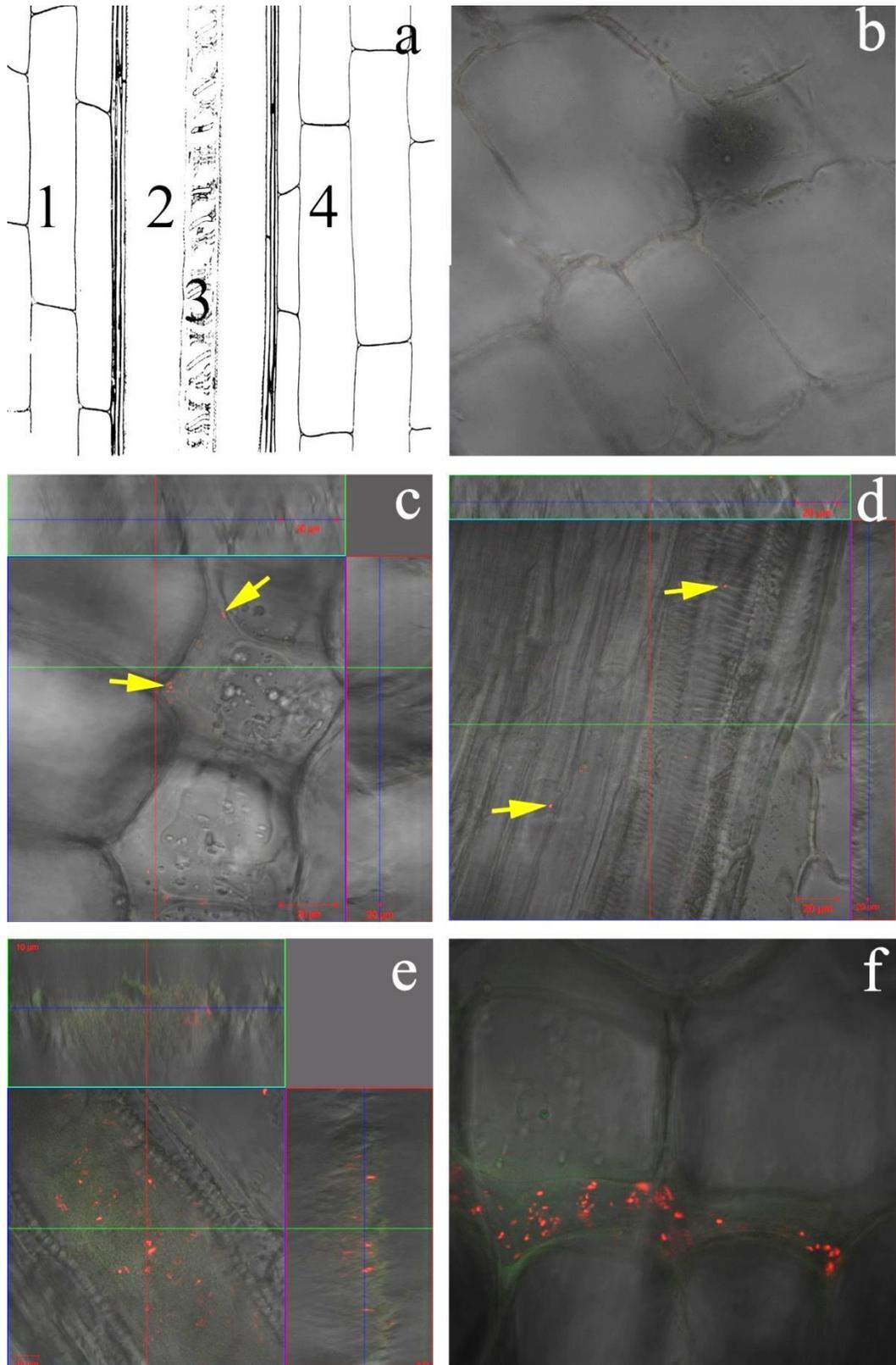


Figura 9: Análises de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) da estirpe BR 10268 transformada com o plasmídeo pLMB 426 (mCherry). Imagens mostram a colonização da estirpe nos tecidos internos de gema de cana-de-açúcar em corte longitudinal a) imagens ilustrativas dos tecidos internos de gema de cana-de-açúcar: 1 e 4: protoxilema, 2: vaso do metaxilema, 3: vaso do protoxilema (Adaptado de CLEMENTS, 1980); de tecidos internos de gema inoculada com estirpe selvagem: b) segmento de gema inoculado com estirpe selvagem; c e d) 3 DAI (espaço intercelular e vaso do protoxilema, respectivamente); e, f) 8 DAI (vaso do protoxilema e espaço intercelular, respectivamente).

6 DISCUSSÃO

6.1 Análise filogenética da estirpe BR 10268

A estirpe de *Rhizobium* (BR 10268) em estudos anteriores no trabalho de ROUWS et al. (2013), foi caracterizada com base na filogenia do gene 16S rRNA (número de acesso GenBank KF113080), sendo posicionada próximo à espécie *Rhizobium miluonense* CCBAU 41251^T (GU et al., 2008) e *Rhizobium tropici* CIAT 889^T (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991). Embora a análise do gene 16S rRNA seja uma ferramenta útil para filogenia de organismos procariotos, diversos estudos demonstram que o gene 16S de rRNA pode não refletir com precisão a filogenia procariótica, uma vez que espécies intimamente relacionadas nem sempre podem ser distinguidas devido ao alto nível de conservação da sequência e também pela transferência lateral e recombinação genética, resultando em mutação de sequência (MARTENS et al., 2007).

A filogenia da estirpe em estudo foi baseada em análises de sequências dos genes *housekeeping glnII* e *recA* , estes genes são marcadores filogenéticos denominados de genes alternativos ou de manutenção suficientemente conservados para reter o sinal filogenético e que possuem um maior nível de divergência de seqüências que os genes rRNA (MARTENS et al., 2007). No presente estudo as análises filogenéticas de ambos os genes demonstraram topologias das árvores congruentes entre si, ou seja, os resultados de cada um dos genes refletiram o posicionamento filogenético da estirpe de forma similar. Para ambos os genes a estirpe foi agrupada em um único grupo bastante coeso contendo cinco espécies, indicando o posicionamento da estirpe mais próximo de um grupo de *Rhizobium* spp. já descritos como simbióticos de leguminosas. Esses resultados indicam que a estirpe teve um mesmo padrão evolutivo dessas espécies, mas com características genéticas insuficientes para ser diferenciada destas espécies.

A utilização de genes *housekeeping* foi essencial para o entendimento do posicionamento filogenético da estirpe, sugerindo que a estirpe possivelmente pertence a uma destas cinco espécies. Uma vez que para ambos os genes o clado possui valores de bootstrap baixos, o que não permite inferir a que espécie esta pertence neste grupo composto por cinco espécies, o que se pode pressupor é que a estirpe de *Rhizobium* (BR 10268) não é uma nova espécie do gênero *Rhizobium*.

6.2 Promoção de crescimento vegetal de sementes de arroz e mini-toletes e após inoculação da estirpe BR 10268

O efeito da inoculação de microrganismos no crescimento de plantas em especial para promover o seu desenvolvimento da parte aérea e sistema radicular é comparado a capacidade de que estes possuem em produzir e excretar diversos hormônios vegetais (GLICK, 2012). O presente trabalho sugere a promoção de germinação de sementes de arroz e aceleração da brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar promovido pela inoculação da estirpe BR 10268. Neste estudo os resultados de análises de (CG-MS/SIM) realizado com o sobrenadante da estirpe indicaram a presença de fitohormônios vegetais (ácido indol-3-acético (AIA), citocinina (CK) e giberelinas (GAs).

A produção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal faz parte do metabolismo da maioria dos gêneros bacterianos, sendo que a grande maioria de espécie rizosférica e endofítica são capazes de produzir substâncias promotoras de crescimento de plantas dentre estas substâncias a mais relatada e de maior efeito no crescimento das plantas associadas às bactérias são as auxinas (CASSÁN et al., 2014). Entre os efeitos associados do ácido indol-3-acético à planta, destacam-se à divisão celular, o alongamento dos colmos e

principalmente o desenvolvimento do sistema radicular, contribuindo para absorção de água e nutrientes pelas plantas e conseqüentemente maior acúmulo de biomassa (SPAEPEN et al., 2009). A citocinina está envolvida ou têm efeitos na diferenciação celular, atividades enzimáticas, desenvolvimento de frutos e hidrólise das reservas de sementes, alongamento, crescimento e desaceleração da senescência foliar (KUREPIN; PHARIS, 2014). As giberelinas controlam vários processos para o desenvolvimento da planta atuando na germinação de sementes, mobilização de reservas armazenadas no endosperma, florescimento, controle do alongamento e divisão celular, principalmente no desenvolvimento das brotações das plantas (HELDEN; SPONSE, 2015).

A giberelina foi o regulador de crescimento mais adundantemente produzido pela estirpe. Neste estudo acredita-se que o regulador de crescimento vegetal envolvido diretamente na germinação do arroz e aceleração da brotação de mini-toletes foi ocasionada por este fitohormônio. Uma vez que sua ação está relacionada ao crescimento do broto de vegetais. Entre as diversas GAs já identificadas em plantas, fungos e bactérias até o momento, apenas um subconjunto é biologicamente ativo: GA₁, GA₃, GA₄ e GA₇ e que as demais são precursoras das formas bioativas ou metabólitos desativados (HELDEN; SPONSE, 2015). Entre os 7 subconjuntos de giberelina produzidos pela estirpe os 4 acima citados foram produzidos pela estirpe.

Para o ensaio de arroz a inoculação da estirpe BR 10268 com densidades de células ativas não foi capaz de promover o aceleração da germinação das sementes. Apenas o uso do sobrenadante da estirpe promoveu efeito na promoção de crescimento vegetal em sementes de arroz. Possivelmente a disponibilidade de reguladores de crescimentos vegetais obtidos na solução foram rapidamente assimilados pela planta e utilizados para seu crescimento uma vez que o ensaio foi conduzido em condições axênicas e sem a disponibilidade de nutrientes para a planta. RASTOGI et al. (2013) verificaram combinações de dois hormônios de crescimento de plantas, auxina e ácido giberélico e seu efeito no rendimento em "Neelam" verificaram que as maiores concentrações de ambos os hormônios de crescimento foram menos eficazes em comparação com concentrações mais baixas, e mostraram crescimento vegetativo melhorado em comparação ao controle.

Possivelmente o efeito negativo da resposta da inoculação de sementes de arroz com a cultura da estirpe BR 10268 podem está relacionado a dois fatores: os mecanismos de defesa da planta reconheceram a estirpe como um patógeno de planta impedindo a entrada e a infecção da estirpe dentro da semente de arroz onde a planta se defendeu contra o potencial microbiano, ou o efeito negativo da resposta da planta após inoculação de microrganismos pode está diretamente relacionada ao equilíbrio hormonal de reguladores de crescimento pela planta onde talvez a estirpe estivesse metabolizando quantidades elevadas de fitohormônios vegetais. Para verificação destes fatores ensaios relativos a concentração bacteriana e dosagens de fitohormônios vegetais precisariam ser realizados para melhores esclarecimento sobre os possíveis efeitos. Todavia os resultados indicam que a promoção de crescimento vegetal de sementes de arroz, foi diretamente relacionada pela ação dos reguladores de crescimento vegetais contidos no sobrenadante da cultura, uma vez que os valores de crescimento de comprimento de parte aérea foi estatisticamente semelhante ao tratamento com GA sintético em comparação com o controle negativo.

Os testes de inoculação *in vitro* realizados com mini-toletes de cana-de-açúcar neste trabalho corroboram com os resultados encontrados por MATOS (2017), sendo verificado o efeito da promoção de crescimento do broto de plantas inoculadas com a estirpe BR 10268 quando comparadas com o tratamento não inoculado. HUMPHRY et al. (2007) analisando o sobrenadante de cultivo do *Rhizobium radiobacter*, detectaram a presença de ácido giberélico e ausência de ácido indolacético, testando a inoculação desta estirpe em cevada, ocorreu a estimulação do broto. MATOS (2017) ao trabalhar com a estirpe em estudo em condições de

casa de vegetação, observou aumento da velocidade de brotamento das gemas de cana-de-açúcar inoculadas, porém o mesmo não conseguiu identificar qual seria o possível mecanismo promotor desse efeito.

O presente trabalho após comprovação de produção de fitohormônios vegetais sugere que o mecanismo promotor da aceleração de mini-toletes de cana-de-açúcar é ocasionado pela produção reguladores de crescimento vegetal produzidos pela estirpe. Os efeitos proporcionados pela inoculação da estirpe endofítica BR 10268 no aceleração de broto de cana-de-açúcar é promissor, em especial, quando associado ao sistema MPB (LANDELL et al., 2012), que preconiza a formação de mudas mais vigorosas, uniformes e com gemas de maior qualidade, livres de patógenos. Além disso a inoculação da estirpe, pode diminuir o tempo de viveiro das mudas e assim favorecer a rápida adaptação e diminuição do tempo de viveiro através do brotamento imediato e eficaz das mudas de cana-de-açúcar na fase inicial de crescimento antes da introdução em campo.

6.3 Nicho de colonização endofítica

No intuito de verificar a interação da estirpe com planta, realizou-se a quantificação e verificação dos padrões de colonização da estirpe em estudo. Para isto inicialmente analisou-se a densidade bacteriana e posterior colonização nos tecidos internos da cultura, utilizando a metodologia de recuperação de células e visualização de bactérias vivas em CLSM. Os resultados para recuperação de células demonstraram que a estirpe exibiu um comportamento diferenciado de densidade celular nos segmentos avaliados em ambas datas de coleta (7 e 20 DAI).

A estirpe não pode ser reisolada do segmento de parte aérea, em nenhum ponto de coleta avaliado. Neste estudo não foi possível identificar o motivo da não quantificação da estirpe neste segmento. Porém três hipóteses podem ser sugeridas: a) as densidades de células contidas neste segmento eram baixas e após diluição no processo de trituração e diluição em série/células não poderiam ser encontradas nos níveis de diluições estabelecidos; b) a estirpe coloniza os tecidos de parte aérea, porém a realização de contagem ocorreu antes da migração e colonização sistêmica da estirpe neste segmento; c) a estirpe não coloniza o tecido interno de parte aérea de cana-de-açúcar. Todavia, densidades de células foram encontradas para o tecido de gema e raiz, respectivamente de 10^7 até 10^5 , no início da inoculação.

Diversos trabalhos indicam que o principal nicho de colonização das bactérias endofíticas é a raiz, devido a presença de altos níveis de nutrientes na rizosfera e no rizoplane, os quais podem ser utilizados para o crescimento e metabolismo bacterianos (KANDEL et al., 2017, COMPANT et al., 2008, OLIVEIRA et al., 2009). Logo os resultados destes estudos indicam que as maiores densidades de células encontradas para o segmento de gema é devido a ausência de nutrientes no substrato estéril indicando que a gema é a principal fonte de energia para a bactéria no início de sua colonização quando testada em condições axênicas. A capacidade de colonização de tecidos pelos microrganismos endofíticos está relacionada a diversos fatores que vão desde sua entrada, crescimento e multiplicação.

O primeiro passo para a colonização endofítica é o encontro da bactéria com a planta hospedeira. Diversos trabalhos evidenciam que as raízes podem liberar exsudatos que possuem substratos onde podem ocasionar o início da comunicação química entre a planta e o hospedeiro (KANDEL et al., 2017). Após esse reconhecimento os endófitos podem penetrar o tecido vegetal por diversas portas de entrada: aberturas nas raízes no ato da emergência, assim como estômatos, feridas e hidatódios na parte aérea são considerados os principais pontos de entrada que os endofíticos usam para entrar na planta hospedeira (HARDOIM et al., 2015). Estudos utilizando a desinfestação superficial de tecido externos de vegetais e uso de dados moleculares para identificar microrganismos não cultiváveis têm sido uma prática

utilizada para identificar microrganismos endofíticos, porém a microscopia é a ferramenta final utilizada para a confirmação da colonização tecidual por endófitos (GYANESHWAR et al., 2001; COMPANT et al., 2008, 2011)

Atualmente a uma das técnicas mais utilizadas é a marcação de microrganismo com gene de fluorescência que possibilita o monitoramento de organismos aplicados externamente (COMPANT et al., 2008 ; PRIETO et al., 2011). Após evidências da colonização endofítica da estirpe BR 10268 nos tecidos internos de mini-toletes de cana-de-açúcar pelo método de recuperação de células. Segmentos frescos de plântulas inoculadas com o gene repórter mCherry, foram analisadas por CLSM, somente para o segmentos de gema e raiz após resultados da recuperação de células selvagem.

A colonização foi observada no espaço intercelular e vaso do protoxilema no tecido de gema. Este resultado corroboram com a colonização apoplástica normalmente descrita, composta pelos espaços intercelulares, xilemas e interconexões vasculares (SATTELMACHER, 2001). Alguns estudos indicam que seja provável que as bactérias migraram dos espaços intercelulares frouxos nas raízes para a região estreita da parede intracelular nos brotos através das lacunas ou através das interconexões vasculares ocorrendo a colonização de forma sistemática (SATTELMACHER, 2001).

Estudos que empregam endófitos marcados fluorescentemente têm mostrado pelos radiculares como o principal ponto de entrada com posterior colonização nos espaços intercelulares do vegetal e que o movimento a colonização conseqüentemente é através do xilema, atingindo várias partes e órgãos da planta (GYANESHWAR et al. 2001; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; COMPANT et al., 2008, 2011). Ao contrário dos estudos citados acima, no presente trabalho não foram as visualizadas bactérias colonizando abundantemente a raiz, onde unidades ou agregados encontrados não pareciam está dentro dos tecidos internos da membrana e sim colonizando os tecidos extracelular (dados não mostrados), levando-se a considerar que talvez o principal nicho de colonização da estirpe após entrar na célula seja o segmento da gema.

A detecção de bactérias no tecido da gema assume maior importância, pois o tecido de gema contribui para a perpetuação do hospedeiro quando existe baixas disponibilidade de nutriente. Este estudo faz um avanço significativo na forma de elucidar a abundante colonização da estirpe nos tecidos internos da cultura indicando que a mesma se torna um microrganismo integral da cultura da cana.

7 CONCLUSÕES

- A estirpe *Rhizobium* sp. (BR 10268), possui relação filogenética com estirpes de *Rhizobium* já existentes que nodulam leguminosas, indicando que a mesma não é uma nova espécie.
- A inoculação da estirpe de *Rhizobium* sp. (BR 10268) promove o aceleração da brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar cv. RB867515.
- O sobrenadante da estirpe BR 10268, contendo os fitohormônios abaixo-mencionados, promoveu a germinação de sementes de arroz, porém a inoculação da estirpe com densidade de células ativas não proporcionaram o mesmo efeito sobre a germinação de arroz sob as condições testadas.
- A estirpe BR 10268 é capaz de colonizar os tecidos internos da cana-de-açúcar, com densidades de 10^7 e 10^5 UFC/g de tecido fresco de gema e 10^5 e 10^4 UFC/g de tecido fresco de raiz.
- Os reguladores de crescimento vegetais produzidos pela estirpe são giberelinas (GA_1 , GA_3 , GA_4 , GA_7 , GA_9 , GA_{12} e GA_{20}), citocinina e ácido indol-3-acético.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ARRUDA, L.; Beneduzi A.; Martins A.; Lisboa B.; Lopes C.; Bertolo F.; Vargas LK.; Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15- 22, 2013.

ARMANHI, J. S. L.; DE SOUZA, R. S. C.; DAMASCENO, N.B.; DE ARAÚJO, L.M.; IMPERIAL, J.; ARRUDA, P. A community-based culture collection for targeting novel plant growth-promoting bacteria from the sugarcane microbiome. **Front. Plant Sci.** v. 8, p. 2191. 2018.

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

BISHOP, P. E.; GUEVARA, J. G.; ENGELKE, J. A.; EVANS, J. H. Relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between *Rhizobium japonicum* and Glycine max. **Plant Physiology**, Rockville, v.57, p.542-546, 1976. BRASIL. Ministério de agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** 399p. 2009.

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

CASSÁN, F., VANDERLEYDEN, J., SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-bacteria-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **J. Plant Growth Regulat**, v. 33, p. 440-459, 2014.

CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.; BÁ, A.; GILLIS, M.; LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Appl Environ Microbiol.** v. 66, p. 5437–5447. 2000.

CHAVES, V. A.; SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; REIS, V. M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas, **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v.39, p. 1595-1602, 2015.

CLEMENTS, H. F.: Sugarcane crop logging and crop control: Principles and practices. **Universiry Press Hawaii.** Honolulu. 1980.

COMPANT, S.; KAPLAN, H.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; AIT BARKA, E.; CLÉMENT, C. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 63, p.84–93. 2008.

COMPANT, S.; MITTER, B.; COLLI-MULL, J. G.; GANGL, H.; SESSITSCH, A. Endophytes of grapevine flowers, berries and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. **Microbial Ecology**. v. 62, p. 188–197. 2011.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, safra 2017/2018, terceiro levantamento**. Disponível em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_01_08_09_08_38_boletim_cana_dezembro_novo.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2018.

COPLANA PRODUTOR. **MPB. Uma revolução na produção de mudas?** Guariba, n. 83, p. 28. 2013.

DALL'AGNOL, R.F., RIBEIRO, R.A., ORMENO-ORRILLO, E., ROGEL, M.A., DELAMUTA, J.R.M., ANDRADE, D.S., MARTINEZ-ROMERO, E., AND HUNGRIA, M. "*Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* v. 63, 4167-4173. 2013.

DE MARIA, I. C.; DRUGOWICH, M. I.; BORTOLETTI, J. O; VITTI, A. C; ROSSETTO, R; FONTES, J. L.; TCATCHENCO, J.; MARGATHO, S. M. F. **Recomendações gerais para conservação do solo na cultura da cana-de-açúcar**. 1ª ed. Campinas. IAC, 2016. (Boletim Técnico IAC n.216).

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

ESTRADA, G. A.; BALDANI, V. L. D.; DE OLIVEIRA, D. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant and soil**, v. 369, p.115-129, 2013.

FAN, B.; CHEN, X. H.; BUDIARDJO, A.; BLISS, W.; VATER, J.; BORRIS, R. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 4, p. 303-311, 2011.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, **FAOSTATS**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>> Acesso em: 20 nov. 2017.

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

FISCHER, D.; PFITZNER, B.; SCHMID, M.; SIMÕES-ARAÚJO, J.L.; REIS, V. M.; PEREIRA, W.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; HAI, B.; HOFMANN, A.; SCHLOTTER, M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Molecular characterisation of the diazotrophic bacterial community in uninoculated and inoculated field-grown sugarcane (*Saccharum* sp.). **Plant Soil**, v. 356, p. 83–99, 2012.

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

GAMALERO, E.; GLICK, B. R. Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. **Bacteria in Agrobiolgy. Plant Nutrient. Management** ed. Maheshwari D. K. (Heidelberg: Springer). pp. 17–46. 2011.

GAUNT, M. W.; TURNER, S. L.; RIGOTTIER-GOIS, L.; LLOYD-MACGILP, S. A.; YOUNG, J. P. W. Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **Int Jor Syst Evol Microbiol**. v. 51, p. 2037–2048. 2001.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, n. 1, p. 1-15, 2012.

GU, C.T., WANG, E.T., TIAN, C.F., HAN, T.X., CHEN, W.F., SUI, X.H., CHEN, W.X. "*Rhizobium miluonense* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from Lespedeza root nodules." **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v. 58, p. 1364-1368. 2008.

GUTIÉRREZ-ZAMORA, M. L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 117-126, 2001.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E.K.; MATHAN, N.; REDDY, P.M.; REINHOLD-HUREK B.; LADHA, J. K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**. v. 183, p. 2634–2645. 2001.

HAN, T.X., WANG, E.T., WU, J.L., CHEN, W.F., GU, J.G., GU, C.T., TIAN, C.F., AND CHEN, W.X. "*Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China." **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v. 58, p.1693-1699. 2008.

HARDOIM, P.R.; OVERBEEK, L.S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRIN, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.79, n.3, p.293-320, 2015.

HEDDEN, P; SPONSEL, V. A century of gibberellin research. **J. Plant Growth Regul.** v. 34, p. 740–760, 2015.

JADOSKI, C. J.; TOPPA, E. V. B.; RODRIGUES, J. D. Desenvolvimento mofofisiológico de raízes e brotos da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), **Scientia Agraria Paranaense**, v. 11, p. 22-32, 2012.

KANDEL, S. L.; JOUBERT, P. M.; DOTY, S. L. Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. *Microorganisms*. v.5, p. 77.2017.

KUREPIN LV, PHARIS RP. Light signaling and the phytohormonal regulation of shoot growth. *Plant Sci* 2014;v. 229, p. 280–28.

LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, v. 147, n. 4, p. 981-993, 2001.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I.A.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDÓIA, M. A.; SILVA D. N.; MENDONÇA, J. R.; KANTHACK, R. A.D.; CAMPOS, M. F.; BRANCALIÃO, S. R.; PETRI, R. H.; MIGUEL, P.E.M. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**, Campinas: Instituto Agronomico/ Fundação IAC, 2012, 22p. (Boletim 109).

LIU, F. C.; XING, S. J.; MA, H. L.; DU, Z.Y.; MA, B. Y. Plant growth-promoting rhizobacteria affect the growth and nutrient uptake of *Fraxinus americana* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 10, p. 4617-4625, 2013.

MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 *housekeeping* genes in the genus *Ensifer* including former *Sinorhizobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 58, p. 200-214, 2008.

MARTINEZ-ROMERO, E., SEGOVIA, L., MERCANTE, F.M., FRANCO, A.A., GRAHAM, P., PARDO, M.A. "*Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees." *Int. J. Syst. Bacteriol.* (1991) 41:417-426.

MARTENS, M., DELAERE, M., COOPMAN, R., DE VOS, P., GILLIS, M. & WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int J Syst Evol Microbiol.* (2007). 57, 489–503.

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

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

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *Eur. J. Soil Biol.* v. 45,p. 106–113.2009.

PRIETO, P.; SCHILIRO, E.; MALDONADO-GONZALEZ, M.M.; VALDERRAMA, R.; BARROSO-ALBARRACIN, J. B.; MERCADO-BLANCO, J. Root hairs play a key role in the endophytic colonization of olive roots by *Pseudomonas* spp. with biocontrol activity. *Microbial Ecology*. v. 62, p. 435–445. 2011.

RASTOGI, ANU, SIDDIQUI, AMENA, MISHRA, SR BRIJ, SRIVASTAVA, MRINALINI, PANDEY, RAWLI, MISRA, PRATIBHA, SINGH, MUNNA, & SHUKLA, SUDHIREfeito da auxina e do ácido giberélico no crescimento e nos componentes da linhaça (*Linum usitatissimum* L.). Criação de Culturas e Biotecnologia Aplicada , 13 (2), 136-143. . (2013).

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; URQUIAGA, S. **Recomendação de uma mistura de estirpes de cinco bactérias fixadoras de nitrogênio para inoculação de cana-de-açúcar: *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR 11281), *Herbaspirillum seropedicae* (BR 11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR 11504), *Azospirillum amazonense* (BR 11145) e *Burkholderia tropica* (BR 11366)**. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2009. 4p. (Embrapa Agrobiologia. Circular Técnica 30. ISSN 1519-7328).

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**.v.19, p.827–837.2006.

ROUWS, L. F. M.; HEMERLY, A. S.; BALADANI, J. I. **Transformação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL pela técnica de eletroporação**. SEROPÉDICA-RJ: Embrapa Agrobiologia, 4 p. 2006. (Comunicado técnico, 84).

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

SALLA, D. A. **Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca, cana-de-açúcar e milho**. 168 f. 2008 Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciência Agrônômicas de Botucatu. 2008.

SATTELMACHER B. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. **New Phytologist**. v. 149,p.167–192. 2001.

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

SILVA, M. F. **Uso de inoculante polimérico contendo bactérias diazotróficas na cultura de cana-de-açúcar**. 80f. 2009. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2009.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y.; **Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria**. In: VAN LOON, L. C. (Ed.). *Advances in Botanical Research*, Burlington: Academic Press, v. 51, p.283-320, 2009.

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

VARGAS, L.; DE CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I.; HEMERLY, A. S. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 127-137, 2012.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJIN F.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in molecular and cellular biology**. v. 5, p. 25-40, 1994.

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

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

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**. v.173, n°2, p.697-703, 1991.

XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; MENDONÇA, J. R.; DINARDO-MIRANDA, L. L. SCARPARI, M. S; GARCIA, J. C.; ANJOS, I. A.; AZANIA, C. M; BRANCALIAO, C A; KANTHACK, R.A.D.; AFERRI,G.; SILVA, D.N.; BIDÓIA, M. A.; CAMPOS, M. F.; PERRUCCO, D.; MATSUO, R. S.; NEVES, J. T. N.; CASSANELI JUNIOR, J. R.; PERRUCCO, R.; PETRI, R. H.; SILVA, T. N.; SILVA, V. H. P.; THOMAZINHO JUNIOR, J. R.; MIGUEL, P. L. M.; LORENZATO, C. M. **Fatores de Desuniformidade e Kit de Pré-Brotção IAC para Sistema de Multiplicação de Cana-de-Açúcar – Mudas Pré-Brotadas (MPB)**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2014. 22 p; (Documentos IAC, n.º 113).

XAVIER, M.A.; LANDELL, M.G.A.; TEIXEIRA, L.G., RODRIGUES, P.A.; NASSIF, G.L.; MINE, K. Sistema de multiplicação MPB e integração com o setor sucroenergético. **O Agrônômico**, v.64-66, p.32- 41, 2014.

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

9 ANEXOS

1. MEIOS DE CULTURAS

1.1 YMA (VICENT, 1970)

- 1mL K_2HPO_4 (10 % P/V)
- 4 mL KH_2PO_4 (10 % P/V)
- 2 mL $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (10 % P/V)
- 1 mL NaCl (10 % P/V)
- 10 g Manitol
- 0,4 g Extrato de Levedura

O pH foi ajustado para 6,8-7,0 com solução de KOH a 10% e/ou solução de H_2SO_4 a 5%. Para o meio sólido, foi adicionado 15g. L^{-1} de ágar bacteriológico e 5 mL do corante azul de bromotimol.

1.2 TY (VICENT, 1970)

- 5 g de Triptona
- g de Extrato de Levedura
- 0,9 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

O pH foi ajustado para 6,8, 7,0 com solução de KOH a 10% e/ou solução de H_2SO_4 a 5%. Para o meio sólido, foi adicionado 15 g. L^{-1} de ágar bacteriológico.

1.2 RDM modificado (BISHOP et al., 1976)

- 1 g K_2HPO_4
- 1 g KH_2PO_4
- 0,11 g NH_4Cl
- 0,25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 0,25 g NaCl
- 0,025 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
- 2 mL solução de EDTA de Ferro (1,64 % P/V)
- 0,002 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- 2 mL solução de micronutrientes ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, $MnSO_4 \cdot H_2O$, $H_3B_3O_3$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).
- 1 mL solução de vitamina (Biotina, Pyridoxol-HCL)
- 50 g Manitol
- O pH foi ajustado para 6,8-7,0 com solução de KOH a 10% e/ou solução de H_2SO_4 a 5%.