

# VARIABILIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ASSOCIADAS A PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR CAPAZES DE SOLUBILIZAR FOSFATO INORGÂNICO

## GENETIC VARIABILITY OF SUGARCANE-ASSOCIATED DIAZOTROPHIC BACTERIA CAPABLE OF INORGANIC PHOSPHATE SOLUBILIZING

**Luana LIRA-CADETE<sup>1</sup>, Andreza Raquel Barbosa de FARIAS<sup>1</sup>, Andresa Priscila de Souza RAMOS<sup>2</sup>, Diogo Paes da COSTA<sup>3</sup>, Fernando José FREIRE<sup>4</sup>, Júlia KUKLINSKY-SOBRAL<sup>5</sup>**

1. Acadêmicas do curso de Agronomia, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UAG/UFRPE), Garanhuns, PE, Brasil. [luanalirac@gmail.com](mailto:luanalirac@gmail.com); 2. Professora, Mestre, UAG/UFRPE, Garanhuns, PE, Brasil; 3. Mestrando do curso de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil; 4. Professor, Doutor, Departamento de Agronomia, UFRPE, Recife, PE, Brasil; 5. Professora, Doutora, UAG/UFRPE, Garanhuns, PE, Brasil.

**RESUMO:** A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância agrícola, nacional e mundial, requerendo grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados e fosfatados. Além disso, apresenta associação com bactérias que podem promover o desenvolvimento vegetal. O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias diazotróficas, associadas a plantas de cana-de-açúcar, capazes de solubilizar fosfato inorgânico e avaliar a variabilidade genética bacteriana. Para tanto, foram avaliadas 68 linhagens bacterianas diazotróficas, endofíticas de folha e raiz e do rizoplano, de plantas de três variedades de cana-de-açúcar. A seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico foi realizada em meio sólido suplementado com fosfato insolúvel, sendo avaliado o índice de solubilização. A análise da variabilidade genética foi realizada pela técnica de BOX-PCR. Os resultados revelaram que 74% das linhagens diazotróficas foram capazes de solubilizar fosfato, apresentando índices de solubilização diferentes. Foi observado que o tecido vegetal e a variedade de cana influenciaram a interação entre bactérias diazotróficas solubilizadoras de fosfato e plantas de cana. O BOX-PCR revelou alta variabilidade genética entre as linhagens analisadas. Logo, conclui-se que as bactérias diazotróficas associadas a plantas de cana-de-açúcar avaliadas expressam a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico e que algumas bactérias avaliadas pela técnica de BOX-PCR apresentam alta variabilidade genética.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactérias endofíticas. Fixação de nitrogênio. *Saccharum* spp.

## INTRODUÇÃO

Alguns micro-organismos, principalmente as bactérias, apresentam a capacidade de se associar às plantas e estimular o desenvolvimento destas. Essas bactérias podem se desenvolver no interior do hospedeiro, passando a ser chamadas de endofíticas, ou na parte externa, as chamadas epifíticas. Bactérias benéficas, endofíticas e epifíticas, podem ser encontradas habitando diversos nichos associados aos vegetais, onde os mais comuns são a rizosfera, rizoplano, raízes, caules e folhas (HARDOIM et al., 2008; HALLMANN et al., 1997; COMPANT et al., 2010). O estímulo ao desenvolvimento da planta, por algumas espécies de bactérias, pode ser realizado através da disponibilização de nutrientes, como o fósforo, pela sua solubilização, e o nitrogênio, pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico (HARDOIM et al., 2008; BERG et al., 2009; COMPANT et al., 2010).

Atualmente, a cana-de-açúcar é cultivada em quase todos os estados brasileiros, com rendimento médio de 80 ton/ha e uma produção

total de 690 milhões de toneladas, na safra 2009/2010 (IBGE, 2010). Essa cultura apresenta-se com alta capacidade extratora, retirando do solo quantidades de nitrogênio maiores do que as habitualmente são fornecidas nas adubações. Esse processo pode ser explicado pela fixação biológica de nitrogênio (FBN) (BODDEY et al., 2003). Neste contexto, estudos conduzidos com inoculantes bacterianos têm apontado contribuições em torno de 60% para o nitrogênio fixado biologicamente no cultivo da cana (POLIDORO et al., 2001).

Além do nitrogênio, a cultura da cana requer grande quantidade de fertilizante fosfatado, devido as características dos solos em que são cultivadas (SIMÕES NETO et al., 2009), sendo este elemento um dos mais limitantes para o desenvolvimento dos vegetais, mesmo se adicionado como fertilizante químico, pois pode se tornar rapidamente indisponível, principalmente em solos mais intemperizados (CANBOLAT et al., 2006 ; GYANESHWAR et al., 2002).

Portanto, torna-se importante a bioprospecção de isolados bacterianos com potencial para promover o desenvolvimento vegetal,

que atuam com eficiência na solubilização de fosfato, contribuindo para um manejo sustentável da cana-de-açúcar. Contudo, além do conhecimento dos mecanismos fenotípicos de interação bactéria-planta, é crucial o conhecimento da diversidade genética das bactérias, contribuindo para a utilização das mesmas como insumos biológicos para promoção do desenvolvimento vegetal das culturas agrícolas. Neste aspecto, as técnicas de biologia molecular têm contribuído para o conhecimento da variabilidade genética desses micro-organismos e do potencial biotecnológico a ser explorado (LEE; WONG, 2009; MARQUES et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias diazotróficas associadas a variedades de cana-de-açúcar, cultivadas em Pernambuco, capazes de solubilizar fosfato inorgânico, *in vitro*, e avaliar a sua variabilidade genética através da técnica de BOX-PCR.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Linhagens bacterianas

Foram avaliadas 68 linhagens bacterianas diazotróficas, sendo 26 do rizoplano, 28 endofíticas de folha e 14 endofíticas de raiz, oriundas de plantas de três variedades de cana-de-açúcar (RB92579, RB867515 e RB863129), cultivadas na Usina Petribú Ltda., situada no município de Lagoa de Itaenga, PE. As linhagens pertencem à coleção de culturas microbianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE).

### Seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico *in vitro*

A seleção de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico foi realizada segundo metodologia descrita por Verma et al. (2001), com algumas modificações. As bactérias foram inoculadas em placas contendo meio de cultura sólido acrescido de fosfato insolúvel, tendo como fonte fosfato de cálcio bibásico. A seguinte formulação compõe o meio de cultura: 10g/L de glicose; 5g/L de NH<sub>4</sub>Cl; 1g/L de NaCl; 1g/L de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 4g/L de CaHPO<sub>4</sub>; 15g/L de agar; pH7,2, e em seguida incubadas a 28°C por 72h. Os experimentos foram realizados em triplicatas e a presença de halo translúcido em torno da colônia indicou a solubilização do fosfato, indicando a atuação de enzimas fosfatases, excretadas pelo metabolismo bacteriano, que acidificam o meio de cultura convertendo o fosfato de cálcio em íons solúveis (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> e HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) (TAURÍAN et al.,

2010). Os índices de solubilização (IS), método semi-quantitativo, foram obtidos a partir da razão do diâmetro do halo de solubilização (ØHS) pelo diâmetro da colônia (ØC) por meio da fórmula: IS=ØH / ØC. As linhagens foram classificadas em três grupos em relação ao índice de solubilização: BAIXO (IS < 2); MÉDIO (2 ≤ IS < 4); e ALTO (IS > 4) (BERRAQUERO et al., 1976).

Os dados dos índices de solubilidade foram transformados em raiz de x+1 para atender aos requisitos estatísticos e submetidos a análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas através do teste de Scott-Knott (P<0,05), pelo o software estatístico SISVAR® versão 5.3.

### Análise da diversidade genética bacteriana por meio de BOX-PCR

As linhagens foram cultivadas em meio líquido TSA (*Trip-case Soy Agar*), a partir de colônias isoladas, mantidas sob agitação constante de 120 rpm por 24 horas, a temperatura de 28°C. Quatro mililitros da cultura bacteriana foram centrifugados, a 12000 g por 5 min, para precipitação das células bacterianas, sendo descartado o sobrenadante. O precipitado celular foi ressuspenso em 200µL de TE (10 mM de Tris-HCl; pH 8,0) e submetido à extração de DNA.

O DNA genômico bacteriano foi extraído com a utilização do Genomic DNA Purification Kit (Fermentas), de acordo com a metodologia do protocolo recomendado pelo fabricante. A reação de PCR foi realizada com o *primer* BOX-A1R (5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), em um volume final de 25 µL contendo 0,5 a 10 ng de DNA molde; 1 µM do primer; 0,6 mM de cada dNTPs; 7,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 0,08 U da enzima Taq DNA polimerase em 20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl. A reação foi realizada em termociclador programado para realizar uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 2 min, anelamento a 50°C por 1 min e extensão de primer a 65°C por 2 min, seguida de extensão final a 65°C por 10 min. Após a amplificação, a reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1,5% p/v) em tampão 1x TAE (40 mM de Tris-acetato; 1 mM de EDTA) e corado com *Blue green loading dye*, segundo as especificações do fabricante. A observação foi realizada sobre luz ultravioleta no transluminador horizontal e fotodocumentado.

Os perfis de bandas observados foram transformados em uma planilha binária e em seguida utilizados para obter um dendrograma de similaridade calculado através do Coeficiente de Jaccard e agrupado utilizando o algoritmo UPGMA

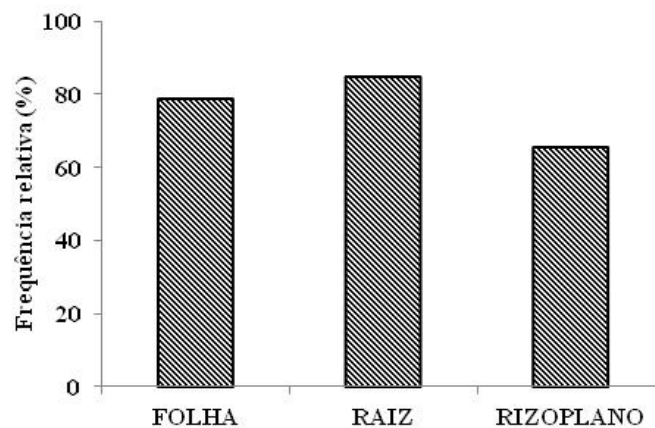
(*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*), utilizando o software PAST versão 1.90.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos estudos foram realizados com bactérias solubilizadoras de fosfato (GYANESHWAR et al., 2002; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; DIAS et al. 2009), para avaliar a capacidade destes isolados de interagir com as plantas e promover seu desenvolvimento, no entanto, diversos fatores interferem na interação, como por exemplo, o genótipo do hospedeiro, nicho, idade do mesmo, entre outros (COMPANT et al., 2010).

Das linhagens avaliadas, 75% apresentaram capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*. Foi observado que a raiz foi o nicho que apresentou

maior frequência de linhagens solubilizadoras de fosfato, acima de 84%, seguido da folha e rizoplane (Figura 1). Avaliando-se o IS apenas das bactérias solubilizadoras, foi observado que 36% foram classificadas com médio IS e linhagens de baixo e alto IS com 24% e 15%, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os verificados por Alam et al. (2002), que isolaram bactérias solubilizadoras de fosfato isoladas da rizosfera de variedades de milho e encontraram maior frequência de linhagens com médio índice de solubilização. A cana-de-açúcar, pertence a família Poaceae, assim como o milho, e possui forte interação com bactérias capazes de solubilizar fosfato, uma vez que todos os nichos estudados apresentaram uma frequência de linhagens solubilizadoras, como no presente trabalho.



**Figura 1.** Frequência relativa de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fosfato inorgânico isoladas do rizoplane e endofíticas de folha e raiz de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco.

Taurian et al. (2010) estudaram 433 isolados bacterianos endofíticos e epifíticos isolados de amendoim e observaram que 35% foram capazes de solubilizar fosfato *in vitro*. Naik et al. (2008) testaram 443 linhagens do gênero *Pseudomonas* isoladas de banana e arroz, destas apenas 18% se mostraram capazes de solubilizar fosfato *in vitro*. Comparando com os resultados do presente trabalho, a proporção de bactérias capazes de solubilizar fosfato, encontradas na cana, foi bem maior do que a dos referidos trabalhos, confirmando mais uma vez a forte interação que a cana-de-açúcar apresenta para as condições estudadas e para estas variedades, com bactérias solubilizadoras de fosfato.

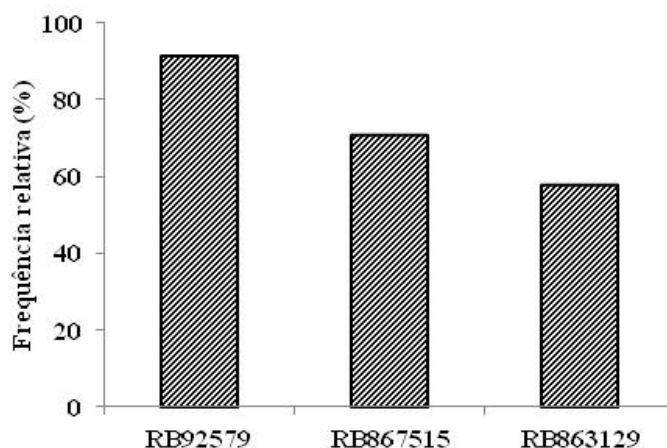
Quanto às variedades de cana-de-açúcar, foi observado maior frequência de bactérias solubilizadoras associadas à variedade RB92579, com 92% das suas linhagens apresentando capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, seguido da variedade RB 867515 e RB863129, com

71% e 58% das suas linhagens positivas para a solubilização de fosfato, respectivamente (Figura 2).

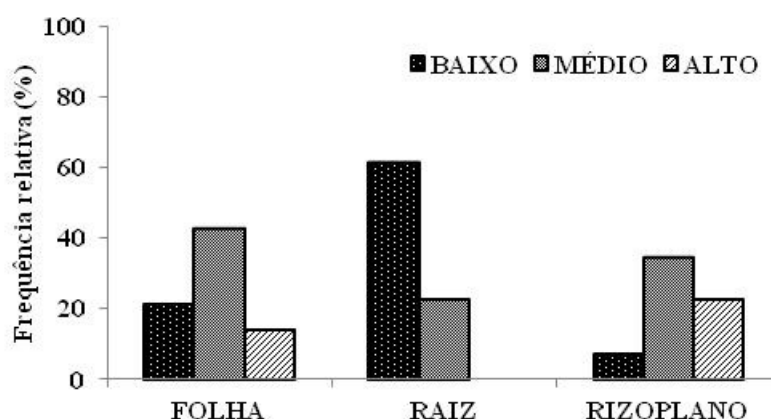
Verificando os índices de solubilização (IS) em relação do nicho, as linhagens foram classificadas em grupos, sendo  $IS < 2$  classificado como potencial baixo,  $2 \leq IS < 4$ , classificado como potencial médio e  $IS > 4$  como alto potencial de solubilização em meio sólido. O nicho rizoplane foi o que proporcionou maior frequência de bactérias que apresentaram alto índice de solubilização, enquanto que os nichos folha e raiz apresentaram maior frequência de bactérias que apresentaram IS médio (Figura 3).

Silva Filho et al. (2002) recomendam que a linhagem ideal para ser usada em programas de manejo com inoculação microbiana, deve apresentar diversas características benéficas, como a fixação biológica de nitrogênio e altas taxas de solubilização de fosfato, pois quanto maior a capacidade de solubilização da linhagem utilizada como

inoculante, maior será a quantidade de nutrientes disponibilizado para a cultura.



**Figura 2.** Frequência relativa de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fosfato inorgânico isoladas de três variedades cana-de-açúcar (RB92579, RB867515 e RB863129) cultivadas em Pernambuco.



**Figura 3.** Frequência relativa de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fosfato inorgânico isoladas do rizoplano e endofíticas de folha e raiz de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco, agrupadas quanto ao índice de solubilização como: Baixo ( $IS < 2$ ), Médio ( $2 \leq IS < 4$ ) e Alto ( $IS > 4$ ).

As bactérias, incluindo as endofíticas, para entrarem em associação com a planta hospedeira e a colonizarem, provavelmente, foram inicialmente colonizadoras da rizosfera, uma vez que as fissuras formadas durante o crescimento radicular são a principal fonte de entrada desses micro-organismos (COMPANT, et al. 2010). Como o sistema radicular é a porta de entrada e nicho preferencial de bactérias associadas às plantas, então é de se esperar que fosse, também na raiz, encontrado a maior frequência de linhagens solubilizadoras de fosfato, no entanto foi o nicho folha que se sobressaiu após o nicho rizoplano, como Kuklinsky-Sobral et al. (2004) que também observaram maior frequência de bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico em

folhas de soja, em relação a raiz e caule.

A análise de variância mostrou que houve interação significativa entre as variáveis: nicho (tecido vegetal) e variedades de cana (Tabelas 1 e 2), e que a variedade não influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) na população de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fosfato. A interação significativa entre nicho e variedade de cana confirmou que fatores como o genótipo do hospedeiro, também como o local do qual as linhagens foram isoladas podem influenciar o comportamento da mesma, como relatado em alguns trabalhos (GYANESHWAR et al., 2002; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; COMPANT et al., 2010).

**Tabela 1.** Análise de variância do índice de solubilização considerando-se o nicho (tecido vegetal) e as variedades de cana.

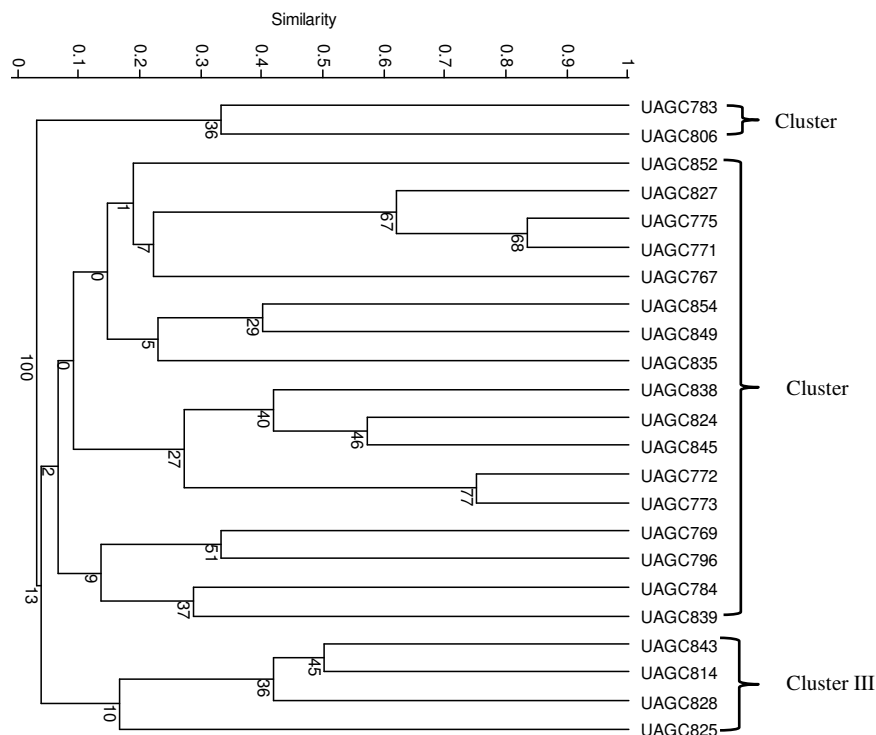
FV	QM	Fc	Pr>Fc
Variedade	0.304	1.387	0.253
Nicho	2.478	11.291	0.000
Nicho*Variedade	0.830	3.782	0.012
CV (%)	25.35		

**Tabela 2.** Média do índice de solubilização de fosfato inorgânico de bactérias diazotróficas isoladas do rizoplano e endofiticamente de folha e raiz de variedades de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco. Valores na mesma linha, seguidos por letras minúsculas iguais, e valores na mesma coluna, seguidos por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Scott-Knott.

NICHOS	VARIEDADES		
	RB92579	RB867515	RB863129
Endofíticas de Folha	3,18 aA	1,52 bB	2,32 aA
Endofíticas de Raiz	0,96 bB	2,11 aA	--
Rizoplano	3,24 aA	3,57 aA	3,51 aA

Das linhagens de bactérias diazotróficas capazes de solubilizar fosfato inorgânico, 23 linhagens foram selecionadas para análise da

variabilidade genética pela técnica de BOX-PCR. A análise do agrupamento (Figura 4).

**Figura 4.** Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) a partir da matriz de similaridade genética entre bactérias fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de fosfato inorgânico associadas a plantas de cana-de-açúcar. O coeficiente de Jaccard foi utilizado para a construção da matriz de similaridade. Os números nos nós do dendrograma indicam o valor da porcentagem de vezes que o grupo ocorreu no mesmo nó durante o *Bootstrap* de 1000 repetições.

O coeficiente de similaridade de Jaccard evidenciou três grupos distintos (*clusters*) com alta variabilidade entre as linhagens, apresentando, no máximo, 83% de similaridade entre poucas linhagens. Contudo, destacam-se os agrupamentos entre as linhagens UAGC775 e UAGC771, que apresentaram o maior grau de similaridade, e entre as linhagens UAGC772 e UAGC773, que apresentaram o segundo maior grau de similaridade, sendo todas isoladas de folhas de plantas da variedade RB92579 de cana-de-açúcar. Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Naik et al. (2008), que encontraram cerca de três *clusters*, com perfis que apresentaram até 80% de similaridade, contudo, apesar dos autores terem avaliado bactérias solubilizadoras de fosfato, essas bactérias foram isoladas em meio específico para *Pseudomoniaceae*, enquanto que no presente trabalho, a seletividade utilizada foi a capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio atmosférico e solubilizar fosfato inorgânico.

## CONCLUSÕES

Os nichos (rizoplano e endofíticas de folha e raiz) influenciaram a frequência de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fosfato associadas a cana-de-açúcar em relação a expressão do índice de solubilização.

A variedade RB92579 de cana-de-açúcar apresentou maior interação com linhagens de bactérias diazotróficas que apresentaram alto índice de solubilização de fosfato.

Bactérias diazotróficas capazes de solubilizar fosfato inorgânico, associadas a plantas de cana-de-açúcar, apresentaram alta variabilidade genética.

## AGRADECIMENTOS

As instituições de fomento FACEPE e CNPq, pelas bolsas e apoio financeiro; e, ao grupo do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana da UAG/UFRPE.

---

**ABSTRACT:** The sugarcane is a culture of great importance for the Brazilian agriculture. Every year this culture consumes great amounts of nitrogen and phosphate fertilizers. However, the use of plant growth-promoting bacteria can reduce the use of the chemical fertilizers, contributing to the economy and the environment conservation. So, the goal of this study was to select sugarcane-associated diazotrophic bacteria able to solubilize inorganic phosphate and to evaluate the genetic diversity of these bacteria. A total of 68 diazotrophic bacteria, leaf and root endophytic and rizoplano, of three sugarcane varieties. The selection of inorganic phosphate solubilizing diazotrophic bacteria was assayed by the solubilization index (SI) in solid medium containing insoluble phosphate. The genetic variability was analyzed by the BOX-PCR technique. The results showed that 74% of the diazotrophic strains were able to solubilize inorganic phosphate, presenting classes of different SI. The results showed that the vegetal tissue and the genotype plant influenced in the interaction between phosphate solubilizing diazotrophic bacteria and sugarcane plants. BOX-PCR revealed high genetic variability among the strains analyzed. So, sugarcane-associated diazotrophic bacteria express the capacity to solubilize inorganic phosphate and they present high genetic diversity.

**KEYWORDS:** Endophytic bacteria. Nitrogen Fixation. *Saccharum* spp.

---

## REFERÊNCIAS

- ALAM, S.; KHALIL, S.; AYUB, N.; RASHID, M. *In vitro* Solubilization of inorganic Phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. **International Journal of Agriculture & Biology**, Faisalabad, v. 4, n. 4, p. 454-458, 2002.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 84, p. 11-18, jul. 2009.
- BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 17, p. 399-406, sep. 1976.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, The Hague, v. 252, p. 139-149, may, 2003.

- CANBOLAT, M. Y.; BILEN, S.; ÇAKMAKÇI, R.; ŞAHIN, F.; AYDIN, A. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, p. 350–357, mar. 2006.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, S.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 669-678, may 2010.
- DIAS, A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPCÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 25, p. 189-195, feb. 2009.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, p. 83-93, aug. 2002.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F., KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895 -914, oct. 1997.
- HARDOIM, P. R.; van OVERBEEK, L. S.; van ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n. 10, p. 463-471, oct. 2008.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro, v. 23 n. 10 p. 1-80, out. 2010.
- KUKLINSKY – SOBRAL, J. ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, dec. 2004.
- LEE, A.; WONG, E. Optimization and the Robustness of BOX A1R PCR for DNA Fingerprinting Using Trout Lake *E. coli* Isolates. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)**, Vancouver, v. 13, p. 104-111, aug. 2009.
- MARQUES, A. S. A.; MARCHAISON, A.; GARDAN, L.; SAMSON, R. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - P. viridiflava group. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 106-115, 2008.
- NAIK, P. R.; RAMAN, G.; NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BMC Microbiology**, London, v. 8, p. 230, dec. 2008.
- POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; QUESADA, D. M.; XAVIER, R. P.; COELHO, C. H. M.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. **Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil**. Seropédica, RJ: Embrapa Agrobiologia, 2001. (Embrapa Agrobiologia. Documentos 144). 8p.
- SILVA FILHO, G. N.; NARLOCH, C.; SCHARF, R. Solubilização de Fosfatos Naturais por Microrganismos Isolados de Cultivos de Pinus e Eucalyptus de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 847-854, jun. 2002.
- SIMÕES NETO, D. E.; OLIVEIRA, A. C.; FREIRE, F. J.; FREIRE, M. B. G. S.; NASCIMENTO, C. W. A.; ROCHA, A. T. Extração de fósforo em solos cultivados com cana-de-açúcar e suas relações com a capacidade tampão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 13, p. 840–848 (Suplemento), jun. 2009.

TAURIAN, T.; ANZUAY, M. S.; ANGELINI, J. G.; TONELLI, M. L.; LUDUEÑA, L.; PENA, D.; IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant and Soil**, The Hague, v. 329, p. 421–431, apr. 2010.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Cambridge, v. 91, p. 127-141, oct. 2001.