



**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**Infeção e Colonização de Tecidos de Cana-de-Açúcar por  
Bactérias Diazotróficas Endofíticas Presentes no  
Inoculante Desenvolvido na Embrapa Agrobiologia**

**Anita Bueno de Camargo Nunes**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE TECIDOS DE CANA-DE-AÇÚCAR POR  
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS PRESENTES NO INOCULANTE  
DESENVOLVIDO NA EMBRAPA AGROBIOLOGIA**

**ANITA BUENO DE CAMARGO NUNES**

*Sob a orientação de*

**Jose Ivo Baldani**

*e co-orientação de*

**Stefan Schwab**

**Verônica Massena Reis**

Tese a submetida como requisito parcial para  
obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no  
Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

Seropédica, RJ

Abril de 2013

**Página da ficha catalográfica**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE AGRONOMIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**ANITA BUENO DE CAMARGO NUNES**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências** no  
Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia.

TESE APROVADA EM \_\_/\_\_/\_\_\_\_

---

José Ivo Baldani. Dr. Embrapa Agrobiologia  
(Orientador)

---

Sílvia Regina Goi. Dra. UFRRJ

---

Margarida Goréte Ferreira do Carmo. Dra. UFRRJ

---

Fábio Lopes Olivares. Dr. UENF

---

Márcia Soares Vidal. Dra. Embrapa Agrobiologia

Ao “Paco” Alaor Bueno de Camargo, que  
tanto desejou ser pai de uma “dotôra”.

## AGRADECIMENTOS

Seria uma imensa maldade esquecer-me de qualquer uma das inúmeras pessoas que marcaram o desenvolvimento deste trabalho, por isso desde já peço perdão por não ter a capacidade de me lembrar de cada rosto, cada nome daqueles que contribuíram enormemente para que este documento existisse.

Agradeço a Deus, soberanamente justo e bom, que me trouxe até aqui, sem entender exatamente como ou porque, mas que tem um propósito e que me usou de ferramenta até agora, dando-me a chance de crescer e aprender.

Agradeço às instituições que financiaram e apoiaram este trabalho: CAPES, Embrapa Agrobiologia e UFRRJ, na figura do Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, sem as quais nada teria sido possível.

Agradeço ao Marido Francis Alex Nunes, que me completou durante esta jornada, e que mais que ninguém sabe o que é ter uma doutoranda por perto, principalmente nas horas mais difíceis. Que venham as novas aventuras!

Agradeço ao Cunhado Julian Michel dos Santos Lesoing, que me substituiu com louvor no árduo papel de cuidar de Byco (Beatriz Bueno de Camargo Lesoing), minha eterna garotinha.

Agradeço à Mamãe (Isis Bueno de Camargo). Sem você eu não estaria aqui, tanto no sentido biológico quanto no sentido existencial.

Agradeço ao Paco (Alaor Bueno de Camargo), pelo colo, pelo apoio, pelos mimos, e por tudo que consertou e continuará consertando pra sempre, meu “carpinteiro do universo inteiro”.

Agradeço ao irmão-emprestado Marcelo Francisco da Silva, pelo incentivo e pelo exemplo profissional e pessoal.

Agradeço muito, mas muito mesmo, a Dr. José Ivo Baldani, meu orientador, que contra todas as minhas expectativas, sempre acreditou em mim, e com sua metodologia muito própria fez de mim uma pessoa efetivamente orientada. Agradeço também a Dra. Verônica Massena Reis, Dr. Stefan Schwab (co-orientadores) e Dra. Márcia Vidal, que deram todo o apoio técnico-pedagógico que sempre precisei, e a Dra. Katia Teixeira, que sempre foi muito solícita.

Agradeço a Dra. Silvia Regina Goi, pelo apoio e pelos conselhos científicos e pessoais.

Agradeço a Dr. Euan James, pelo treinamento essencial que dedicou a mim, sem o qual este trabalho não seria possível.

Agradeço a Dr. Fabio Lopes Olivares, por sua boa vontade e presteza todas as vezes que foi solicitado direta ou indiretamente à contribuição para este trabalho.

Agradeço à enormidade de irmãos-laboratoriais, visto que são muitos, e todos, sem nenhuma exceção sempre me apoiaram e ajudaram enormemente: Leona, Paulo, Vivianne, Cleiton, Patty, Rafaela, Jessica, Rayssa, Ana Luíza, Marcela, Paula Renata, Juliana, Esdras, Vanessa, Leonardo, Péricles (*em memória*), Sarah, Raphaelly, Thaís Félix, Thaís Freitas, Rodrigo, Fernando, Mauro, Francine... e vários outros, pois como dizemos, bolsista vai... bolsista vem... e nosso coração cada vez mais apertado!

Agradeço com todo afeto ao corpo técnico, nas figuras de Pat, Thelma, Carol, Tati, Aline, Wilson, Lúcio, Luis Carlos, João Luis, Itamar, Fernanda, Marildo e todos os funcionários da Embrapa Agrobiologia que fizeram tanto para que tudo desse certo.

Agradeço a Claudinho (Santo Claudinho!), para quem não existe mau-humor ou serviço desagradável, pessoa iluminada que todo dia, invariavelmente, nos lembra como viver é maravilhoso e como somos abençoados por nosso trabalho.

Agradeço especialmente a Geraldo Baêta, este Anjo Protetor dos Bolsistas, pra quem não existe problema insolúvel e qualquer obstáculo pode ser contornado.

Agradeço à moça que faz o café, pontualmente servido às nove da manhã e às três da tarde, e que nos dá aquela forcinha necessária para respirar fundo e continuar trabalhando.

Agradeço aos colegas do dia-a-dia, Jakson, Samuel, Helder, Cristiane, Veralu, Andréa, e tantos outros, por todos os conselhos, protocolos, métodos, dicas, brincadeiras, piadas científicas, nerdices e afinidades pelos corredores. Vocês tornaram estes últimos anos mais leves e agradáveis.

Agradeço a Raul e Maya, meus cães, que por toda sua vida, independente do meu ânimo e humor, choraram a cada partida minha, e me saudaram com felicidade, muita alegria e empolgação a me ver chegar em casa.

Agradeço a Eva Adriana e Osmir, tanto quanto a Natália e Carlos, amigos iluminados que me abrigaram nas semanas finais de redação e avaliação de resultados em suas casas como se eu fosse uma irmã; e por este mesmo motivo a Vivianne, irmã-amiga que me alojou em seu quarto nos momentos que precisei.

Agradeço aos funcionários terceirizados da segurança e da limpeza. Seu trabalho sempre foi essencial para que nosso trabalho fosse realizado.

Agradeço...

Agradeço...

Agradeço!!!

## RESUMO

NUNES, Anita Bueno de Camargo. **Infecção e colonização de tecidos de cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas endofíticas presentes no inoculante desenvolvido na Embrapa Agrobiologia**. 2013. 85f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

O interior das plantas abriga um grande número de bactérias diazotróficas endofíticas, que quando comparadas às diazotróficas exclusivamente rizosféricas, exibem grande contribuição para a nutrição das plantas hospedeiras via fixação biológica de Nitrogênio, provavelmente devido à proteção do complexo enzimático nitrogenase contra o oxigênio atmosférico, chegando a contribuir com até um terço do N acumulado em alguns genótipos de cana-de-açúcar. Experimentos conduzidos com inoculação isolada, combinada e conjunta de bactérias diazotróficas endofíticas das espécies *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Burkholderia tropica*, demonstraram melhoras no desenvolvimento de plantas de cana contribuindo com até 31,4% do N acumulado em duas variedades de plantas cultivadas em condições ideais de solo e manejo cultural. Estes e outros estudos levaram à produção de um inoculante para a cultura de cana-de-açúcar por parte da Embrapa Agrobiologia, composto por cinco espécies de bactérias diazotróficas endofíticas testadas experimentalmente. Com a finalidade de localizar e caracterizar os sítios de colonização das estirpes bacterianas presentes neste inoculante para cana-de-açúcar, inoculadas isoladamente em toletes e plântulas de cana-de-açúcar, procedeu-se a marcação das estirpes presentes no inoculante com o sistema de marcação repórter GFP, para a observação da locação física das bactérias em associação com a planta, através da visualização direta da proteína verde fluorescente (GFP), resultado alcançado com as estirpes HRC54 e HCC103 de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*, respectivamente. Experimentos com *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 marcadas com GFP demonstraram que em ensaios de ascensão xilemática por fluxo transpiratório, HCC103<sup>GFP</sup> estava melhor distribuída no ambiente xilemático do que HRC54<sup>GFP</sup>. Em experimento piloto com plantas de arroz desinfestadas o padrão de colonização radicular superficial foi basicamente o mesmo, porém em mini-toletes e cariopses germinados há clara diferença no padrão espacial de colonização entre as estirpes. *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> colonizou externamente gemas de mini-toletes inoculados e seus espaços intercelulares parenquimáticos na região do entrenó, enquanto que *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> penetrou na gema e permaneceu predominantemente na região do nó, associada às paredes externas dos vasos xilemáticos. Os resultados sugerem que ocorre colonização diferencial tanto do sistema radicular quanto de colmos de cana-de-açúcar variedade RB867515 pelas estirpes HRC54 e HCC103 de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*, respectivamente, sendo necessários estudos adicionais para melhor compreensão dos fatores que levam a esta colonização diferencial.

**Palavras-chave:** *Herbaspirillum*, cana-de-açúcar, genes repórter.

## ABSTRACT

NUNES, Anita Bueno de Camargo. **Infection and colonization of tissues from sugarcane by diazotrophic bacteria present in the inoculum developed at Embrapa Agrobiologia.** 2013. 85f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

Inside of plants lives a large number of diazotrophic bacteria, which when compared to exclusively rhizospheric diazotrophic exhibit great contribution to the nutrition of host plants through biological nitrogen fixation, probably due to the protection of the nitrogenase enzyme complex against atmospheric oxygen coming to contribute up to a third of N accumulated in some genotypes of sugarcane. Experiments with inoculum isolated, combined and joint diazotrophic bacteria species *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, and *Burkholderia tropica* demonstrated improvements in the development of sugarcane plants contributing up to 31.4 % of the N accumulated in two varieties of plants grown in ideal conditions of soil and crop management. These and other studies led to the production of an inoculant for the culture of sugarcane by the Embrapa Agrobiologia, composed of five species of diazotrophic bacteria tested experimentally. In order to locate and characterize the colonization sites of the bacterial strains present in this inoculant to sugarcane, separately inoculated seedlings and stalks in sugarcane, proceeded to the marking of inoculant strains present in the system marking GFP reporter for the observation of physical location of bacteria in association with the plant, through the direct visualization of green fluorescent protein (GFP), results obtained with strains of *H. seropedicae* HRC54 and *H. rubrisubalbicans* HCC103. Experiments with *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 and *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 marked with GFP showed that in trials of ascent xylem by transpiration stream, HCC103<sup>GFP</sup> was better distributed environment in which the xylem HRC54<sup>GFP</sup>. In a pilot experiment with rice plants disinfected the surface root colonization pattern was basically the same on a mini-stalks and sprouted kernels no clear difference in the spatial pattern of colonization between strains. *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> colonized externally buds of mini-stalks inoculated and their intercellular spaces in the parenchyma region of the internode, while *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> penetrated the bud and remained predominantly in the node region, associated with the external walls of xylem vessels. The results suggest that differential colonization occurs much root system as the stalks of cane sugar variety RB867515 HRC54 and HCC103 by strains of *H. rubrisubalbicans* and *H. seropedicae*, respectively, and additional studies to better understand the factors that lead to this differential colonization.

**Keywords:** *Herbaspirillum*, sugarcane, reporter genes.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	9
LISTA DE FIGURAS .....	11
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O Nitrogênio na cultura de cana-de-açúcar .....	3
2.2 Infecção e colonização de plantas por bactérias.....	9
2.3.1 Azospirillum amazonense .....	11
2.3.2 Burkholderia tropica.....	13
2.3.3 Gluconacetobacter diazotrophicus .....	15
2.3.4 Herbaspirillum seropedicae .....	16
2.3.5 Herbaspirillum rubrisubalbicans.....	18
2.4 Sistema de Marcação Molecular – Gene repórter <i>gfp</i> .....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Estirpes bacterianas e meios de cultura .....	22
3.2 Curvas de Crescimento .....	22
3.3 Plasmídeos disponíveis.....	23
3.4 Procedimentos de preparo para transformação bacteriana .....	24
3.4.1 Testes de resistência a antibióticos em meio líquido e sólido .....	25
3.4.2 Testes de resistência das estirpes HCC103 de Herbaspirillum rubrisubalbicans e HRC54 de Herbaspirillum seropedicae ao antibiótico tetraciclina.....	26
3.5 Transformação bacteriana.....	26
3.5.1 Eletroporação.....	26
3.5.2 Conjugação.....	26
3.5.3 Choque Térmico .....	27
3.6 Experimentos de estabilidade plasmidial.....	28
3.6.1 Experimento de Repicagem.....	28
3.6.2 Experimento de expressão da GFP em condições de transporte/inoculação	28
3.7 Experimentos de inoculação das estirpes HCC103 <sup>GFP</sup> e HRC54 <sup>GFP</sup> <i>in planta</i> .....	29
3.7.1 Teste de visualização <i>in planta</i> com inoculação de arroz hidropônico .....	29
3.7.2 Ascensão xilemática.....	30
3.7.3 Inoculação de mini-toletes de cana-de-açúcar .....	31

3.7.4 Inoculação em plântulas de cana-de-açúcar provenientes de cariopses germinados .....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
4.1 Marcação das estirpes do inoculante com genes repórteres.....	33
4.1.1 Estabelecimento da fase exponencial de crescimento das estirpes em estudo .....	33
4.2 Testes de resistência das estirpes do inoculante a antibióticos .....	33
4.2.1 Resistência a antibióticos em meio de cultura líquido .....	34
4.2.2 Resistência a antibióticos em meio de cultura sólido .....	35
4.2.3 Resistência de HRC54 e HCC103 à tetraciclina .....	38
4.3 Transformação bacteriana .....	38
4.3.1 Eletroporação .....	38
4.3.2 Conjugação .....	41
4.3.3 Choque térmico .....	42
4.4 Avaliação por microscopia de epifluorescência dos transformantes obtidos por choque térmico .....	42
4.5 Avaliação da atividade do gene repórter em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 .....	43
4.6 Experimentos de estabilidade plasmidial em HRC54 <sup>GFP</sup> e HCC103 <sup>GFP</sup> .....	43
4.6.1 Experimento de repicagem .....	44
4.6.2 Avaliação de expressão da GFP em condições de transporte/inoculação .....	45
4.7 Avaliação do experimento piloto de colonização superficial do sistema radicular de duas variedades de arroz cultivados em condições hidropônicas.....	46
4.8 Avaliação da ascensão xilemática das culturas por fluxo transpiratório .....	52
4.10 Avaliação da inoculação em plântulas de cana-de-açúcar provenientes de cariopses germinados .....	63
5 CONCLUSÕES .....	68
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	69
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Simplificação dos principais processos envolvidos no ciclo do nitrogênio .....	3
--	---

Figura 2. Possíveis perdas de N nos sistemas agrícolas.....	5
Figura 3. Possíveis vias de entrada de bactérias endofíticas nas plantas hospedeiras.....	10
Figura 4. Mapa do plasmídeo pHc60.....	24
Figura 5. Esquema explicativo do experimento de repicagem das estirpes HRC54 <sup>GFP</sup> e HCC103 <sup>GFP</sup> sem pressão seletiva.....	28
Figura 6. Representação esquemática (A) e fotografia (B) do sistema hidropônico onde as sementes de arroz pré-germinadas foram cultivadas e inoculadas.....	30
Figura 7. Foto (A) e esquema (B) do experimento de ascensão xilemática.....	31
Figura 8. Montagem do experimento de inoculação de cariopses de cana-de-açúcar.....	32
Figura 9. Curvas de crescimento das bactérias do inoculante em meio Dygs.....	33
Figura 10. Curva de crescimento das bactérias do inoculante presentes neste trabalho na presença de antibióticos.....	34
Figura 11. Placa de teste de resistência de <i>Azospirillum amazonense</i> CbamC contra o antibiótico tetraciclina.....	35
Figura 12. Placas de meio de cultura Dygs contendo tetraciclina com as cinco estirpes do inoculante testadas simultaneamente.....	36
Figura 13. Placas de meio de cultura Dygs contendo ampicilina com as cinco estirpes do inoculante testadas simultaneamente.....	37
Figura 14. Testes de resistência das estirpes HCC103 e HRC54 à tetraciclina.....	38
Figura 16. <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 <sup>GFP</sup> e <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> HCC103 <sup>GFP</sup> .....	43
Figura 17. Experimento de repicagem sucessiva das estirpes HRC54 <sup>GFP</sup> e HCC103 <sup>GFP</sup> sem pressão seletiva.....	44
Figura 18. Emissão de fluorescência pelas estirpes HRC54 <sup>GFP</sup> e HCC103 <sup>GFP</sup> quando mantidas em veículos de transporte e inoculação.....	45
Figura 19. <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> HCC103 <sup>GFP</sup> colonizando a superfície radicular de arroz Vermelho Virgínia.....	47
Figura 20. <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> HCC103 <sup>GFP</sup> colonizando a superfície radicular de arroz IAC4440.....	49
Figura 21. <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 <sup>GFP</sup> colonizando a superfície radicular de arroz Vermelho Virgínia.....	50
Figura 22. <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 <sup>GFP</sup> colonizando a superfície radicular de arroz IAC4440.....	51

Figura 25. Meio de cultivo JNFB semi-sólido contendo meso-eritritol (M) e N-acetil glicosamina (N) inoculado com HRC54 <sup>GFP</sup> e HCC103 <sup>GFP</sup> .....	56
Figura 30. Colonização superficial das escamas epidérmicas da gema do mini-tolete de cana-de-açúcar RB867515 por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 <sup>GFP</sup> .....	58
Figura 31. Colonização superficial das escamas epidérmicas da gema do mini-tolete de cana-de-açúcar RB867515 por <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> HCC103 <sup>GFP</sup> .....	58
Figura 32. Ocupação do espaço apoplástico intercelular dos tecido parenquimático de mini-toletes de cana-de-açúcar RB867515 por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 <sup>GFP</sup> .....	60
Figura 33. Ocupação do espaço apoplástico intercelular dos tecido parenquimático de mini-toletes de cana-de-açúcar RB867515 por <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> HCC103 <sup>GFP</sup> .....	61
Figura 34. Paredes dos vasos xilemáticos de mini-toletes de cana-de-açúcar RB867515 colonizadas superficialmente por <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 <sup>GFP</sup> .....	61
Figura 35. Vaso xilemático da região do entrenó de mini-tolete de cana-de-açúcar RB867515 colonizado internamente por <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> HCC103 <sup>GFP</sup> .....	61
Figura 36. Vasos xilemáticos da região do nó de mini-tolete de cana-de-açúcar RB867515 colonizados internamente por <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> HCC103 <sup>GFP</sup> .....	62
Figura 37. Cariópses germinados de cana-de-açúcar RB867515 colonizados por HRC54 <sup>GFP</sup> .....	64
Figura 38. Cariópses germinados de cana-de-açúcar RB867515 colonizados por HRC54 <sup>GFP</sup> .....	65
Figura 39. Cariópses germinados de cana-de-açúcar RB867515 colonizados por HCC103 <sup>GFP</sup> .....	66

# 1 INTRODUÇÃO

Comunidades de microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) associados às plantas são uma importante alternativa para a otimização da nutrição nitrogenada em sistemas agrícolas. Se a associação destes microrganismos e plantas for eficiente, o nitrogênio atmosférico fixado pode auxiliar a suprir as necessidades das plantas, sendo uma alternativa econômica e ecológica. Diversas bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que apresentam baixa sobrevivência no solo exibem hábito endofítico, colonizando o interior das raízes e outros órgãos de plantas, como a cana-de-açúcar, sem nenhum sinal de patogenicidade e promovendo benefícios às plantas hospedeiras. Devido ao seu hábito de vida e atividades exibidas, estas bactérias são denominadas diazotróficas endofíticas. Estudos sugerem que populações de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico associadas à cultura da cana-de-açúcar podem conferir respostas na produção, quando infectam o interior das raízes destas plantas (BALDANI et al., 1997).

Muitas bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> têm sido relatadas associadas a plantas da família *Poaceae* e experimentos têm demonstrado que ocorrem significantes contribuições da fixação biológica de nitrogênio nestas culturas (BODDEY et al., 2003). Estudos conduzidos com inoculação conjunta de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar resultaram na promoção do crescimento das plantas e revelaram interações positivas e negativas entre as bactérias inoculadas e entre elas e a planta, além das interações entre a planta, as bactérias e o ambiente (OLIVEIRA et al., 2006). Análises quantitativas têm indicado que a seleção das combinações de estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas e variedades de cana-de-açúcar precisam ser melhor exploradas para que se obtenha o máximo benefício desta associação para finalidades agrícolas, sendo esta interação um sistema de benefícios associativos entre plantas e microrganismos que possui características únicas e que ainda permanecem por ser caracterizadas (CARVALHO et al., 2011).

No Brasil, plantas de cana-de-açúcar provenientes de experimentos de campo avaliadas pelo balanço total de N e enriquecimento de <sup>15</sup>N demonstram que entre 40 e 60% de todo o N na planta, aproximadamente 150 kg de N por hectare ao ano, eram provenientes da fixação biológica (BODDEY et al., 1995). Experimentos em vasos com solo, com a variedade comercial de cana SP70-1143 cultivada por 400 dias, após inoculação de plantas micropropagadas com estirpes isoladas e em diferentes combinações de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Burkholderia tropica*, demonstraram um melhor desenvolvimento das plantas com a inoculação conjunta, que contribuiu com cerca de 30% do nitrogênio total da planta (OLIVEIRA et al., 2002). Em campo, a inoculação desta mistura de bactérias nas variedades de cana comerciais SP70-1143 e SP81-2350 cultivadas por 16 meses, oriundas de micropropagação, contribuiu com 4,5 a 31,4% do nitrogênio na planta, onde as maiores contribuições foram registradas em solos com menor fertilidade (OLIVEIRA et al., 2003). Baseando-se nestes e em outros resultados, a Embrapa Agrobiologia desenvolveu um inoculante para a cultura da cana, constituído das cinco espécies acima citadas, em veículo turfoso, que está sendo aplicado e avaliado em experimentos de campo em diversas regiões do País. A forma como ocorre esta interação entre as bactérias do inoculante e a planta de cana são os principais focos deste estudo.

O conhecimento e a compreensão das interações planta-microrganismo são limitados devido, principalmente, a dificuldades em se estudar populações bacterianas na superfície das raízes ou no interior dos tecidos da planta (RAMOS et al., 2002). Diante disso, faz-se necessário que mais estudos com a finalidade de detalhar espacialmente a associação entre a planta e as bactérias diazotróficas endofíticas, dedicando-se especial atenção aos estudos nos

quais se caracterizam os sítios de colonização destas bactérias nos tecidos internos das plantas, pois muito provavelmente será nestes locais que a maior atividade das bactérias ocorrerá e conseqüentemente, as substâncias promotoras de crescimento vegetal serão liberadas, aumentando a compreensão das variáveis da planta que possam influenciar a atividade destas bactérias.

Em pesquisas com objetivo de localizar e monitorar *in loco* bactérias inoculadas em qualquer ambiente utiliza-se comumente a introdução de genes repórter nestas bactérias, sendo o monitoramento direto alcançado por métodos de detecção ótica como microscopia de epifluorescência (AHMAD et al, 2011). Os genes escolhidos como repórteres possuem características que conferem aos organismos que os expressam a pronta identificação e para bactérias ou células eucarióticas em cultura, é comum a disposição destes genes na forma de uma molécula de DNA circular, o plasmídeo. (SØRENSEN & NYBROE, 2006).

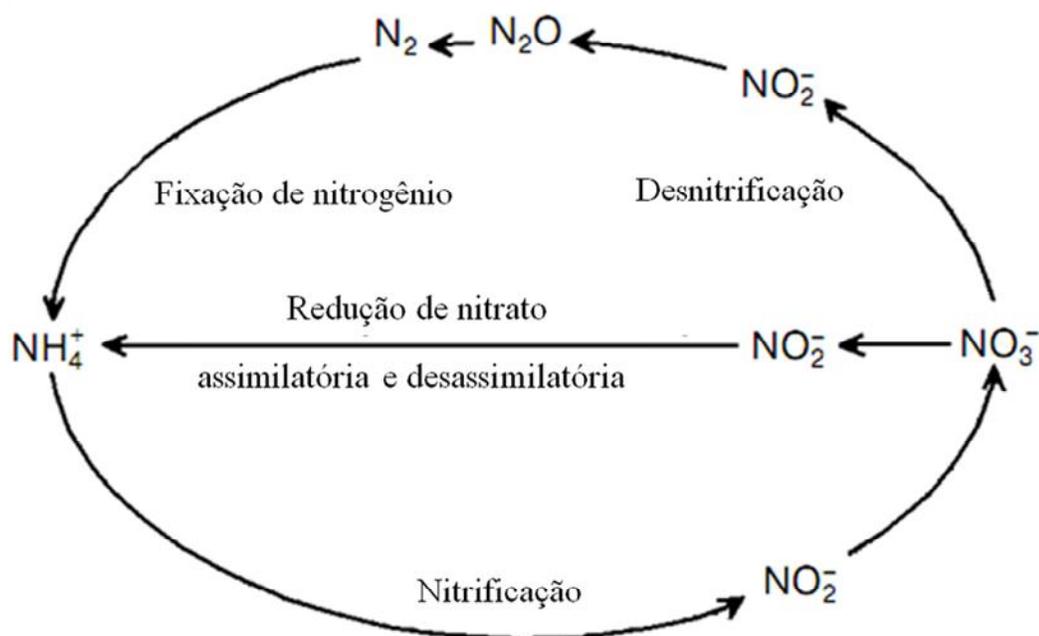
Este trabalho foi idealizado com o objetivo de detalhar o processo de colonização da planta de cana-de-açúcar pelas estirpes presentes no inoculante da Embrapa Agrobiologia, bem como a possível ocupação diferencial de nichos nos tecidos da planta, pois acredita-se que as bactérias deste estudo colonizam os tecidos da planta de cana-de-açúcar de maneira diferencial, gerando dominância específica em cada sítio colonizado.

Para que fosse alcançado, fez-se uso da marcação das estirpes do inoculante com genes repórter, uma ferramenta molecular poderosa, com grande diversidade e potencial para aplicação em estudos ecológicos. Os genes repórter facilitam a identificação dos microrganismos inoculados experimentalmente daqueles pré-existentes nos propágulos vegetais, reduzindo o “ruído” existente em análises de materiais vegetais não estéreis, como é o caso do tolete de cana. Comumente utiliza-se em estudos semelhantes genes que induzem características visualmente identificáveis, usualmente envolvendo proteínas fluorescentes como o gene da proteína GFP que emite brilho verde quando sob luz ultravioleta, proveniente da água-viva *Aequorea victoria* (SØRENSEN & NYBROE, 2006; AHMAD et al 2011), ferramenta aplicada neste estudo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Nitrogênio na cultura de cana-de-açúcar

Elemento de fundamental importância para vida, o nitrogênio (N) representa aproximadamente 78% da atmosfera terrestre, na forma de gás dinitrogênio ( $N_2$ ), e faz parte da constituição de ácidos nucleicos e proteínas, entre outras moléculas orgânicas (YOUNG, 1992; HOWARD e REES, 1996). Diferentes moléculas em constante interconversão, via diversos processos (Figura 1) fazem parte do ciclo biogeoquímico deste elemento (MOROZKINA & ZVYAGILSKAYA, 2007).



**Figura 1.** Simplificação dos principais processos envolvidos no ciclo do nitrogênio (Adaptado de Morozkina & Zvyagilskaya, 2007).

O nitrogênio é incorporado a compostos em diferentes graus de oxidação, os quais definem interconversões no ciclo biogeoquímico do elemento. Nitrogênio inorgânico é convertido para a forma biologicamente útil durante a fixação do nitrogênio e sua assimilação prevê a incorporação deste em cadeias carbônicas de diferentes compostos orgânicos. Processos de nitrificação (conversão oxidativa de amônio para nitrato) e desnitrificação (redução do nitrato a nitrito e óxidos de nitrogênio) estão envolvidos na remoção do nitrogênio para a atmosfera (MOROZKINA & ZVYAGILSKAYA, 2007).

O amônio é a fonte primária de N para a maioria das vias metabólicas, sendo convertido a glutamina e glutamato, que por sua vez são precursores de outros compostos nitrogenados (MERRICK & EDWARDS, 1995). A fixação biológica do nitrogênio reduz o dinitrogênio gasoso a amônio. A maioria dos procarionotes pode utilizar quaisquer fontes de nitrogênio, e a escolha desta ou daquela fonte se relaciona à subsequente assimilação do mesmo, bem como a disponibilidade ambiental das mesmas. Em geral, regulam a assimilação deste elemento de tal modo que determinadas fontes são preferencialmente utilizadas, onde

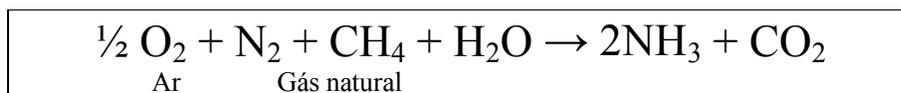
fontes alternativas do elemento são aproveitadas na ausência das fontes primárias (BOTHE et al., 2007).

Dos nutrientes exigidos pelas culturas e geralmente aplicados via adubação, o nitrogênio (N) tem papel central, pois participa direta e indiretamente de vários processos bioquímicos, fazendo parte de todos os aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (MALAVOLTA et al., 1997), sendo considerado um fator limitante para o crescimento das plantas (FRANCO & DÖBEREINER, 1994) e, por conseqüência, a produtividade das culturas é frequentemente limitada pela disponibilidade deste elemento no solo.

Segundo a FAO (2010), a demanda global de fertilizantes é de aproximadamente 170 bilhões de toneladas, e 61% deste total se refere a fertilizantes nitrogenados. No Brasil, o quantitativo médio aproximado do total de fertilizantes aplicados nos cultivos de cana-de-açúcar por hectare ao ano é de 425 quilogramas, valor que, mesmo considerado baixo para os padrões internacionais, ainda posiciona a cultura como o segundo consumidor nacional de fertilizantes na agricultura de larga escala, e em se tratando de adubação nitrogenada, na maior parte do país as doses variam de 70 a 120 kg. ha<sup>-1</sup> nas soqueiras, valor considerado baixo (PEREIRA, 2011).

Fertilizantes nitrogenados têm alto custo, uma vez que é necessária elevada quantidade de energia fóssil em seu processo industrial de produção (Quadro 1).

**Quadro 1.** Esquema simplificado da reação de produção industrial de fertilizante nitrogenado através do processo *Haber-Bosh*.

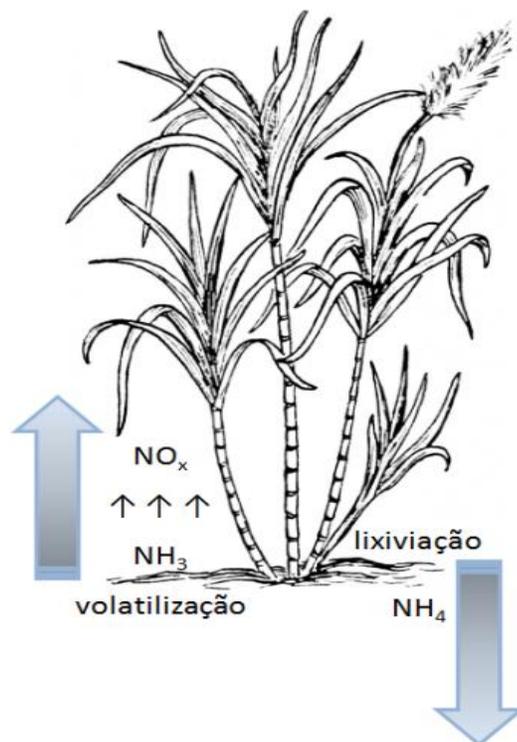


Adaptado de Cantarella (2007)

A síntese dos principais adubos nitrogenados industriais produzidos foi desenvolvida no início do século passado por Fritz Haber e Carl Bosh, e ocorre a partir do N<sub>2</sub> atmosférico e do H obtido de combustíveis fósseis ou da hidrólise da água com uso de energia elétrica, fontes pouco competitivas aos preços atuais. A amônia resultante da reação pode ser utilizada diretamente como fertilizante ou em solução aquosa, ou ainda oxidada para formação de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), sendo ambos matéria-prima para a produção de vários fertilizantes (CANTARELLA, 2007).

Além do exposto, o aumento no uso de fertilizantes químicos tem chamado atenção para os problemas ambientais associados a esta prática (Figura 2), como a acidificação do solo e eutroficação da água. Os fertilizantes nitrogenados são potencialmente muito poluentes, uma vez que boa parte do N aplicado às culturas tropicais é perdida (26-88%) através da lixiviação e da desnitrificação das fontes de aplicadas (FRANCO & BALIEIRO, 1999). Moreira e Siqueira (2006) estimam as perdas totais de N no solo na ordem de 43% por desnitrificação e 29% por lixiviação de nitrato.

Na cultura de cana-de-açúcar, boa parte do N aplicado é perdido por volatilização (CANTARELLA et al., 1999). Quando a aplicação de adubo nitrogenado se dá por distribuição de uréia na superfície do solo, esta sofre hidrólise, que consome prótons (H<sup>+</sup>) livres comumente encontrados nos solos brasileiros, de maioria com características ácidas. O íon amônio NH<sub>4</sub><sup>+</sup> gerado é altamente volátil e, uma vez na atmosfera, converte-se facilmente em óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>). O óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) participa do grupo de causadores de efeito estufa, sendo responsável por aproximadamente 6% do processo, e também prejudica a camada de ozônio, pois consome os íons O<sup>-</sup> formando NO e NO<sub>2</sub> (CANTARELLA, 2007).



**Figura 2.** Possíveis perdas de N nos sistemas agrícolas. Adaptado de Foresman (2012).

O nitrogênio fixado pela FBN é menos propenso a perdas devido à sua utilização *in situ*, sendo o processo biológico um contribuinte na entrada sustentável deste nutriente nos sistemas agrícolas (DIXON & KAHN, 2004). Como o  $N_2$  atmosférico é um recurso renovável, a FBN na agricultura constitui uma fonte virtualmente infinita de N para os cultivos (BOHLOOL et al., 1992).

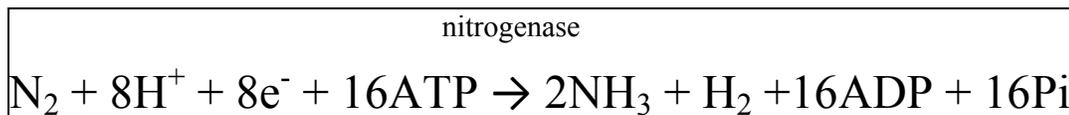
A fixação biológica de nitrogênio é o processo de conversão do  $N_2$  atmosférico em amônia por parte de uma ampla gama de microrganismos procarióticos, incluindo bactérias de vida livre, associativas ou simbióticas, exibindo grande importância para o meio ambiente e para a agricultura mundial (DIXON & KAHN, 2004), sendo ainda uma importante parte do ciclo deste elemento, reabastecendo a biosfera do mesmo e compensando também as perdas por nitrificação.

Organismos diazotróficos (fixadores de N) são encontrados em uma ampla variedade de habitats, incluindo vida livre no solo e na água, e em simbioses de diferentes modalidades, como associativa com Poaceae, no intestino de térmitas, actinorrízicas com plantas lenhosas, cianobactéria com várias plantas e radicular nodular com leguminosas (DIXON & KAHN, 2004). Durante a década de 50 descobriu-se que bactérias do gênero *Beijerinckia* associavam-se a raízes de cana-de-açúcar e outras poáceas (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958). Desde então, diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo intensificaram seus estudos, gerando resultados bastante promissores na década de 70, como o isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Azospirillum* a partir de raízes de milho, trigo, arroz e outras plantas da família Poaceae (BODDEY & DÖBEREINER, 1988).

O nitrogênio atmosférico é reduzido a amônio em uma reação (Quadro 2) catalisada por um complexo enzimático encontrado somente em algumas espécies (POSTGATE, 1980), os organismos procariotos desempenham um dos mais importantes processos naturais descritos para aquisição de nutrientes pelos vegetais, que pode ser realizado por microrganismos simbióticos, de vida livre ou associativos, e dentre estes últimos destacam-se alguns gêneros, tais como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia*,

que se associam a Poaceae (BALDANI et al., 1999), bactérias diazotróficas estas que têm demonstrado potencial para uso agrícola tanto através da FBN, quanto da produção de hormônios vegetais e outros processos, promovendo aumento de crescimento em plantas de diferentes espécies (JAMES, 2000; REIS JÚNIOR et al., 2004; BERG, 2009).

**Quadro 2.** Esquema simplificado da reação de fixação biológica de nitrogênio.



Adaptado de Kerbauy (2004)

A pesquisa sobre a colonização de tecidos da planta por bactérias diazotróficas recebeu muita atenção no período de 1985 a 1990 e, conseqüentemente, muitos aspectos da interação planta-bactéria começaram a ser elucidados (BALDANI & BALDANI, 2005). Por ocasião, Döbereiner (1992) introduziu o conceito de microrganismo *endofítico* ao campo da FBN, qualificando como tal dos aqueles aptos a colonizar os tecidos internos das plantas em alguma parte de seus ciclos de vida, sem causar dano aparente ao hospedeiro. A definição de endófitos foi bastante debatida ao longo da década e diferentes definições foram estabelecidas (PETRINI, 1991; HALLMANN et al., 1997; JAMES & OLIVARES 1998; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998a).

No Brasil, a FBN em *Poaceae* foi inicialmente descrita com estudos de Döbereiner (1953), que pesquisou a ocorrência de *Azotobacter* em solos ácidos da baixada fluminense e as investigações que se seguiram demonstraram a atividade de FBN de várias espécies de bactérias, como as rizosféricas *Beijerinckia fluminensis* e *Azotobacter paspali*, as associativas *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum* e as endofíticas *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia tropica* e *Burkholderia silvatlantica*. O desenvolvimento do meio semi-sólido e a técnica da redução de acetileno auxiliaram na melhoria do entendimento sobre a interação entre o hospedeiro e a bactéria diazotrófica, bem como no avanço das investigações da genética e da bioquímica da FBN (BALDANI & BALDANI, 2005).

De maneira geral, quando bactérias diazotróficas estão em associação com *Poaceae*, garantem aumentos de 5 a 30% na produção (BALDANI et al., 1983; OKON & LABANDERA-GONZALEZ, 1994), podendo esta interação alcançar níveis de importância econômica, onde os melhores resultados têm sido alcançados nas culturas de cana-de-açúcar e arroz inundado, casos em que a contribuição da FBN em variedades eficientes podem superar a que ocorre em algumas leguminosas (URQUIAGA et al., 2005). Em arroz e *Poaceae* forrageiras, estudos indicam que 10-50% do N acumulado na planta são provenientes do N<sub>2</sub> atmosférico (BODDEY & DÖBEREINER, 1988; BALDANI et al., 1999).

Apesar de várias características ecológicas e fisiológicas estarem sendo desvendadas, ainda há lacunas no conhecimento sobre o mecanismo envolvido na interação bactéria-planta e como este contribui para o nitrogênio acumulado nas plantas (BALDANI et al., 1997), e a aplicação em campo tem sido limitada pela falta de conhecimento dos fatores ecológicos que determinam a sobrevivência e atividade das bactérias inoculadas na rizosfera das plantas-alvo (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010).

Os trabalhos com bactérias fixadoras de N especificamente na cultura da cana-de-açúcar iniciaram-se com o isolamento do gênero *Beijerinckia* e da nova espécie *B. fluminensis* de amostras de solos de canaviais de diferentes regiões no Brasil (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958). Pouco tempo depois, foi detectado que *B. fluminensis* ocorria

predominantemente em solos cultivados com cana de açúcar, demonstrando clara influência da planta no desenvolvimento da bactéria (DÖBEREINER, 1959). Outras espécies de bactérias foram isoladas de solo da rizosfera de plantas de cana, como *Beijerinckia indica* (SOUTO & DÖBEREINER, 1967), *Klebsiella* (GRACIOLLI *et al.*, 1983), *Enterobacter* (LADHA *et al.*, 1983), *Bacillus azotofixans* (SELDIN *et al.*, 1984) posteriormente denominado *Paenibacillus azotofixans* (ASH *et al.*, 1993) e *Azospirillum amazonense* (BALDANI *et al.*, 1993).

Além de isolamentos rizosféricos, bactérias diazotróficas endofíticas foram isoladas de tecidos vegetais, como *Herbaspirillum seropedicae* de raízes, folhas e colmos de cana-de-açúcar no Brasil (BALDANI *et al.*, 1996) e na Austrália (BODDEY *et al.*, 1998), *Burkholderia unamae* (CABALLERO-MELLADO *et al.*, 2004), *Burkholderia tropica* (REIS *et al.*, 2004; BODDEY, 2002) e *Burkholderia kururiensis* (BODDEY, 2002), dentre outras, foram descritas como bactérias endofíticas presentes em cana-de-açúcar.

Estudos mostraram que o interior das plantas abrigava um grande número de bactérias endofíticas, o que indica que estes organismos provavelmente seriam possuidores de uma grande probabilidade de contribuição via FBN quando comparados às bactérias rizosféricas de vida livre, uma vez que teriam a vantagem ecológica da proteção da nitrogenase contra o oxigênio (BALDANI *et al.*, 1997).

Experimentos conduzidos na Índia demonstraram que *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* inoculadas na variedade comercial CO86032 elevou a biomassa das plantas e o conteúdo de N foi superior ao de plantas adubadas com 140 kg ha<sup>-1</sup> de N (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2006), e altos níveis de N mineral aplicados em experimentos neste mesmo país e também no México causaram significativo decréscimo na atividade de FBN, reduzindo também as populações de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (FUENTEZ-RAMÍREZ *et al.*, 1993; MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2006). Estes resultados são de grande importância, uma vez que Sevilla e colaboradores (2001) demonstraram que *Gluconacetobacter diazotrophicus* é apta a fornecer parte do nitrogênio necessário à planta de cana, além de produzir hormônios de estimulação de crescimento.

Experimentos em vasos com solo, com a variedade de cana SP70-1143 cultivada por 400 dias, após inoculação isolada e em diferentes combinações de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Burkholderia tropica*, demonstraram um melhor desenvolvimento das plantas com a inoculação conjunta, que contribuiu com cerca de 30% do N da planta originária de micropropagação, ou seja, livre da população natural (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Em campo, a inoculação desta mistura de bactérias nas variedades SP70-1143 e SP81-2350 cultivadas por 16 meses, contribuiu com 4,5 a 31,4% do N na planta, ocasião em que as maiores contribuições foram registradas em solos com menor fertilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2003). A inoculação conjunta destas mesmas bactérias resultou na promoção do crescimento em cana inoculada, revelando ainda interações positivas e negativas entre as bactérias inoculadas e entre elas e a planta, além das interações entre a planta, as bactérias e o ambiente (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Além da contribuição direta via FBN e da promoção de crescimento pela ação de hormônios estimuladores, as bactérias diazotróficas endofíticas induzem a expressão de diversos genes codificadores de proteínas relacionadas à associação endofítica em cana-de-açúcar, indução experimentalmente comprovada por ocasião da inoculação de plantas de cana com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (NOGUEIRA *et al.*, 2001), alguns destes genes estão relacionados à sinalização (VARGAS *et al.*, 2003) e muitos têm função ainda desconhecida (NOGUEIRA *et al.*, 2005).

A área ocupada pela cana em nosso País é de aproximadamente 9,6 milhões de hectares (IBGE, 2012), merecendo destaque pelo grande emprego das terras agricultáveis e

por seu potencial energético para produção de biocombustível. Tanto no Brasil quanto em Cuba, Peru, México e Índia, o balanço entre a energia gasta para produzi-la e a energia gerada por ela é altamente positivo, uma vez que nesses países a seleção de variedades de cana tem priorizado aquelas capazes de produzir sob baixos níveis de adubação, principalmente em N (aproximadamente 60 kg de N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>), além da adoção de práticas culturais de economia de energia, como o uso do bagaço para produção de energia elétrica, afetando o balanço energético diretamente e proporcionando indiretamente a seleção de variedades propensas a maiores contribuições da FBN (URQUIAGA et al., 1995). Ensaios com seis diferentes variedades comerciais de cana-de-açúcar verificaram suas capacidades em obter de 40,2 a 64,0 kg.ha<sup>-1</sup> de nitrogênio através da FBN (URQUIAGA et al., 2011).

A cultura da cana-de-açúcar, no Brasil, apresenta baixa resposta à fertilização nitrogenada devido ao alto potencial de FBN nas variedades cultivadas, alcançando até 71% das necessidades da planta (URQUIAGA et al., 2005). Na variedade RB867515, dados experimentais demonstram que a inoculação mista de bactérias diazotróficas adequadas fornece, via FBN, o equivalente a 120 kg.ha<sup>-1</sup> de N (SCHULTZ et al., 2012). Estudos com o isótopo <sup>15</sup>N demonstraram que diversas variedades brasileiras de cana são capazes de obter mais de 60% de seu N total através da FBN, o que significa mais de 150 quilos de N por hectare ao ano (BODDEY et al., 1995), significando uma economia em N-fertilizante equivalente a cerca de 200 milhões de dólares anuais, além de contribuir para a conservação ambiental (URQUIAGA et al., 2005).

Em 1978 o Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA – Piracicaba – SP) conduziu uma série de experimentos nos quais Ruschel e colaboradores detectaram contribuições significativas da FBN na cultura da cana. Ensaios com <sup>15</sup>N na Embrapa Agrobiologia com quatro cultivares mostraram que a mais promissora (CB47-89) obteve 60% do N proveniente da fixação biológica (LIMA et al., 1987). Outras dez variedades testadas por três anos em tanque de concreto com solo marcado com <sup>15</sup>N e *Brachiaria* como controle negativo indicaram que a variedade mais promissora (SP70-1143) recebeu 70% do N derivado da fixação biológica (URQUIAGA et al., 1992). Estudos mostram que a FBN pode contribuir com até um terço de todo o N acumulado em alguns genótipos, atingindo produtividades muito superiores às médias nacionais (BODDEY et al., 1995). Estudos com balanço de N mostraram contribuições da FBN em torno de 60% para algumas variedades de cana (URQUIAGA et al., 1992).

A média nacional de produtividade da cana-de-açúcar é de aproximadamente 72,6 Mg.ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2012) entretanto, dados obtidos através da seleção de genótipos mais eficientes demonstram que a cultura da cana-de-açúcar, se bem manejada, pode render mais de 200 Mg.ha<sup>-1</sup>, com até 58% de nitrogênio proveniente da FBN, e que há possibilidade de aumentar esta eficiência mediante a inoculação de estirpes de bactérias endofíticas selecionadas, durante o processo de micropropagação das plantas (URQUIAGA et al., 1992), tendo sido obtidos resultados significativos de acúmulo de N via FBN com a inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas micropropagadas de cana (MORAES & TAUK-TORNISIELO, 1997; OLIVEIRA et al., 2002, 2003 e 2006), onde enfatiza-se a necessidade da investigação da melhor combinação do genótipo da planta e do manejo, além da escolha do inóculo aplicado.

A contribuição da FBN na nutrição da cana-de-açúcar através da técnica da abundância natural de <sup>15</sup>N foi avaliada em inúmeras variedades de cana em SP, MG, RJ e PE e estimada em até 60% (média de 32%) dependendo da variedade, e os autores indicaram que o manejo cultural pode afetar expressivamente o processo de FBN nesta cultura (POLIDORO et al., 2001).

## 2.2 Infecção e colonização de plantas por bactérias

De maneira geral, o processo de infecção e colonização de plantas por bactérias endofíticas é um evento dinâmico, que envolve sinais moleculares, seguidos do movimento da bactéria em direção à planta hospedeira (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000), processo que exibe evidências de ser conservado em diferentes espécies bacterianas (VAN BASTELAERE et al., 1999), seguido de adesão superficial. Em *Azospirillum* foi verificado que o flagelo polar e a produção de polissacarídeos fazem parte dos processos de ancoragem da bactéria à superfície radicular (MICHIELS et al., 1991). A penetração da bactéria na planta ocorre por fissuras naturais como nos pontos de emergência radicular, ou por ferimentos na epiderme, conforme demonstrado para *Gluconacetobacter diazotrophicus* (JAMES et al., 1994; REIS et al., 1999).

Apesar de possuírem ciclo de vida similar ao das bactérias fitopatogênicas, as bactérias endofíticas não causam doenças (QUISPEL, 1992) e em contraste ao que ocorre com o sistema de nodulação rizóbio-leguminosa, não há evidências de que em uma endossimbiose por bactérias endofíticas em Poaceae existam bactérias vivendo no interior de células da planta (JAMES & OLIVARES, 1998; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998a, b).

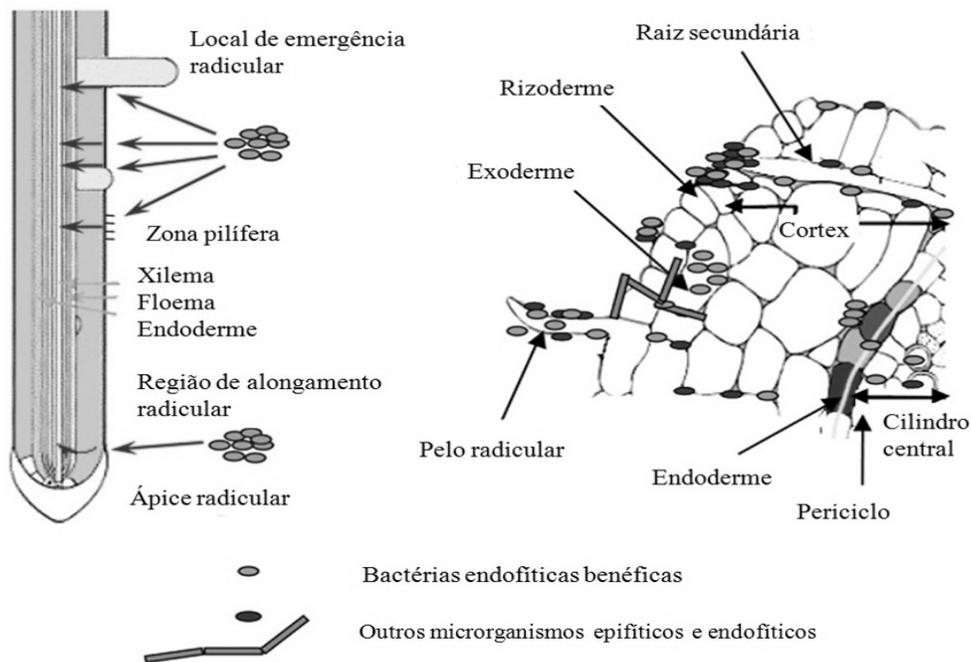
Apesar de algumas espécies de bactérias possuírem motilidade por flagelos, usualmente estas dependem de aberturas naturais ou ferimentos para ganhar o interior das plantas e a colonização se inicia na presença de condições favoráveis e ausência de reações por parte dos tecidos da planta (GOODMAN et al., 1986). Antes da penetração nos tecidos, ocorre uma fase inicial reversível e inespecífica de adesão das bactérias à superfície da planta, envolvendo interações de cargas superficiais, seguida de uma segunda fase irreversível, mediada por polímeros extracelulares adesivos que em alguns casos exibe alta especificidade (ROMANTSCHUK, 1992). Um exemplo do exposto são estudos que mostram que o flagelo polar, ou compostos do mesmo, em *Azospirillum brasilense* funcionam como adesivos, mediando a adesão radicular em raízes de trigo *in vitro* (CROES et al., 1993). A adesão desta bactéria às raízes da planta ocorre em duas fases, sendo a primeira, também denominada fase de adsorção, caracteristicamente rápida e reversível, enquanto que a segunda, ou de ancoragem, liga a bactéria irreversivelmente à superfície radicular, num processo que envolve polissacarídeos não identificados, formando agregados bacterianos no sítio de adesão (MICHIELS et al., 1991).

A infecção em Poaceae é semelhante à entrada bacteriana em nódulos primitivos, na qual a principal região de colonização é o ponto de emergência das raízes laterais, onde microcolônias podem ser facilmente detectadas e células bacterianas foram localizadas entre as camadas de células da raiz lateral e do córtex da raiz principal (OLIVEIRA et al., 2009) e, além desta região, o ápice e a zona de alongamento e diferenciação são rotas de entrada (MATTOS et al., 2008). A bactéria pode invadir intercelularmente, penetrando no cilindro central em regiões não diferenciadas, chegando ao local de formação do mesmo antes da diferenciação da endoderme (COMPANT et al., 2010) (Figura 3).

Estudos com bactérias do gênero *Herbaspirillum* em trigo mostram que estas colonizam todo o eixo radicular, com maior frequência de adesão nas zonas de diferenciação e alongamento (principal região de exsudação radicular, comumente colonizada pelos microrganismos da rizosfera) além da zona de formação de pelos radiculares (ROVIRA, 1973). Em plantas de cana-de-açúcar foi demonstrado que *Herbaspirillum rubrisubalbicans* penetra na planta próximo à região de emergência das raízes, invadindo tecidos vasculares através da colonização das células parenquimáticas e vasos metaxilemáticos (OLIVARES et al., 1996).

Em recente revisão sobre associação de bactérias do gênero *Herbaspirillum* e Poaceae, Monteiro e colaboradores (2012) detalham que a colonização endofítica por estas

bactérias se inicia na adesão das mesmas nas superfícies radiculares, seguida da colonização dos pontos de emergência de raízes laterais e posterior penetração nas descontinuidades epidérmicas, aparentemente envolvendo estruturas de envelopamento bacteriano, como lipopolissacarídeos, exopolissacarídeos, adesinas e sistema de secreção do tipo III, mas não necessariamente envolve a degradação enzimática das paredes celulares. Desta forma, os espaços intercelulares são rapidamente ocupados, e a colonização avança ao xilema e às partes aéreas da planta hospedeira, que tem entre suas respostas a não-indução de sistemas de defesas sistêmicas a patógenos. Cascatas de sinalização fitormonal são então ativadas, regulando o desenvolvimento da planta. Estas comunicações moleculares complexas entre alguns representantes do gênero *Herbaspirillum* e plantas hospedeiras podem resultar na promoção do crescimento vegetal (MONTEIRO et al., 2012).



**Figura 3.** Possíveis vias de entrada de bactérias endofíticas nas plantas hospedeiras (Adaptado de Compant et al., 2010).

### 2.3 Bactérias Presentes no Inoculante

Todas as bactérias presentes no inoculante de cana-de-açúcar desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia são pertencentes ao filo *Proteobacteria* (Quadro 3) e formam película característica quando inoculadas em meio semi-sólido, o que indica sua característica microaerofílica, na qual o oxigênio é obrigatório para a geração de grandes quantidades de energia na forma de ATP requerida para a fixação biológica de nitrogênio, mas em baixa concentração, para não afetar negativamente a enzima nitrogenase (MARCHAL & VANDERLEYDEN, 2000). Esta atividade de FBN pode ser quantificada através de ensaios de redução de acetileno e por ensaios envolvendo  $^{15}\text{N}$  gasoso.

**Quadro 3.** Classificação filogenética das bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de cana-de-açúcar presentes no inoculante da Embrapa Agrobiologia.

Reino
Filo
Classe <i>Alfaproteobacteria</i>
Ordem <i>Rhodospirillum</i>
Família <i>Rhodospirillaceae</i>
Gênero <i>Azospirillum</i>
Espécie <i>Azospirillum amazonense</i>
Família <i>Acetobacteraceae</i>
Gênero <i>Gluconacetobacter</i>
Espécie <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
Classe <i>Betaproteobacteria</i>
Ordem <i>Burkholderiales</i>
Família <i>Burkholderiaceae</i>
Gênero <i>Burkholderia</i>
Espécie <i>Burkholderia tropica</i>
Família <i>Oxalobacteraceae</i>
Gênero <i>Herbaspirillum</i>
Espécie <i>Herbaspirillum seropedicae</i>
Espécie <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>

Adaptado de Garrity et al. (2005)

As principais características morfológicas e fisiológicas de cada espécie selecionada experimentalmente para participar do inoculante para cana-de-açúcar são a seguir apresentadas.

### 2.3.1 *Azospirillum amazonense*

Estudos com a sequência 16S rRNA classificam o gênero *Azospirillum* como pertencente à classe *Alphaproteobacteria*, ordem *Rhodospirillales*, família *Rhodospirillaceae*. Possuem células caracteristicamente móveis e vibróides em meio de cultura específico (LGI), exibem aumento na produção de polihidroxibutirato (PHB) sob condições de estresse, como exposição a metais tóxicos e estresse hídrico. Grânulos de PHB são observados sob condições de crescimento na presença de N<sub>2</sub> (condição de FBN), e em menor quantidade na presença de nitrogênio disponível na forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. A atividade da nitrogenase é mais sensível em *Azospirillum amazonense* que em outras espécies, e seu tempo de geração a baixas concentrações de O<sub>2</sub> é maior (GARRITY et al., 2005). A população de *Azospirillum amazonense* demonstra heterogeneidade de estirpes, e a planta hospedeira tem efeito altamente significativo na estrutura genética da espécie quando proveniente de isolados endofíticos, ocorrendo o mesmo em relação ao tipo de solo para isolados rizosféricos (AZEVEDO et al., 2005).

Bactérias do gênero *Azospirillum*, diazotrofos predominantemente superficiais (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000) são hábeis a mineralizar de nutrientes do solo e sequestrar ferro, sobrevivem no solo em condições desfavoráveis e favorecem associações micorrízicas (BASHAN et al., 2004), sendo capazes de auxiliar plantas hospedeiras a minimizar efeitos negativos de estresses abióticos (BARASSI et al., 2007). Muitos mecanismos, além da FBN, têm sido investigados na busca de explicações sobre como *Azospirillum* aumenta o crescimento e desenvolvimento das plantas, tais como a produção de

fitormônios e a redução de nitrato (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Na última década, foi relatado que o óxido nítrico (NO) desempenha um papel central na formação de raízes laterais (CORREA-ARAGUNDE et al., 2004) e desenvolvimento de pêlos radiculares (LOMBARDO et al., 2006). *Azospirillum* pode produzir NO em condições de baixa concentração de O<sub>2</sub> por desnitrificação (HARTMANN & ZIMMER, 1994), e dados referentes à estimulação do desenvolvimento das raízes das plantas e da capacidade do NO atuar como um regulador não tradicional de crescimento da planta (BELIGNI & LAMATTINA, 2001), produção de raízes laterais e pêlos radiculares levou à investigação sobre a capacidade de *Azospirillum* promover o crescimento da raiz e alterar a sua arquitetura básica devido à produção de NO (BARASSI et al., 2007).

O caráter endofítico do gênero foi testado avaliando-se seis estirpes de *Azospirillum* (entre elas *A. amazonense*) em sete diferentes tratamentos de inoculação próprios de ensaios com patógenos de plantas. As bactérias foram aplicadas experimentalmente em folhas e raízes de tomate, pimenta, trigo e algodão, e nenhuma delas demonstrou qualquer sintoma de patogenicidade, sendo todas capazes de colonizar as raízes das plantas (BASHAN, 1998).

Em avaliação quanto à aderência em raízes de plantas de milho, utilizando modificação genética com o gene repórter da proteína verde fluorescente, bactérias do gênero *Azospirillum* modificadas foram prontamente encontradas, particularmente no ápice radicular e na zona pilífera, assim como em depressões formadas entre as células epidérmicas, demonstrando os principais nichos ocupados, com alta densidade de células (RUSSO et al., 2005). Em ensaios de inoculação conjunta em plântulas micropropagadas de cana, utilizando a técnica de imunofluorescência *in situ*, *Azospirillum amazonense* foi observado aderido à superfície das raízes e em regiões antes relatadas de aderência de bactérias deste gênero em *Poaceae*, como a região de emergência de raízes laterais, o ápice radicular e espaços intercelulares na rizoderme (OLIVEIRA et al., 2009).

Bactérias do gênero *Azospirillum* têm sido encontradas associadas com grande número de espécies de cereais e gramíneas forrageiras, tanto em clima tropical como em temperado, porém não são todas as espécies que têm sido encontradas colonizando plantas em diferentes localidades (REIS JÚNIOR et al., 2004). *Azospirillum amazonense* é um destes casos, em que além de isolados brasileiros, foi detectado em amostras de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Havá, Tailândia e Argentina (DÖBEREINER, 1992; MONZÓN DE ASCONEGUI & SIROLI, 1985). Provavelmente devido a esta baixa distribuição geográfica, tem sido pouco estudada, quando comparado com outras espécies do gênero.

*Azospirillum* apresenta alta incidência e números quando associado a gramíneas forrageiras (SOUTO, 1982; BALDANI, 1984; MAGALHÃES & DÖBEREINER, 1984), além de ser encontrada associada a diversas espécies de monocotiledôneas, incluindo *Orchidaceae*, pode ser isolada de dicotiledôneas herbáceas, arbustivas e arbóreas (LANGE & MOREIRA, 2002) e, quando comparada a *A. brasilense* e *A. lipoferum*, diferentemente destas, exibe a capacidade de assimilar sacarose em condições de FBN (FALK et al., 1985), o que pode ser indicativo de sua adaptação endofítica. Exibindo relativa sensibilidade ao pH alcalino (GARRITY et al., 2005), e demonstrando *in vitro* melhor adaptação ao pH ácido que *Azospirillum brasilense* ou *Azospirillum lipoferum* (MAGALHÃES et al., 1983), sugere-se que *Azospirillum amazonense* é possivelmente melhor adaptado aos solos brasileiros, que em sua maioria exibem pHs tendendo à acidez (RODRIGUES et al., 2008). *Azospirillum amazonense* é apto a fixar nitrogênio mesmo quando este está disponível no ambiente (HARTMANN et al., 1986), o que é particularmente interessante quando da inoculação desta bactéria em áreas nas quais em ciclos culturais anteriores tenha sido aplicada adubação nitrogenada.

Os fitormônios, principalmente o ácido indol-acético excretado por bactérias deste gênero, desempenham papel importante na promoção de crescimento vegetal (BASHAN &

HOLGUIN, 1997). Quando da associação *A. amazonense* x *Brachiaria*, foi detectado, além de atividade de FBN, taxas significativas de produção de auxina, demonstrando a habilidade de promoção de crescimento desta espécie (REIS JÚNIOR et al., 2006). Quarenta e dois isolados de *Azospirillum amazonense*, confirmados através de hibridização *in situ*, foram avaliados em sua produção de hormônios auxínicos e atividade da enzima nitrogenase *in vitro*, seguindo de ensaios sobre os efeitos da inoculação destes isolados em plantas de arroz em casa de vegetação. Todas as estirpes testadas produziam hormônios auxínicos, tendo 10% delas exibido taxas elevadas de produção (cerca de 1,33  $\mu\text{M}\cdot\text{mg}$  proteína<sup>-1</sup>). A atividade da nitrogenase foi variável, e 9% dos isolados exibiram alta atividade, enquanto 54% deles demonstraram um potencial relativamente baixo. Nos experimentos em casa de vegetação, a inoculação aumentou a acumulação de matéria seca (7 a 11,6%), o número de panículas (3 a 18,5%) e a acumulação de nitrogênio na maturação dos grãos (3,5 a 18%), e a contribuição em N derivado da fixação biológica, estimada pela técnica de diluição do isótopo <sup>15</sup>N chegou a 27% (RODRIGUES et al., 2008). Quantificou-se a população de *Azospirillum amazonense* em diferentes espécies de *Brachiaria*, onde a variação foi de 10<sup>3</sup> a 10<sup>7</sup> células por grama de raízes, dependendo da área amostrada, da espécie de *Brachiaria* avaliada e das condições edafoclimáticas. Destes isolados, todos foram capazes de produzir de AIA, a uma razão de 35 a 110  $\mu\text{M}$  (REIS JÚNIOR et al., 2004).

A associação entre bactérias do gênero *Azospirillum* e *Poaceae* foi investigada por Ramos e colaboradores (2002) com a utilização de marcação com os genes repórter GFP e GUS, e plantas de trigo foram as hospedeiras experimentais, e *Azospirillum brasilense* estirpe FP2 recebeu os plasmídeos pHRGFPGUS e pHRGFPTC. Os autores detectaram agregados celulares e bactérias individuais a superfície de raízes jovens, pelos radiculares e raízes laterais, além de grandes alomerados celulares nas regiões de emergência de raízes laterais e espaços intercelulares de células epidérmicas aos 30 DAI. Enfatizam ainda que apesar de não ter sido possível detectar as bactérias nos tecidos corticais internos e xilema, a fase inicial de colonização foi bem detalhada.

Muito embora Sant'Anna e colaboradores tenham publicado em 2011 uma série de protocolos de manipulação específicos para *Azospirillum amazonense* estirpe Y2, não houve até o presente a comunicação de ensaios de detalhamento da colonização endofítica ou associação rizosférica desta espécie com a utilização de expressão de genes repórter.

### 2.3.2 *Burkholderia tropica*

Bactérias do gênero *Burkholderia* são pertencentes à classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales* e família *Burkholderiaceae*, que inclui bactérias tanto facultativa quanto estritamente aeróbicas. São encontradas nos mais variados habitats, e aproximadamente metade das espécies é patogênica para plantas ou animais. Entretanto, muitos membros do gênero também produzem efeitos benéficos, inclusive atuando como antagonistas a organismos fitopatogênicos, principalmente fungos. O gênero *Burkholderia* é formado por bactérias móveis e Gram-negativas, que acumulam PHB como reserva de carbono (GARRITY et al., 2005).

Bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* são comuns e abundantes em inúmeras plantas e o conhecimento de sua ecologia é importante para melhor exploração desta associação (PERIN et al., 2006b). Consideradas muito abundantes no ambiente, sua plasticidade genômica e capacidade de adaptação as tornam aptas a colonizar diversos nichos ambientais, sendo encontradas em associação com ampla gama de hospedeiros, colonizando seus tecidos internos e superfícies (COMPANT et al., 2008). As primeiras bactérias do gênero *Burkholderia* com atividade FBN foram isoladas a partir de plantas de arroz em solo

vietnamita (GILLIS et al., 1995), tendo sido isoladas no Brasil na rizosfera de banana e abacaxi (WEBER et al., 1999), bem como em folhas desinfestadas de cana-de-açúcar (PERIN et al., 2006b) e plantas de milho (CABALLERO-MELLADO et al., 2004).

Em investigação de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas com plantas de milho e café em condições de campo, foram detectadas várias espécies de bactérias do gênero *Burkholderia* (ESTRADA-DE LOS SANTOS et al., 2001; 2002), e diversos gêneros de *Burkholderia* foram isolados da rizosfera, rizoplano e endorrizosfera de tomate, incluindo *B. tropica* (PERIN et al., 2006a), assim como dos tecidos internos de trigo, tremoço e milho na França e na Austrália (BALANDREAU et al., 2001). Além da recorrente associação de *Burkholderia* com os tecidos vegetativos das plantas, isolou-se *B. tropica* tanto a partir do caule quanto dos frutos de abacaxizeiros no Brasil (CRUZ et al., 2001), além de outras espécies do gênero em raízes, caule, sementes, frutos e polpa de café (VEGA et al., 2005) e nódulos de leguminosas (COMPANT et al., 2008). Em adição aos habitats endofíticos ocupados, bactérias deste gênero colonizam, além das plantas e do solo rizosférico, as hifas e esporos de fungos micorrízicos (COMPANT et al., 2008), o que demonstra o caráter cosmopolita do gênero. Algumas estirpes de bactérias do gênero *Burkholderia* foram capazes de causar riscos à saúde de pacientes com fibrose cística em infecções oportunistas (MAHENTHIRALINGAM et al., 2005) e, devido a isto, os estudos de filogenia e aplicação desta bactéria devem ser realizados com alto rigor (PERIN et al., 2006b).

O Quadro 3 sumariza as atividades benéficas de potencial agrícola realizadas por bactérias do gênero *Burkholderia* não-patogênicas associadas a plantas.

**Quadro 4.** Principais propriedades benéficas de aplicação agrícola de *Burkholderia spp.* endofíticas

<p><b>Biocontrole</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Secreção de sideróforos</li><li>• Secreção de antibióticos</li><li>• Indução de defesas vegetais (lipopolissacarídeos, sideróforos, etc)</li></ul> <p><b>Resistência das plantas contra estresses abióticos</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Indução de resistência sistêmica e outros mecanismos</li></ul> <p><b>Promoção de crescimento vegetal</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Fixação biológica de nitrogênio</li><li>• Nodulação</li><li>• Sequestro de ferro</li><li>• Solubilização de fósforo</li><li>• Produção de fitormônios</li></ul>
--

Adaptado de Compant et al (2008)

As propriedades benéficas das bactérias do gênero *Burkholderia spp.* indicam sua potencial utilidade como substitutos ou complementares aos agentes químicos aplicados no manejo de enfermidades das plantas (COMPANT et al., 2008). Bactérias deste gênero demonstraram aptidão para biorremediação, sendo capazes de degradar compostos xenobióticos e herbicidas, além de atuarem no controle biológico de inúmeros fungos (PERIN et al., 2006b).

*Burkholderia tropica* foi primeiramente isolada em investigação de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes da rizosfera e tecidos internos de cana, milho e teosinto no Brasil, México e África do Sul, onde foi recuperada de plantas crescendo em regiões com clima variando de temperado sub-úmido a quente úmido (REIS et al., 2004). A capacidade de fixação biológica de nitrogênio por *Burkholderia tropica* foi re-confirmada através da

avaliação da estrutura gênica e técnica de cultivo em atmosfera controlada rica em  $^{15}\text{N}_2$  de várias estirpes pertencentes a sete diferentes espécies endofíticas do gênero, ocasião em que todas tiveram seus genes *nifH* avaliados e foram capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (MARTÍNEZ-AGUILAR et al., 2008). A produção de exoheteropolissacarídeo pela estirpe Ppe8 de *Burkholderia tropica* foi avaliada, desvendando-se a estrutura desta molécula, que provavelmente está ligada ao processo de aderência e colonização das bactérias às células das monocotiledôneas hospedeiras (SERRATO et al., 2008).

Em adição à atividade de fixação biológica de nitrogênio, a rizosfera das plantas hospedeiras de *Burkholderia tropica* são beneficiadas por outras atividades da bactéria, como a alta capacidade de dissolução de fosfatos, detectada em isolados de *B. tropica* obtidos da rizosfera e rizoplano de plantas de tomate no México, além de elevada produção de sideróforos, indicando que este gênero pode desenvolver grande atividade de biocontrole de patógenos (CABALLERO-MELLADO et al., 2007).

### 2.3.3 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Pertencente à classe *Alphaproteobacteria*, ordem *Rhodospirillales* e família *Acetobacteraceae*, o gênero *Gluconacetobacter* é formado por bactérias gram-negativas, obrigatoriamente aeróbias e não fermentativas, com temperatura de crescimento ideal de 30°C (GARRITY et al., 2005).

*Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria diazotrófica endofítica (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988) Gram-negativa e ácido-tolerante, que cresce mesmo em alta concentração de sacarose (10%) e pH muito baixo (3,0), tendo capacidade de fixar nitrogênio em condições de microaerofilia (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988). Há indícios de que *Gluconacetobacter diazotrophicus* não sobrevive no solo sem a presença de uma planta hospedeira, o que confirmaria seu hábito endofítico, além disso, baixas concentrações de  $\text{O}_2$  no ambiente são necessárias para a expressão e funcionamento da enzima nitrogenase (JAMES & OLIVARES, 1998).

Obtidas, inicialmente, a partir de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar cultivada nos estados de Alagoas, Pernambuco e Minas Gerais, *Pennisetum purpureum*, batata-doce e café (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; PAULA et al., 1991; JIMENEZ-SALGADO et al., 1997), além de variedades de cana-de-açúcar cultivadas na Austrália, Cuba, Argentina e México (LI & MACRAE, 1991; FUENTES-RAMIREZ et al., 1993; DONG et al., 1994; BELLONE et al., 1997), e a partir de arroz e chá na Índia (DUTTA & GACHHUI, 2006; MUTHUKUMARASAMY et al., 2005). Foi detectada em raízes, colmos, palhada, solo da rizosfera e seiva xilemática de cana-de-açúcar (REIS, 1991; PERIN, 2003). Há registros de detecção de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em hemípteros de cana-de-açúcar, indicando que estes são vetores de disseminação deste microrganismo (ASHBOLT & INKERMAN, 1990).

*Gluconacetobacter diazotrophicus* é encontrada em elevada quantidade no interior do colmo da cana-de-açúcar, sendo a bactéria mais estudada nesta cultura, pois possibilita a fixação de nitrogênio, mesmo na presença de nitrato prontamente disponível no solo (STEPHAN et al., 1991), uma vez que não possui a enzima redutase do nitrato (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988). A atividade de sua nitrogenase é estimulada em culturas mistas, demonstrando adaptação aos tecidos internos de cana-de-açúcar (COJHO et al., 1993).

A melhor fonte de carbono para seu crescimento é a sacarose 10%, mas há crescimento significativo mesmo em concentrações mais elevadas (30%). Uma vez que a sacarose não pode ser transportada ou respirada por *Gluconacetobacter diazotrophicus*, sua

assimilação ocorre através da secreção de uma enzima extracelular, a levanasacarase, capaz de hidrolisar a sacarose a frutose e glicose (GILLIS et al., 1989; MARTINEZ-FLEITES et al., 2005).

A população nativa ou inoculada de *G. diazotrophicus* presente em plantas de cana-de-açúcar, diminui drasticamente com o avançar da idade da planta (PERIN, 2003) e a aplicação de fertilizante nitrogenado a afeta drasticamente, provocando redução do número populacional em variedades de cana-de-açúcar cultivadas na Índia (MUTHUKUMARASAMY, 1999). A técnica de imunocaptura em amostras de solo de canaviais e cafezal possibilitou a detecção de bactérias do gênero *Gluconacetobacter* de amostras de solo das plantas de café, mas não de amostras de solo de canaviais (SANTOS et al., 2006), enfatizando seu caráter endofítico.

Além de fixar nitrogênio, *Gluconacetobacter diazotrophicus* produz hormônios de crescimento como auxina e giberelina (FUENTES-RAMIREZ et al., 1993; MADHAIYAN et al., 2006) e apresenta potencial antagonístico contra o fungo *Colletrotrichum falcatum*, agente etiológico da podridão vermelha da cana, provavelmente devido à sua capacidade de fermentar os açúcares e reduzir do pH do meio para menos de 3,0 (MUTHUKUMARASAMY et al., 2000). A produção de ácidos por *Gluconacetobacter diazotrophicus* é também interessante devido à possibilidade de solubilização de fosfatos insolúveis, verificada em ensaios conduzidos em caldo de cana (MAHESHKUMAR et al., 1999).

Logeshwaran e colaboradores (2009) investigaram isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* obtidos de raízes de cana e detectaram a produção de sideróforos, que desempenham um papel vital na supressão de patógenos por quelação, e comentam que a produção destes compostos sob condições de estresse de ferro confere esses organismos antagonísticos como uma vantagem adicional, resultando na exclusão de patógenos.

*Gluconacetobacter diazotrophicus* inicia a colonização de plantas de cana geralmente pelas raízes e superfícies epidérmicas da região inferior do caule, utilizado ápices radiculares e junções das raízes laterais para penetrar, distribuindo-se por toda a planta através do fluxo transpiratório. É possível que vasos do xilema na parte aérea densa de plantas maduras sejam também um local de fixação do N<sub>2</sub> por bactérias diazotróficas, proporcionando a baixa concentração de O<sub>2</sub> e energia da sacarose necessárias para a atividade da nitrogenase (JAMES et al., 1994).

A associação da estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e plantas de arroz e tecidos de cana foi investigada por Rouws e colaboradores (2010), que visualizaram o ancoramento de *G. diazotrophicus* na rizosfera de plântulas desinfestadas de arroz em sistema hidropônico com auxílio do gene repórter GFP, localizando as bactérias principalmente nas zonas de emergência de raízes laterais e ápices radiculares. Nas raízes de cana micropropagada inoculada as bactérias expressando atividade de β-glucuronidase foram detectadas, mas não houve detalhamento da colonização pelos autores. O uso do gene repórter GFP também foi útil na investigação do papel de exopolissacarídeos secretados por *Gluconacetobacter diazotrophicus* no processo de colonização de raízes de arroz hidropônico (MENESES et al., 2011).

#### **2.3.4 *Herbaspirillum seropedicae***

Representantes da classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales* e família *Oxalobacteraceae*, o gênero *Herbaspirillum* é formado por bactérias móveis, vibróides e gram-negativas. São capazes de fixar N<sub>2</sub> atmosférico sob condições microaeróbias e apresentam bom crescimento exclusivamente com esta fonte de N, mesmo na presença de

10% de sacarose. As condições ótimas de crescimento são 30 a 34°C e pH 5,3 a 8,0 (GARRITY et al., 2005), o que demonstra a plasticidade da espécie, que tolera variações relativamente grandes de pH. Ocorrem endofiticamente em associação principalmente com *Poaceae*, nas quais colonizam raízes, caules e folhas (GARRITY et al., 2005). A espécie representa um grupo de estirpes muito uniforme, quando comparadas suas características fisiológicas (BALDANI et al., 1986).

São endófitos de ampla gama associativa, que colonizam cana de açúcar, arroz, trigo, sorgo e outros cereais (BHATTACHARJEE et al., 2008), e possuem atividade de nitrogenase mais tolerante ao O<sub>2</sub> (pO<sub>2</sub> até 3%, contra 2% do gênero *Azospirillum*), além de tolerarem uma faixa de pH mais ampla (BALDANI et al., 1986). Como é comum nos organismos endofíticos, *Herbaspirillum seropedicae* apresenta baixa sobrevivência em solo natural, porém é menos afetado em solos estéreis, o que sinaliza que fatores bióticos como a competição microbiana interferem na sobrevivência dessa bactéria no solo nativo (OLIVARES et al., 1996), sendo as bactérias do gênero *Herbaspirillum*, e em especial *H. seropedicae*, as mais eficientes na colonização inicial de raízes de plântulas de cana micropropagadas (OLIVEIRA et al., 2009).

*Herbaspirillum seropedicae* exibe colonização ativa de plantas hospedeiras através das sementes, por propagação vegetativa e também por material vegetal morto (BALDANI et al., 1992; OLIVARES et al., 1996). Espécies do gênero *Herbaspirillum* colonizam plantas distribuídas entre vários táxons, como trigo, milho, arroz, sorgo, cana-de-açúcar, forrageiras da família *Poaceae*, palmeiras oleaginosas, bananeira, abacaxizeiro e plantas fibrosas C4 (BALDANI et al., 1986; BALDANI et al., 1997; FERREIRA et al., 1995; OLIVARES et al., 1996; JAMES et al., 1997; WEBER et al., 1999; MAGALHÃES CRUZ et al., 2001; KIRCHHOF et al., 2001), tendo sido recuperada a partir de vários órgãos vegetais, como raízes, folhas e colmos de *Poaceae* de interesse econômico, como cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1997) e ocasionalmente de sementes de cereais (BALDANI et al., 1992). Quando inoculada em folhas de cana, *Herbaspirillum seropedicae* não se difunde nos vasos xilemáticos, permanecendo no local da inoculação (JAMES et al., 1997). Nas raízes, as bactérias aderem-se ao longo do eixo radicular da planta de cana e invadem os tecidos internos principalmente nas junções das raízes secundárias, ocupando os espaços intercelulares e colonizando o xilema (BALDANI et al., 1997), enquanto que em raízes de arroz, colonizam inicialmente as células epidérmicas da superfície radicular e só então invadem os espaços intercelulares (BALDANI et al., 1995).

Durante a investigação dos processos de colonização e os benefícios da interação entre espécies do gênero *Herbaspirillum* e plantas de arroz, foi observado um maior número de *Herbaspirillum seropedicae* no aerênquima e espaços intercelulares das raízes, bem como no xilema de partes aéreas (JAMES et al., 2002). Variedades de arroz tolerantes ao alumínio colonizadas pela estirpe Z67 de *Herbaspirillum seropedicae* exibiram aumento do crescimento e acumulação de nitrogênio (GYANESHWAR et al., 2002).

Na fase inicial de colonização, *Herbaspirillum seropedicae* fixa-se à superfície radicular, aderindo ao rizoplano, seguida da colonização dos pontos de emergência de raízes laterais e penetração nas discontinuidades da epiderme, aparentemente envolvendo secreção de substâncias adesivas, sem degradação de paredes celulares por reações enzimáticas (MONTEIRO et al., 2012). Este padrão de infecção oferece a oportunidade de *Herbaspirillum seropedicae* ocupar o cilindro vascular após a invasão cortical, antes da diferenciação da endoderme (RONCATTO-MACCARI et al., 2003). Estudos com os genes *rfbB* e *rfbC*, envolvidos na biossíntese de lipopolissacarídeo (LPS) em *Herbaspirillum seropedicae* demonstraram que sua expressão é necessária para sua competência rizosférica e a associação endofítica em plantas de milho (BALSANELLI et al., 2010). Plantas de cana da variedade SP70-1143 inoculadas com uma mistura de *Herbaspirillum* (*H. seropedicae* e *H.*

*rubrisubalbicans*) apresentaram maior população de *H. seropedicae* associadas às raízes; ambas as espécies foram capazes de colonizar o sistema radicular, mas em locais diferentes, indicando algum antagonismo (OLIVEIRA et al., 2009).

Ensaio realizados com utilização de *Herbaspirillum seropedicae* marcado com gene repórter GFP demonstraram que em tecidos de cana-de-açúcar ocorreu elevada multiplicação da estirpe inoculada no tecido parenquimático, quando comparado ao crescimento em vasos xilemáticos, inferindo que o xilema funciona como transportador da espécie na planta, juntamente com o fluxo de água, e que a multiplicação se dá em regiões mais abundantes em fontes de carbono (NJOLOMA et al., 2005). Em ensaios com plântulas micropropagadas livres de bactérias e com plântulas não estéreis provenientes de toletes germinados detectaram a bactéria marcada intercelularmente no colênquima e região parenquimática em maiores densidades e frequências que nos feixes vasculares, além de extensiva colonização nos tecidos da base do colmo (NJOLOMA et al., 2006a e 2006b). Ensaio com plântulas de milho exibiram a endoderme e o cilindro central colonizados por *H. seropedicae* estirpe RAM4 (marcada com proteína DsRed) vinte e duas horas após a inoculação e 72 horas após a inoculação, a bactéria havia alcançado os vasos xilemáticos (MONTEIRO et al., 2008).

### 2.3.5 *Herbaspirillum rubrisubalbicans*

Anteriormente classificada como *Pseudomonas rubrisubalbicans*, e reclassificada em 1996 por Baldani e colaboradores, através de dados de hibridização DNA:rRNA, O epíteto específico deriva de *ruber* (vermelho) e *subalbicans* (esbranquiçado) fazendo referência aos sintomas da “estria mosqueada”, caracterizada pelo desenvolvimento de estrias vermelhas com manchas brancas nas folhas de variedades susceptíveis de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1997). Ainda não foi possível isolar esta bactéria do solo, informação que sugere seu estabelecimento endofítico, que sabidamente pode exibir patogenicidade ou não, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* pode causar os sintomas de “estria mosqueada” na variedade comercial B-4362 de cana de açúcar (GALLI et al., 1980) e estrias vermelhas em variedades de sorgo. Após investigação de muitos genótipos, não foi detectado outro genótipo de cana susceptível, mesmo após ensaios de inoculação artificial (PIMENTEL et al., 1991). Apesar do exposto, a “estria mosqueada” é considerada uma doença de pouca importância econômica, pois está restrita a poucas variedades e não causa a morte da planta (OLIVARES et al., 1997).

Em condições de aerobiose, tanto *Herbaspirillum seropedicae* quanto *Herbaspirillum rubrisubalbicans* demonstraram significativa produção de compostos indólicos promotores de crescimento vegetal (RADWAN et al., 2005), demonstrando aptidão para a promoção de crescimento vegetal de ambas espécies. Investigações sobre os genes expressos pela cana quando inoculada com *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* geraram uma grande quantidade de dados que demonstraram uma participação ativa do hospedeiro na interação, respondendo a diversos processos metabólicos durante a associação (NOGUEIRA et al., 2001), em especial com a redução da expressão de genes relacionados à defesa contra patógenos (VINAGRE et al., 2006).

*Herbaspirillum rubrisubalbicans* é capaz de colonizar a parte aérea de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, via infecção das aberturas estomáticas no limbo foliar. E assim como *H. seropedicae*, coloniza todo o eixo radicular em monocamada, com maior frequência de bactérias nas zonas de diferenciação, alongamento e formação de pelos, colonizando o interior das raízes pela infecção nas zonas de emergência de raízes laterais e rupturas epidérmicas, ocupando os espaços intercelulares corticais e invadindo o cilindro central, passando ao xilema (OLIVARES, 1997).

Ensaio de imunomarcção da nitrogenase demonstraram a expresso da mesma por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* em densas colnias em espaos intercelulares de folhas de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1997) e no protoxilema de folhas de sorgo (JAMES et al., 1997).

Investigaes com uso de inoculaao de cinco diferentes espcies de bactrias diazotrficas endofiticas simultaneamente em cana micropropagada, avaliadas por imunomarcção com sondas fluorescentes demonstraram que *Herbaspirillum* (*H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*) exibiam predominncia de colonizaao radicular quando comparada a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, sendo detectadas aderidas a superfcie radicular e rizoderme, formando microcolnias no apice radicular e na regio de emergncia de raizes laterais (OLIVEIRA et al., 2009).

## 2.4 Sistema de Marcao Molecular – Gene repórter *gfp*

Um gene repórter é um gene ligado em uma construo genética a um outro gene de interesse em cultura de células, animais ou plantas, que possui caractersticas que conferem aos organismos que os expressam a pronta identificao (SØRENSEN & NYBROE, 2006). Geralmente sã usados para determinar se o gene de interesse foi inserido ou expresso na populao de células ou no organismo. Os genes repórter comumente utilizados na identificao e monitoramento *in loco* de bactrias inoculadas em qualquer ambiente, sendo possvel tambm a quantificao dos microrganismos por meio de mtodos de deteco oica como microscopia de epifluorescncia e citometria de fluxo (AHMAD et al., 2011).

Para introduzir um gene repórter em um organismo, seja em uma cultura de bactrias ou células eucarióticas, utiliza-se uma construo de DNA plasmidial, que é uma molécula circular contendo tanto o gene de interesse quanto os genes necessrios para sua expresso. É importante utilizar um gene repórter que no seja naturalmente expresso nas células ou organismo em estudo, pois a expresso do repórter é usada como um marcador para o sucesso da introduo do gene de interesse (SØRENSEN & NYBROE, 2006). Estas construes geralmente sã expressas com o auxlio do uso de presses seletivas com antibióticos, pois geralmente possuem um gene de resistncia associado (SAMBROOK et al., 1989). Elementos de transposio (que se integram ao DNA cromossomal) foram tambm desenvolvidos para estudos de colonizaao da rizosfera de bactrias associadas com plantas, como na associao *Herbaspirillum*-arroz (ELBELTAGY et al., 2001).

Os genes repórter mais comumente utilizados induzem caractersticas visualmente identificveis, sendo utilizado frequentemente o gene *gfp*, da gua-viva *Aequorea victoria* (AHMAD et al., 2011), codificador de uma proteina que exibe brilho verde quando sob luz ultravioleta (SØRENSEN & NYBROE, 2006).

Em estudos que envolvam a marcao de microrganismos com o gene repórter, deve-se investigar se a herana estvel do gene inserido est assegurada, alm de buscar evitar que ocorra a transferncia do gene marcador entre as populoes do ecossistema (CEBOLLA et al, 1993; ALVARADO et al, 2004). Devido aos possveis riscos associados a disseminao de microrganismos geneticamente modificados no ambiente e a normas de biossegurana, a maioria dos estudos conduzidos com microrganismos geneticamente modificados, que expressam o gene repórter, sã realizados em culturas gnotobióticas e em ambiente controlado. Aplicaes destes mtodos na rea de ecologia microbiana utilizam ferramentas de deteco de estirpes marcadas atravs de genes repórter que, de maneira geral, sã realizados atravs da introduo de genes marcadores, facilitando o monitoramento de estirpes bacterianas especficas (MERCANTE et al., 2000). Estes genes codificam substncias como enzimas que atuam em diferentes substratos, fornecendo produtos coloridos ou

fluorescentes que podem ser identificados ou medidos com relativa facilidade (JEFFERSON, 1989; WILSON, 1995).

A proteína verde fluorescente (GFP) é uma pequena proteína originalmente isolada de *Aequorea victoria* (um cnidário) e tem sido usada como um marcador muito eficiente para estudos de interações planta-microrganismos (CHALFIE et al., 1994; GAGE et al., 1996; ERRAMPALLI et al., 1999), que oferece uma metodologia simples de preparo das amostras para análise microscópica de fluorescência, gerando estruturas bacterianas e vegetais intactas e muito bem preservadas (RAMOS et al., 2002). A primeira aplicação de GFP isolado da água-viva *A. victoria* como um repórter (CHALFIE et al., 1994) foi um marco da biologia moderna. Esta marcação é utilizada em uma vasta gama de áreas da biologia e da biotecnologia (AHMAD et al., 2011). As vantagens em se usar a GFP em comparação com outros repórteres ou corantes é que ela está presente nas células que geram um produto de expressão gênica, e sua visualização não requer fixação ou protocolos de preparo, como substratos ou energia adicional. A GFP é detectada através de sua excitação por luz UV azul, eliminando o uso de cofatores e substratos para sua visualização (VALDIVIA & FALKOW, 1996). Adicionalmente, células marcadas com GFP podem ser utilizadas para análises quantitativas por PCR (UTERMARK & KARLOVSKY, 2006). As desvantagens da GFP são que sua estrutura, e conseqüentemente sua fluorescência, são dependentes do pH e da presença de oxigênio (HEIM et al., 1994), características que podem prejudicar ensaios *in vivo*. Apesar disso, *Rhizobium* marcado com um derivado do GFP, foi bem visualizado em bacteróides presentes em nódulos radiculares, um ambiente sabidamente limitante em oxigênio (STUURMAN et al., 2000).

Antes da utilização da GFP, é preciso investigar o background de autofluorescência, também chamado “ruído ambiental” em que a bactéria será analisada. A areia e outras partículas do solo, certas estruturas das plantas e organelas como cloroplastos podem dificultar seriamente a visualização da GFP. Tais problemas podem ser resolvidos através de outras proteínas autofluorescentes (AFPs) com diferentes comprimentos de onda de excitação e emissão no espectro (BLOEMBERG, 2007).

A GFP fluoresce verde e requer apenas a presença de oxigênio para maturar, não exigindo nenhum composto externo para que ela seja detectada (CHALFIE et al., 1994). A GFP não interfere no crescimento do hospedeiro, sendo aplicada a estudos não invasivos de comunidades bacterianas ou outros sistemas, diferentemente da proteína vermelha fluorescente, ou DsRed, isolada do coral *Discosoma striata* (MATZ et al., 1999), que tem como barreira para seu uso eficiente a lenta maturação, devido à tetramerização requerida para suas propriedades fluorescentes, além de suas propriedades tóxicas quando produzida em demasia.

A maior desvantagem da GFP é que uma vez formada, parece ser muito estável, o que, por sua vez torna a proteína de menor valor em estudos de expressão de genes transientes (BLOEMBERG, 2007). Existe uma boa variedade de proteínas derivadas da GFP original com propriedades espectrais deslocadas, que emitem fluorescências de diferentes cores como azul (ECFP), verde (EGFP) e amarelo (EYFP) (STUURMAN et al., 2000), originadas de modificações estruturais na GFP original, que têm deslocamento no comprimento de onda de excitação e emissão, oferecendo a oportunidade de usar fluorescências múltiplas um mesmo sistema, com o objetivo de diferenciar diversas células ou visualizar diferentes processos em uma única célula (AHMAD et al., 2011), podendo facilitar estudos de infecção conjunta. Em infecções mistas, as metodologias costumam se apresentar muito laboriosas quando se emprega métodos sorológicos ou de resistência a antibióticos e, nestes casos, é possível determinar a ocupação pelo exame direto do padrão de coloração dos microrganismos, como realizado em estudo com *Rhizobium tropici* marcado com *gusA* (WILSON et al., 1996).

Estudos de comportamento de células bacterianas rizosféricas foram realizados com o auxílio da técnica de marcação com GFP (TOMBOLINI et al., 1999, BLOEMBERG et al., 2000) e o uso concomitante de fusões do tipo GFP/GUS na rotulagem de estirpes bacterianas aumentam a flexibilidade dos ensaios de colonização, combinando as informações provenientes de ambos os sistemas repórter (RAMOS et al., 2002).

Células de *Azospirillum* foram avaliadas quanto à aderência em raízes de plantas de milho utilizando o gene repórter GFP, sendo prontamente encontradas, particularmente no ápice radicular e na zona pilífera, assim como em depressões formadas entre as células epidérmicas, demonstrando os principais nichos ocupados, com alta densidade de células (RUSSO et al, 2005).

Usando fusões genéticas do gene codificador da Fe-proteína da nitrogenase (*nifH*) com o gene para a GFP (proteína verde fluorescente) foi mostrado que o aerênquima de plântulas jovens de arroz oferece condições adequadas para alta atividade de expressão da nitrogenase apoplástica em culturas com *Azoarcus sp.* BH72 (EGENER et al., 1998, 1999; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1998b).

O estabelecimento de *Gluconacetobacter diazotrophius* em plântulas de arroz foi avaliado com a inoculação de *G. diazotrophicus* portadora do gene repórter *gfp*, onde foi possível visualizar por microscopia agregados bacterianos e células isoladas ao longo de todo o eixo radicular, mais frequentemente nas regiões de emergência de raízes secundárias e nas proximidades do ápice, sendo possível localizar frequentemente células isoladas e agregados menores na superfície dos pelos radiculares (ROUWS et al, 2010). Os mesmos autores verificaram a viabilidade de utilização do marcador GUS em ensaio com *G. diazotrophicus* em cana-de-açúcar micropropagada. No mesmo tipo de sistema hidropônico o gene repórter GFP também foi utilizado na investigação do papel de exopolissacarídeos secretados por *Gluconacetobacter diazotrophicus* no processo de colonização do sistema radicular de arroz (MENESES et al., 2011).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Estirpes bacterianas e meios de cultura

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas as estirpes CBAmC de *Azospirillum amazonense*, PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*, presentes no inoculante para cana e depositadas na Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia sob os códigos BR11115, BR11281 BR11504 e BR11335, respectivamente.

Apesar de *Burkholderia tropica* estirpe Ppe8 estar presente na formulação do inoculante de cana, esta bactéria não foi contemplada por este estudo, devido a restrições estabelecidas pelo CTNBIO, que orienta a manipulação genética de bactérias. O gênero *Burkholderia* é enquadrado na classe de risco 2 (BRASIL, 2010), e o Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia não dispõe de laboratório apropriado para trabalhar com OGM da classe 2.

Os cultivos das estirpes em estudo foram realizadas utilizando-se o meio rico Dygs com pH 6,0 (glicose, 2 g.L<sup>-1</sup>; peptona, 1,5 g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 2,0 g.L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g.L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g.L<sup>-1</sup>; ácido glutâmico, 1,5 g.L<sup>-1</sup>) (RODRIGUES NETO et al., 1986) quando o objetivo foi a multiplicação rápida das células. Em situações nas quais era desejado reduzir o risco de contaminação, bem como selecionar crescimento exclusivo de bactérias diazotróficas, fez-se uso de meios sólido ou semi-sólido, de acordo com a ocasião (Quadro 5).

**Quadro 5.** Estirpes bacterianas e meios de cultura semi-seletivos empregados neste estudo.

Espécie bacteriana	Estirpe	Meio de cultura
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	BR11281 (PAL5)	LGI-P
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BR11335 (HRC54)	JNFB
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	BR11504 (HCC103)	JNFB
<i>Azospirillum amazonense</i>	BR11115 (CBAmC)	LGI

#### 3.2 Curvas de Crescimento

Para avaliar o ritmo de crescimento das estirpes foi determinada a curva de crescimento estudadas das mesmas em meio Dygs. Partiu-se de um pré-inóculo de cada estirpe preparado na tarde anterior, proveniente de uma colônia isolada e inoculada em cinco mililitros de meio Dygs líquido em tubo de ensaio e mantida a 30°C e 200 rpm por aproximadamente 12 horas. Uma alíquota destes pré-inóculos foi utilizada em quantidade suficiente para que erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 50 mL do mesmo meio fossem inoculados, uniformizando-as a 0,005 de absorbância em espectrofotômetro a uma densidade óptica (D.O.) de 600 nm, mantidos nas mesmas condições de cultivo, e a D.O. foi acompanhada. O ponto de coleta de células para transformação com os plasmídeos repórter foi estabelecido de acordo com o ritmo biológico de crescimento das culturas, onde o melhor estágio do desenvolvimento é durante a fase de crescimento exponencial, quando há uma maior quantidade de células viáveis em plena atividade metabólica.

### 3.3 Plasmídeos disponíveis

Há uma ampla gama de plasmídeos portadores de genes repórter já construídos e publicados e alguns o Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia dispõe de alguns deles para ensaios de marcação. Para este estudo, foram selecionados os plasmídeos listados no Quadro 6, baseando-se na avaliação de regiões promotoras compatíveis e genes de resistência a antibióticos adequados. Para multiplicação destes, utilizaram-se estirpes de *Escherichia coli* apropriadas, assim como para experimentos de transferência por conjugação.

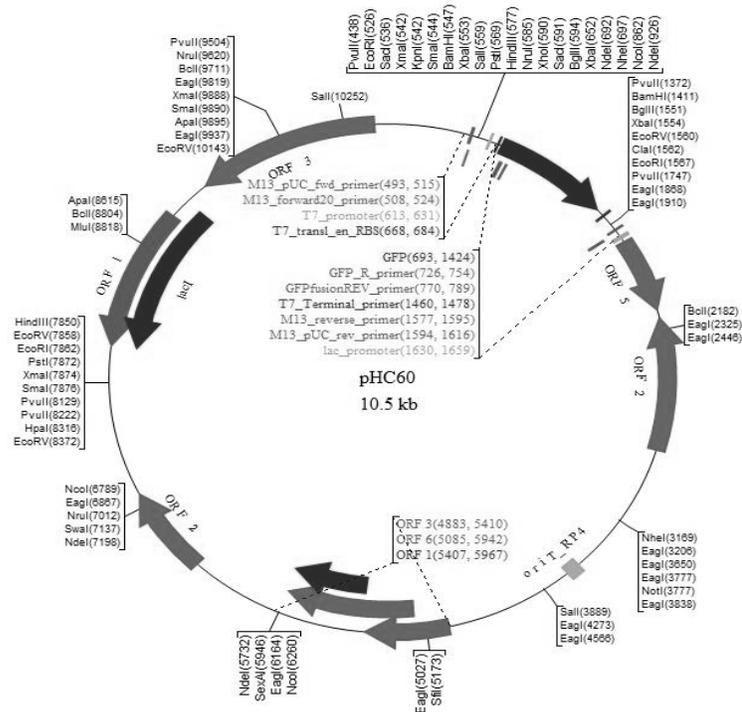
**Quadro 6.** Plasmídeos disponíveis para uso nos experimentos de transformação

Plasmídeo	Descrição	Referência
pMP4641	ECFP, Tc <sup>r</sup>	
pMP4658	EYFP, Tc <sup>r</sup>	BLOEMBERG et al., 2000.
pMP4662	RFP, Tc <sup>r</sup>	
pHRGFPTc	GFP, Tc <sup>r</sup>	
pHRGFPGUS	GFP, GUS, Km <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup>	RAMOS et al., 2002.
pTNGFPGUS	GFP, GUS, Km <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup>	SCHWAB et al., não publicado.
pTnMod-OGmKmlacZ	lacZ, Gm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , sem promotor	SCHWAB et al., 2007.
pHC 60	GFP, Tc <sup>r</sup>	CHENG & WALKER, 1998.
pRK2013	vetor de mobilização complementar, Km <sup>r</sup>	FIGURSKI & HELINSKI, 1979.
pUTKanGFP	Mini-Tn5-GFP, Km <sup>r</sup>	TOLKER-NIELSEN et al., 2000.
pUTKandsRed	Mini-Tn-5-DsRed, Km <sup>r</sup>	

As estirpes DH10B e DH5 $\alpha$  de *E. coli* portadoras dos plasmídeos de interesse foram cultivadas em meio LB (NaCl, 10 g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 5 g.L<sup>-1</sup>; triptona, 10 g.L<sup>-1</sup>; pH 7,0) líquido, suplementado com os antibióticos necessários para a manutenção dos plasmídeos, a 37°C sob agitação, por aproximadamente 16 horas.

Com o objetivo de gerar uma maior quantidade de DNA plasmidial para experimentos tanto de transformação quanto de obtenção de novos plasmídeos, realizou-se extrações em maiores volumes de cultura, conhecidas como “midi”-preparações de DNA plasmidial. Para tal, colônias transformantes das estirpes DH10B e DH5 $\alpha$  de *E. coli* portadoras dos plasmídeos de interesse foram cultivadas em meio LB líquido (cloreto de sódio, 10 g.L<sup>-1</sup>; extrato de levedura, 5 g.L<sup>-1</sup>; triptona, 10 g.L<sup>-1</sup>; pH 7,0), suplementado com os antibióticos necessários para a manutenção dos plasmídeos, a 37°C sob agitação, por aproximadamente 16 horas. Vinte mililitros de células foram coletadas por centrifugação a 4.000 rpm por 30 minutos, sendo descartado o meio sobrenadante e as células ressuspensas em 400  $\mu$ L de solução GET gelada (Tris-HCl, 25 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8,0; glicose, 50 mmol.L<sup>-1</sup>; EDTA 10 mmol.L<sup>-1</sup>), transferindo o material para microtubos estéreis. A lise se deu pela adição de 800  $\mu$ L de solução contendo NaOH 0,2 mmol.L<sup>-1</sup> e SDS 1% em banho de gelo. Adicionou-se então 600  $\mu$ L da solução KACF gelada (acetato de potássio 3 mol/L<sup>-1</sup> e ácido fórmico 1,8 mol/L<sup>-1</sup>, pH 4,8). Após a lise, realizou-se a centrifugação dos tubos a 12.000 rpm por 15

minutos a 4°C. Dois tubos novos receberam 800 µL provenientes do mesmo tubo centrifugado, formando duplicatas. Adicionou-se igual volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (24:1:1), com posterior agitação vigorosa. Após centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm, a fase aquosa foi removida por aspiração e transferida para microtubos novos. O DNA foi então precipitado, recebendo 1 mL isopropanol, seguido de agitação vigorosa e sendo deixado em repouso por aproximadamente 20 minutos a -20°C (freezer). A coleta do DNA foi feita por centrifugação durante 15 minutos a 12.000 rpm. O precipitado resultante foi suavemente ressuspenso, sem total dissolução do sedimento produzido, em 1 mL de etanol 70%, e novamente precipitado por centrifugação, por duas vezes consecutivas. Após secagem em estufa a 37°C por aproximadamente uma hora, para total evaporação do etanol residual, o DNA foi ressuspenso em 40 µL de água ultrapura estéril, permanecendo em agitador de microtubos com rotação de aproximadamente 60 rpm, à 50°C, por 20 minutos. Em seguida, as duplicatas foram reunidas em um único tubo, e seu volume foi ajustado para 250 µL. O material foi então quantificado por espectrofotometria em microgota e alíquotas de dois microlitros de cada amostra foram aplicadas em gel de agarose 0,8%, submetidos a eletroforese e fotografados após impregnação do material com brometo de etídeo para checagem visual de pureza.



**Figura 4.** Mapa do plasmídeo pHC60 (CHENG & WALKER, 1998), utilizado nos ensaios descritos nos resultados de experimentos de inoculação.

### 3.4 Procedimentos de preparo para transformação bacteriana

Para alcançar os objetivos propostos por este trabalho, buscou-se inserir os plasmídeos portadores dos genes repórteres já descritos nas estirpes bacterianas CBAmC de *Azospirillum amazonense*, HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae* e HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. A estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* portando genes repórter já se encontrava estocada para trabalho no LGB, portando os plasmídeos pHRGFPTc

e pHRGFP<sub>GUS</sub> (ROUWS et al, 2010), além de pMP4641, pMP4658 e pMP4662 (não publicado).

As etapas de marcação das estirpes consistem em: avaliação da susceptibilidade a antibióticos de seleção plasmidial e cromossomal, e ensaios de marcação propriamente ditos.

### 3.4.1 Testes de resistência a antibióticos em meio líquido e sólido

As estirpes bacterianas foram cultivadas em meio Dygs e as células foram coletadas por centrifugação a 3000xg por 10 minutos a 4°C e lavadas por duas vezes em água ultrapura estéril gelada seguido de nova coleta por centrifugação; e finalmente lavadas e ressuspensas em glicerol a 10% em água ultrapura estéril gelada. Este processo é denominado eletrocompetência (SAMBROOK et al., 1989), e tem como finalidade retirar todas as substâncias exógenas, secretadas pelas células ou provenientes do meio de cultivo, deixando as mesmas muito limpas e prontas para serem expostas ao campo elétrico que abrirá poros nas membranas celulares para penetração do DNA exógeno plasmidial.

Alíquotas de células nesta condição eletrocompetente foram submetidas ao processo de eletroporação, porém sem a presença de DNA plasmidial. Este procedimento eleva a resistência das culturas resultantes mesmo na ausência do plasmídeo portador do gene de resistência a antibiótico, provavelmente devido ao campo elétrico romper a membrana celular da maioria das células e as remanescentes serem naturalmente mais resistentes que as demais.

Uma alíquota de 100 µL de bactérias eletrocompetentes submetidas ao campo elétrico do eletroporador *BioRad Gene Pulser*® foram deixadas em repouso por duas horas em dois mililitros de meio rico Dygs a 30°C e agitação de 150 rpm.

Após o período de repouso, um microlitro de cada cultura foi aplicado em placa de 96 micropoços de fundo chato, com capacidade para 300 µL, contendo meio Dygs líquido com concentrações decrescentes dos antibióticos cujos genes de resistência estão presentes nos plasmídeos disponíveis para transformação – canamicina, ampicilina, tetraciclina e gentamicina. As placas foram vedadas com película plástica contendo micro-furos para aeração e mantidas a 30°C e 150 rpm por aproximadamente 16 horas. A avaliação se deu pela leitura da densidade óptica das culturas em comprimento de onda de 595 nanômetros.

As mesmas culturas eletroporadas foram aplicadas sobre a superfície de meio de cultura sólido semi-seletivo, disposto em placas de 12 poços de três mililitros cada, contendo concentrações decrescentes dos antibióticos de interesse. A avaliação ocorreu três dias após a incubação das placas em estufa a 30°C.

Uma vez que já existiam transformantes para a estirpe PAL5 disponíveis para pronto uso no laboratório, os testes foram realizados com vistas aos parâmetros de transformação das outras estirpes presentes no inoculante. Nos ensaios realizados foram utilizados meios semi-seletivos JNFb para as estirpes HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae* e HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; LGI suplementado com 20 mmol. L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl para a estirpe CBAmC de *Azospirillum amazonense*; e LGI-P para a estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, todos sem indicador de pH. A concentração mínima inibitória (CMI) a ser aplicada para inibição do crescimento de bactérias que não contém plasmídeos portadores da resistência é aquela aonde não foram detectadas colônias no meio após o período de incubação.

As concentrações de antibióticos foram novamente testadas, em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura Dygs sólido, com aplicação de cada estirpe com o auxílio de hastes flexíveis com pontas de algodão.

### **3.4.2 Testes de resistência das estirpes HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae* ao antibiótico tetraciclina**

O sucesso na transformação bacteriana só foi alcançado com as estirpes HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*, utilizando-se o plasmídeo pHC60. Uma vez que a tetraciclina é o antibiótico de seleção dos clones positivos para este plasmídeo e que estas estirpes foram muito sensíveis a ela, foi necessária a realização de testes mais apurados da resistência das estirpes HRC54 de e HCC103 contra este antibiótico, com doses menores, visto que é indicada a utilização de uma concentração mínima inibitória do antibiótico para que o metabolismo seja minimamente afetado por este interferente, evitando também que ocorressem problemas de seleção devido a possíveis resistências naturais das estirpes a esta substância.

### **3.5 Transformação bacteriana**

Com o objetivo de produzir bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio que expressassem diferentes genes repórter para sua diferenciação tanto entre as estirpes inoculadas conjuntamente quanto daquelas naturalmente presente nos tecidos internos da cana a ser inoculada experimentalmente, as estirpes em estudo HCC103, HRC54 e CBAmC de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum amazonense*, respectivamente, foram submetidas a diferentes procedimentos.

#### **3.5.1 Eletroporação**

As estirpes HRC54, HCC103 e CBAmC foram submetidas a diferentes protocolos de eletroporação conforme descrito por diversos autores (KLASSEN et al., 1999; ELBELTAGY et al., 2001; ROUWS et al., 2006; SCHWAB, 2006; SANT'ANNA et al., 2011) assim como a modificações dos mesmos.

O preparo básico para a obtenção de células aptas a uma transformação por eletroporação passa por uma etapa inicial de cultivo e coleta de células em estágio exponencial de crescimento em um meio de cultura líquido. As células-alvo são então coletadas por centrifugação e lavadas em soluções específicas tamponantes e reservadas para utilização posterior.

Nos resultados referentes a estes ensaios estão detalhados os protocolos e as modificações executadas nos mesmos.

#### **3.5.2 Conjugação**

Foram realizados experimentos de conjugação biparental e triparental utilizando-se *E. coli* estirpe S17-1 como doadora, sendo esta anteriormente transformada por eletroporação com os plasmídeos experimentalmente necessários e disponíveis. As estirpes HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae*, HCC103 de *H. rubrisubalbicans* e CBAmC de *Azospirillum amazonense* foram as receptoras. O protocolo básico testado foi uma adaptação naquele descrito por Schwab (2002).

As células doadoras e receptoras foram cultivadas por aproximadamente 16 horas, sendo as doadoras em meio suplementado com os antibióticos seletivos para os plasmídeos que portavam. Em seguida, um mililitro da suspensão de doadoras foi transferido para 4 mL

de meio sem antibióticos e cultivados por mais 3 e 4 horas. Foram misturados um mililitro de cultura de receptora a 0,5 mL de cultura de doadoras, o sistema foi centrifugado a 3000xg por cinco minutos à temperatura ambiente, ressuspensando-se o sedimento 500 µL de meio líquido Dygs:LB (3:1) e a suspensão aplicada com auxílio de uma alça de Drigalsky sobre meio de cultivo sólido Dygs:LB (3:1). Após 24 horas de repouso a 30°C, a cultura resultante foi raspada com alça metálica e sob agitação vigorosa ressuspensa em 500 µL de meio líquido Dygs suplementado com os antibióticos de seleção plasmidial. Uma alíquota de 100 µL deste material e de suas diluições seriadas  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram aplicadas com alça de Drigalski em meio Dygs suplementado com os antibióticos de seleção plasmidial.

### 3.5.3 Choque Térmico

O material celular foi preparado para o procedimento de transformação via lavagens em tampões específicos. Um erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio rico Dygs líquido foi inoculado com uma única colônia de cada estirpe (*Herbaspirillum seropedicae* HRC54, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 e *Azospirillum amazonense* CBAmC) no dia anterior, permanecendo sob 150 rpm de agitação a 30°C por aproximadamente 12 horas, atingindo uma densidade óptica dentro da faixa de 0,45 a 0,55 de absorvância a 600 nanômetros de comprimento de onda.

Neste momento as células foram resfriadas em banho de gelo por 30 minutos, e precipitadas em tubo plástico com tampa estéril previamente gelado de 50 mL por centrifugação a 3000xg e 4°C por 10 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 15 mL de Tampão I gelado (RbCl<sub>2</sub>, 3,0 g; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 2,4 g; glicerol, 37,5 g; Acetato de Potássio 1M, 7,5 mL; água ultrapura q.s.p. 250 mL; pH 5,8; estéril por filtração e estocado em frasco âmbar a 4°C) e incubadas em banho de gelo por 15 minutos. Procedeu-se nova centrifugação, por 10 minutos 3000xg e 4°C e recuperação das células, que foram então ressuspensas em três mililitros de Tampão II gelado (MOPS 1M, 2,5 mL; RbCl<sub>2</sub>, 0,3 g; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 2,75 g; glicerol, 37,5 g; água ultrapura q.s.p. 250 mL; pH 6,8; estéril por filtração e estocado em frasco âmbar a 4°C). Após 15 minutos de incubação em gelo, alíquotas de 200 µL foram distribuídas em microtubos plásticos previamente gelados e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo estocadas para uso futuro à -80°C.

Uma alíquota de 200 µL de células previamente preparadas foi disposta em banho de gelo por 15 minutos para descongelamento lento. Um microlitro de DNA plasmidial foi acondicionado em um microtubo de 500 µL de capacidade e, em seguida, 50 microlitros de células descongeladas foram delicadamente misturadas ao DNA plasmidial. O sistema permaneceu em banho de gelo por mais 10 minutos. Um banho-maria com controle estável de temperatura foi ajustado para exatamente 42°C, e os tubos contendo o sistema de transformação foram submetidos a esta temperatura por 45-50 segundos, e imediatamente recolocados em banho de gelo. Após dois minutos de incubação o material foi disposto em um mililitro de meio Dygs líquido, previamente gelado, e mantido por uma hora a 30°C e 150 rpm de agitação. Em seguida o material foi igualmente distribuído e aplicado sobre quatro placas de Petri contendo meio Dygs sólido suplementado com tetraciclina 30 mg.L<sup>-1</sup> com alça de Drigalsky, para seleção dos transformantes. Após 48 horas de incubação, as colônias transformantes surgidas foram repicadas com auxílio de palitos de madeira estéreis em alíquotas de um mililitro de meio Dygs líquido, placas de petri contendo 20 mL de meio Dygs sólido e frascos de vidro do tipo “penicilina” com capacidade para 10 mL contendo cinco mililitros de meio JNFb semi-sólido, todos suplementados com os antibióticos de seleção plasmidial.

### 3.6 Experimentos de estabilidade plasmidial

Uma vez obtido sucesso na transformação das estirpes de *Herbaspirillum* do inoculante de cana com o plasmídeo pH60, fez-se necessário testar a estabilidade dos transformantes antes de inoculá-los em plantas.

Para avaliar a estabilidade da transformação das estirpes HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae* e HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* com o plasmídeo pH60 fez-se uso de repicagens sucessivas e avaliou-se a expressão da GFP em veículos de inoculação.

#### 3.6.1 Experimento de Repicagem

Uma única colônia de HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup>, separadamente, obtida a partir de placas contendo meio sólido rico Dygs suplementado com 30 mg.L<sup>-1</sup> de tetraciclina foi disposta em tubos de ensaio contendo cinco mililitros de meio líquido Dygs sem suplementação com tetraciclina, mantido a 30°C sob agitação de 150 rpm por 24 horas. Durante sete dias consecutivos, 500 µL de cada cultura foram transferidos para novo tubo de ensaio contendo o mesmo meio líquido, e mantido nas mesmas condições (Figura 5). A cada repicagem alíquotas foram retiradas da cultura e submetidas a diluições seriadas e aplicadas sobre meio Dygs sólido com e sem suplementação com tetraciclina em uma microgota de 10 µL, para posterior contagem do número de unidades formadoras de colônia.

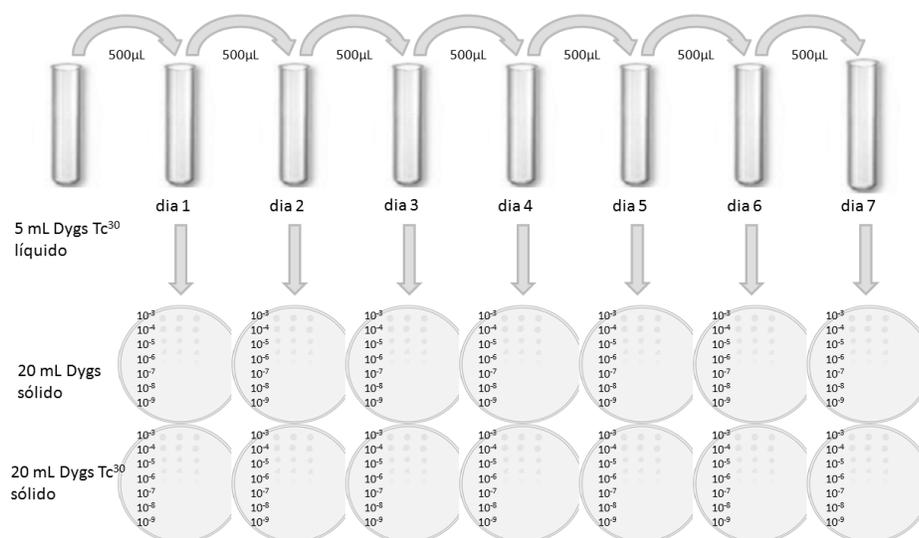


Figura 5. Esquema explicativo do experimento de repicagem das estirpes HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup> sem pressão seletiva.

#### 3.6.2 Experimento de expressão da GFP em condições de transporte/inoculação

Idealizado para demonstrar a expressão da GFP quando em situação de baixa disponibilidade de nutrientes (no veículo de transporte e inoculação), submeteu-se tanto veículo turfoso quanto veículo polimérico inoculados com HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup> separadamente a avaliações de microscopia por epifluorescência para localização das

bactérias exibindo a marcação GFP. As investigações procederam-se semanalmente, no período de zero a seis semanas.

### **3.7 Experimentos de inoculação das estirpes HCC103<sup>GFP</sup> e HRC54<sup>GFP</sup> in planta**

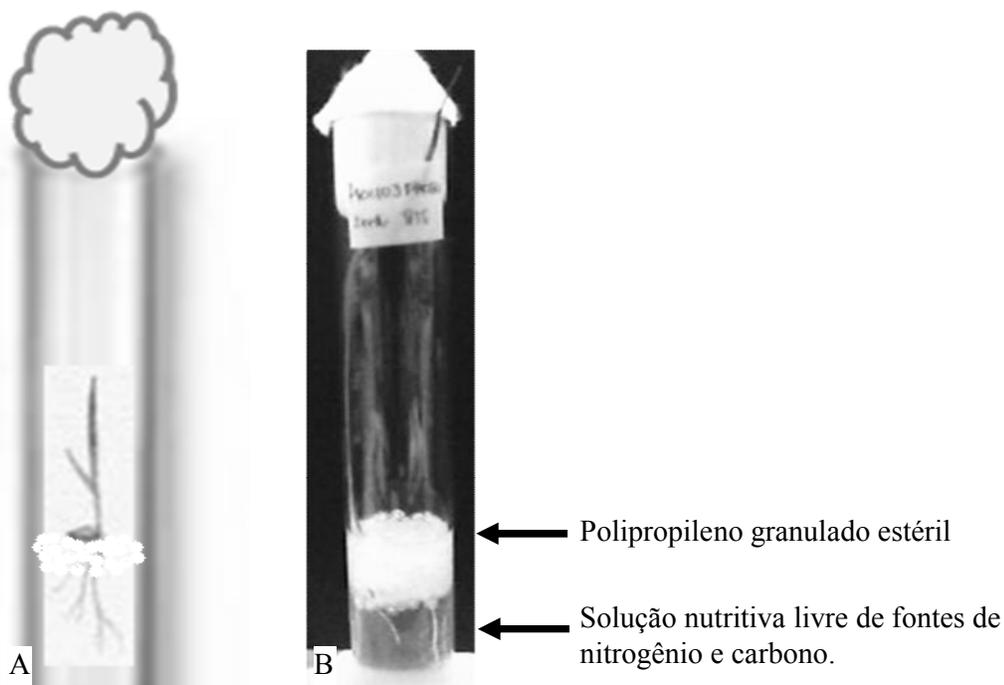
Uma vez confirmada a expressão da GFP pelas estirpes HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae* transformadas com GFP, estabeleceram-se sistemas de inoculação em tecidos de plantas, sendo utilizado inicialmente o modelo “arroz hidropônico” de Rows e colaboradores (2010), estabelecido como base para estudos de interação entre bactérias diazotróficas endofíticas e plantas da família *Poaceae*, devido a sua simplicidade e reprodutibilidade.

Em seguida foram realizadas diferentes metodologias de avaliação da interação entre as estirpes marcadas e os tecidos de cana de açúcar, por meio de inoculação por imersão de mini-toletes com uma gema em turfa e polímero diluídos (método tradicional) ou em cultura bacteriana diretamente. Outra metodologia testada foi a imersão de colmos de cana de açúcar em culturas bacterianas das estirpes marcadas, para visualização da ascensão das bactérias nos tecidos vasculares. Foi empregada a variedade RB867515 de cana-de-açúcar em todos os experimentos.

#### **3.7.1 Teste de visualização in planta com inoculação de arroz hidropônico**

Duas variedades de arroz foram submetidas a experimento de inoculação com as estirpes de HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup>: IAC4440 e Vermelho Virgínia. A primeira um padrão bem estabelecido para este tipo de ensaio e a segunda, mais rústica, uma variedade local, coletada junto a pequenos agricultores do Estado de Minas Gerais e gentilmente cedida pelo professor Dr. Luis Beja (UFRRJ).

As sementes foram descascadas e desinfestadas segundo Hurek e colaboradores (1994), e pré-germinadas por 3-4 dias a 28°C em placas de petri contendo meio LB diluído 10 vezes e suplementado com 1% de ágar. Plântulas sem contaminação visível foram transferidas para tubos de ensaio de 120 mL de capacidade contendo 60 mL de solução nutritiva (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M, 1 mL; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M, 1 mL; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1M, 2 mL; CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,172 g; FeEDTA 1,64% em água, 1 mL de solução, solução de elementos menores para tubos, 1 mL) livre de fontes de nitrogênio e carbono, sendo acondicionadas sobre cinco mililitros de polipropileno granulado estéril.



**Figura 6.** Representação esquemática (A) e fotografia (B) do sistema hidropônico onde as sementes de arroz pré-germinadas foram cultivadas e inoculadas.

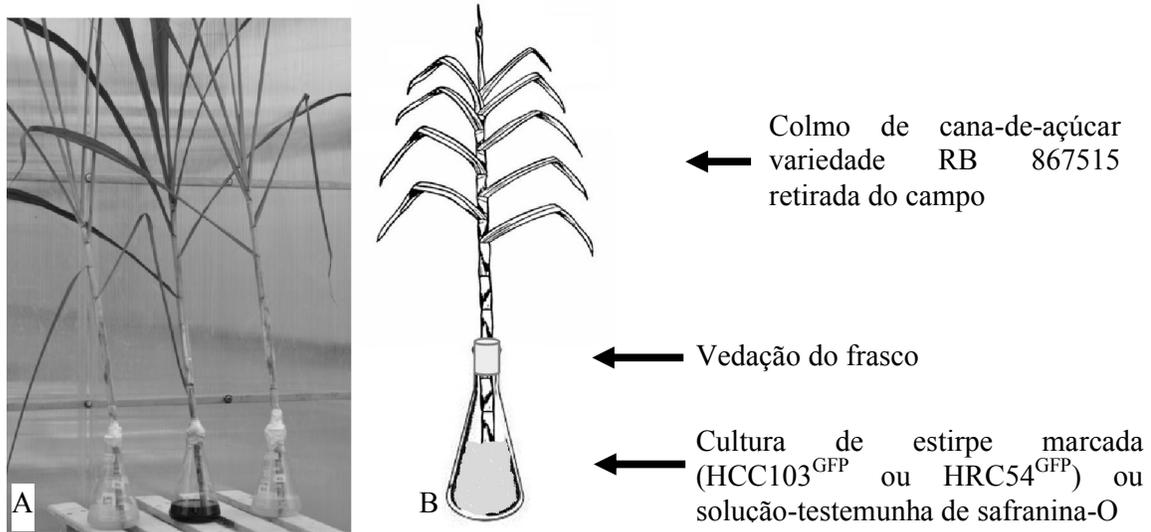
O sistema foi mantido por 3-4 dias em estufa tipo BOD a 28°C e fotoperíodo de 12 horas, em suportes de isopor, de maneira que as raízes permanecessem no escuro e as plântulas se desenvolvessem. Após este período de incubação, a solução nutritiva dos sistemas foi inoculada com um mililitro de cultura, contendo aproximadamente  $10^9$  bactérias marcadas, permanecendo na estufa tipo BOD nas mesmas condições por mais 48 horas. As raízes foram então lavadas gentilmente por três vezes em água destilada estéril e dispostas entre lâmina e lamínula de vidro, embebidas em glicerol 50% em tampão PBS (NaCl, 80 g; e KCl, 2 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 14,4 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,4 g; água destilada estéril q.s.p. 1000 mL), para avaliação por microscopia de epifluorescência.

### 3.7.2 *Ascensão xilemática*

No ensaio inicial, colmos inteiros de cana-de-açúcar variedade RB867515, com todas as folhas verdes e contendo cinco a seis entrenós foram retirados do campo experimental ao amanhecer e colocados rapidamente em frascos contendo um litro de cultura das estirpes marcadas, de modo que apenas o primeiro entrenó permanecesse submerso na cultura bacteriana (Figuras 7 e 8). A testemunha que avaliou se estava havendo fluxo do material de interesse para a parte aérea foi uma solução de corante vermelho safranina-O a 0,25% (diluir 2,5g em 100 mL ETOH 95% e em seguida adicionar 900 mL de água destilada). A abertura dos frascos foi lacrada com os colmos inseridos na cultura e o sistema foi mantido em casa de vegetação de biossegurança por 8, 12, 24, 48 e 72 horas.

Em nova avaliação, os colmos mais longos, com aproximadamente 15 entrenós, foram dispostos em condições semelhantes por 24 horas, porém a concentração da solução-testemunha com safranina-O foi reduzida de 0,25 para 0,025 com a intenção de avaliar a

ascensão da mesma pelos vasos condutores, sem que o tecido adjacente adquirisse a coloração vermelha característica.



**Figura 7.** Foto (A) e esquema (B) do experimento de ascensão xilemática. Da esquerda para a direita, HRC54<sup>GFP</sup>, safranina-O e HCC103<sup>GFP</sup>.

Ao final dos períodos de incubação, os três primeiros nós e entrenós dos colmos foram seccionados em cortador de tecidos semi-automático em fragmentos de 25-50 µm, sendo estes dispostos entre lâminas e lamínulas de microscopia embebidos glicerol 50% em tampão PBS, e avaliados por microscopia de epifluorescência.

Além disso, seções do primeiro ao décimo quinto entrenó dos colmos do segundo experimento foram avaliados, tendo sido realizada contagem dos feixes vasculares que exibiam coloração vermelha característica causada pela safranina-O.

### 3.7.3 Inoculação de mini-toletes de cana-de-açúcar

Toletes de cana-de-açúcar variedade RB867515 com apenas uma gema foram inoculados por imersão tanto em veículos tradicionais de transporte e inoculação contendo as estirpes HCC103<sup>GFP</sup> e HRC54<sup>GFP</sup> separadamente, quanto imersos diretamente nas culturas das estirpes marcadas.

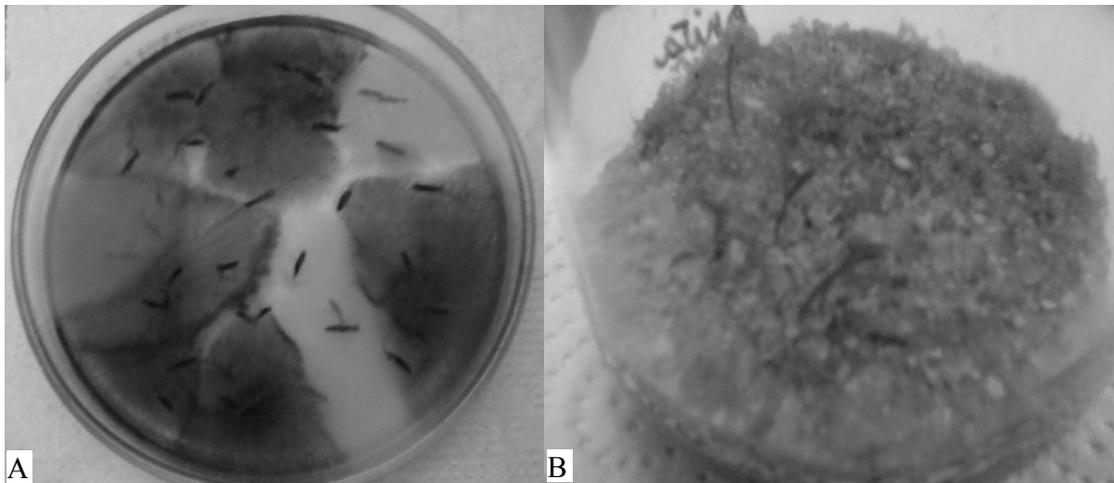
Os mini-toletes inoculados foram mantidos em bandejas plásticas contendo perlita estéril por autoclavagem, cobertas com película plástica em estufa tipo BOD a 38°C e 16 horas de fotoperíodo, por 14 dias. Diariamente um a dois mini-toletes eram retirados das respectivas bandejas, lavados gentilmente em água destilada para remoção dos fragmentos de substrato e seccionados em cortador de tecidos semi-automático em fragmentos de 25-50 µm, sendo estes avaliados por microscopia de epifluorescência.

### 3.7.4 Inoculação em plântulas de cana-de-açúcar provenientes de cariopses germinados

Uma vez que as raízes inicialmente emitidas pelos toletes de cana-de-açúcar são raízes adventícias, e não são metabolicamente semelhantes às raízes verdadeiras, isto é, não são responsáveis pela absorção de nutrientes, mas sim pela fixação e suporte da plântula

emergente, recorreu-se à germinação de cariopses de cana-de-açúcar para obtenção de radículas metabolicamente ativas e semelhantes às da planta propriamente dita, para avaliação da colonização radicular inicial.

Os cariopses foram friccionados gentilmente para retirada de estigmas e sujidades. Em seguida, foram submetidos a uma limpeza superficial, com lavagens sucessivas de 5 minutos em erlenmeyer sob agitação suave em peróxido de hidrogênio PA ( $H_2O_2$  a 30%), hipoclorito de sódio 2,4% (água sanitária comercial) e 10 enxágues sucessivos em água destilada estéril. Esta lavagem não foi suficiente para eliminar todos os microrganismos da superfície dos cariopses, como pode-se constatar quando realizou-se a germinação dos mesmos em meio de cultivo LB diluído 10 vezes (Figura 9 A). Devido a esta alta infestação, decidiu-se seguir com os experimentos dispondo-se os cariopses lavados diretamente sobre areia estéril, o que reduziu bastante a proliferação de microrganismos. O sistema foi montado em frascos de vidro contendo 100 mL de areia lavada estéril por autoclavagem, e recebeu aproximadamente 20 mL de solução nutritiva sem fontes de nitrogênio ou carbono, (Figura 9 B) e coberto com película plástica de PVC. Manteve-se o sistema em câmara de germinação tipo BOD a 30°C e fotoperíodo de 16 horas. Sete dias após o plantio, ocorreu a inoculação, onde um mililitro de meio de cultivo Dygs contendo  $10^9$  células foi aplicado diretamente sobre a areia próxima das plântulas obtidas. Após uma semana de incubação, avaliou-se a disposição de HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup> no sistema radicular das mesmas.



**Figura 8.** Montagem do experimento de inoculação de cariopses de cana-de-açúcar.

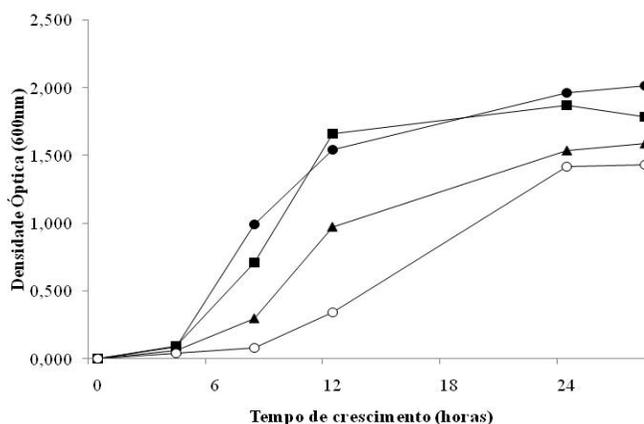
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Marcação das estirpes do inoculante com genes repórteres

Para a produção de estirpes do inoculante capazes de expressar diferentes genes repórteres fluorescentes, os ensaios foram repetidos muitas vezes, e os resultados positivos e/ou negativos são detalhados nos subitens que se seguem. Como relatado anteriormente não foi realizado nenhum estudo de transformação/conjugação com a estirpe de *B. tropica* PPe8 em razão das restrições para manipulação genética.

#### 4.1.1 Estabelecimento da fase exponencial de crescimento das estirpes em estudo

As condições experimentais que foram submetidas às estirpes demonstraram que entre oito e 20 horas, de acordo com cada estirpe, foi um intervalo de tempo adequado para coleta de células em quantidade e estado metabólico satisfatório para os ensaios de transformação (Figura 9). Nesse intervalo as estirpes apresentavam crescimento em fase exponencial, no qual há grande número de células em plena atividade metabólica. As estirpes de HCC103 e HRC54 de *Herbaspirillum* presentes no inoculante exibem ritmo de crescimento mais acelerado do que as estirpes PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e CBAmC de *Azospirillum amazonense*, resultando em uma menor quantidade de células quando coletadas no mesmo intervalo de tempo. Experimentalmente, as estirpes de *Herbaspirillum* foram cultivadas por aproximadamente 12 horas e as estirpes PAL5 e CBAmC foram cultivadas por maior tempo, cerca de 20 horas.



**Figura 9.** Curvas de crescimento das bactérias do inoculante em meio Dygs. ●: *Herbaspirillum seropedicae*; ■: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; ▲: *Azospirillum amazonense*; ○: *Gluconacetobacter diazotrophicus*;

### 4.2 Testes de resistência das estirpes do inoculante a antibióticos

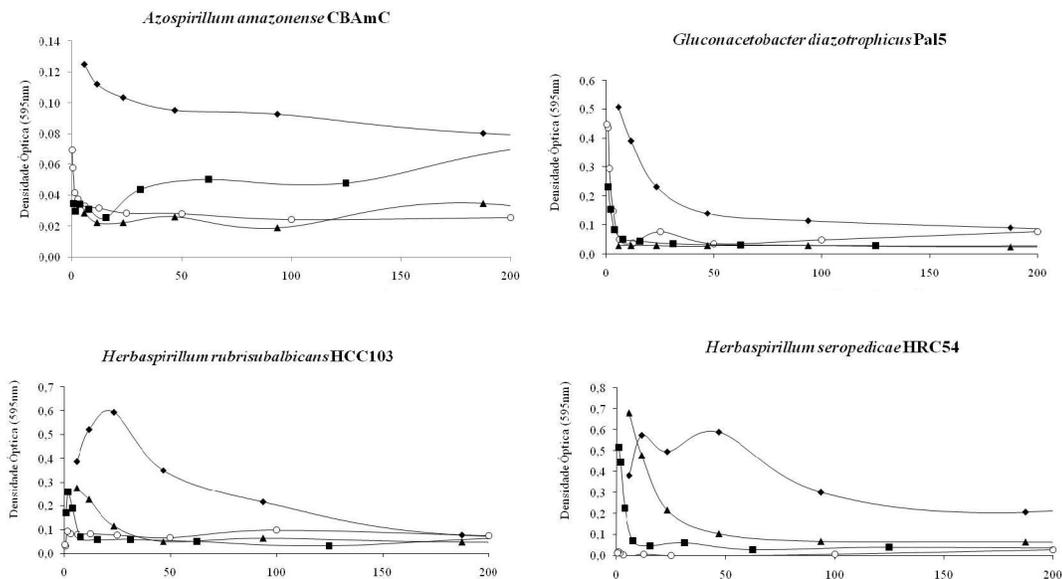
Com o objetivo de determinar a concentração mínima inibitória e a concentração a ser utilizada de antibióticos para seleção dos transformantes bacterianos obtidos a partir dos ensaios de transformação, foram realizadas diversas metodologias de verificação da resistência a antibióticos das estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* presentes no inoculante de cana da Embrapa Agrobiologia, CBAmC, HCC103 e HRC54, respectivamente.

Os ensaios com a estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* foram meramente confirmatórios, uma vez que a rotina de trabalho do Laboratório de Genética e Bioquímica já considerava concentrações-padrão de antibióticos para trabalhos com esta estirpe.

#### 4.2.1 Resistência a antibióticos em meio de cultura líquido

Os ensaios preliminares em meio líquido realizados em placas com 96 micro-poços com capacidade para 350  $\mu\text{L}$  e fundo chato, e detectaram razoável resistência de todas as estirpes ao antibiótico ampicilina, demonstrando que este antibiótico não é a substância indicada para seleção de transformantes nestas estirpes (Figura 10).

Na avaliação do ensaio realizado ficou evidente a elevada resistência de *Azospirillum amazonense* estirpe CBAmC ao antibiótico gentamicina, o que indicava inviabilidade de uso de plasmídeos com esta marca de resistência em ensaios de transformação desta estirpe. *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL5 mostrou-se relativamente susceptível a todos os antibióticos testados. Os ensaios, conforme descrito anteriormente, foram conduzidos por aproximadamente 16 horas e então avaliados. A julgar pelo ritmo mais lento de crescimento das estirpes CBAmC e PAL5, ensaios mais longos foram realizados, em maior volume de meio de cultura, e demonstraram que CBAmC tem elevada resistência a tetraciclina e ampicilina, e PAL5 à ampicilina (dados não mostrados). *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54 mostraram relativa resistência ao antibiótico ampicilina, e testes posteriores indicaram boa tolerância a ácido nalidíxico (dado não mostrado), que poderia vir a ser utilizado como antibiótico de seleção das estirpes em ensaios de conjugação, visto que a estirpe S17.1 de *E.coli* utilizada como doadoras de material plasmidial em uso no Laboratório de Genética e Bioquímica são susceptíveis a baixas concentrações ( $10\text{mg.L}^{-1}$ ) deste antibiótico.



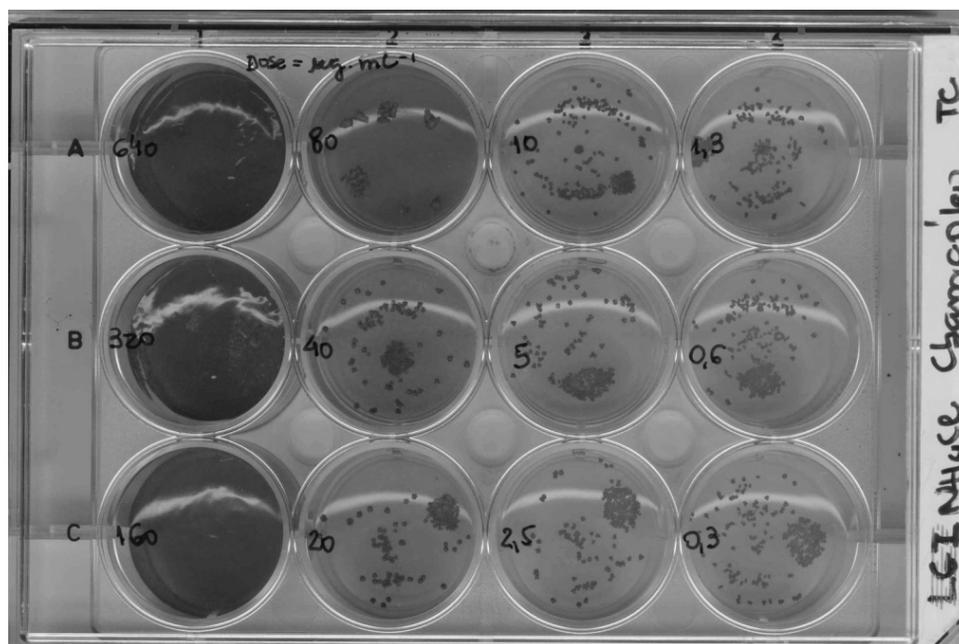
**Figura 10.** Curva de crescimento das bactérias do inoculante presentes neste trabalho na presença de antibióticos. ◆: ampicilina; ○: tetraciclina; ▲: canamicina; ■: gentamicina. Concentrações de antibióticos no eixo X em  $\text{mg.L}^{-1}$ .

#### 4.2.2 Resistência a antibióticos em meio de cultura sólido

Baseando-se nas análises realizadas em meio de cultura líquido, ensaios foram delineados com os meios de cultura sólidos, tanto meios semi-seletivos (LGI-P, LGI e JNFB) quanto meio rico (Dygs), uma vez que a seleção de transformantes baseia-se na seleção de colônias obtidas em placas de petri contendo meio de cultura adequado e suplementado com antibióticos de seleção.

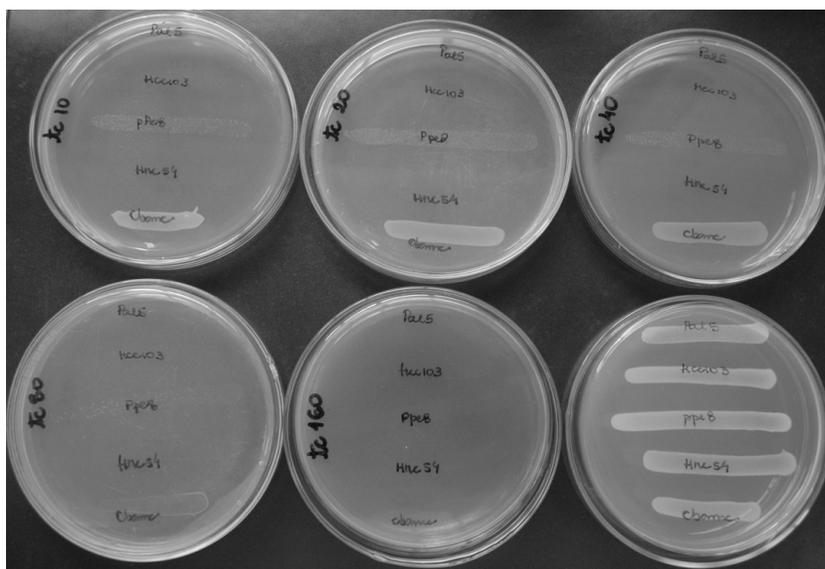
Os ensaios em meios de cultivo semi-seletivos foram realizados em placas com 12 poços de três mililitros cada, gerando um gradiente de aumento de concentração de antibiótico que facilita a visualização da multiplicação bacteriana nas condições experimentadas.

Um bom exemplo dos possíveis efeitos de um antibiótico no meio de cultivo é o caso da tetraciclina no meio LGI, situação de multiplicação de *Azospirillum amazonense*. A estirpe CBAmC é altamente tolerante à tetraciclina, e mesmo em concentrações relativamente elevadas ( $80 \text{ mg.L}^{-1}$ ) pouco mais de 72 horas foram necessárias para o surgimento de muitas colônias (Figura 11). Esta situação sinaliza que materiais plasmidiais portando exclusivamente genes de resistência à tetraciclina, como é o caso dos plasmídeos pMP4641, pMP4658, pMP4662 e pH60 não são indicados para utilização em ensaios de transformação de CBAmC, uma vez que seu metabolismo exibe elevada tolerância a este antibiótico, inviabilizando tanto a seleção de transformantes quanto a manutenção dos mesmos.



**Figura 11.** Placa de teste de resistência de *Azospirillum amazonense* CbamC contra o antibiótico tetraciclina. Meio de cultivo LGI contendo concentrações de 0,3 a  $640 \text{ mg.L}^{-1}$  de tetraciclina inoculado com cinco microlitros de CBAmC eletrocompetente. Material mantido por 72 horas em estufa a  $30^\circ\text{C}$ .

Para confirmação da ação da tetraciclina e demais antibióticos sobre CBAmC e as outras estirpes aqui estudadas, realizou-se os mesmos testes com meio de cultivo Dygs, mais rico e menos seletivo (Figura 12).

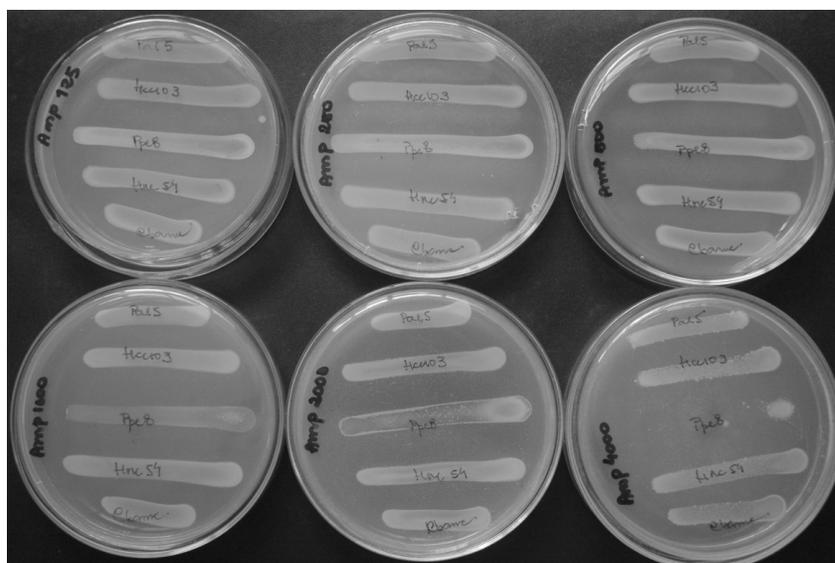


**Figura 12.** Placas de meio de cultura Dygs contendo tetraciclina com as cinco estirpes do inoculante testadas simultaneamente. Estirpes do inoculante testadas contra o antibiótico tetraciclina em concentrações de zero a 160 mg.L<sup>-1</sup>. Material mantido por 24 horas em estufa a 30°C. De cima para baixo: PAL5, HCC103, Ppe8, HRC54 e CBAmC.

Em especial atenção ao ritmo mais lento de crescimento das estirpes PAL5 e CBAmC, as placas foram mantidas por mais 3 dias em estufa (dados não mostrados), e confirmou-se a elevada tolerância da estirpe CBAmC ao antibiótico tetraciclina, havendo formação de muitas colônias individuais na concentração mais alta testada, indicando resistência e reforçando a decisão de seleção plasmidial. A tetraciclina passou então a ser o antibiótico de seleção de transconjugantes de CBAmC nos experimentos de conjugação.

As estirpes testadas demonstraram também resistência ao antibiótico ampicilina, havendo crescimento com formação de “tapete” mesmo em elevadíssimas concentrações do antibiótico (Figura 13). Sendo assim, nenhum ensaio realizado utilizou ampicilina para selecionar transformantes.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos no teste exploratório. Para cada antibiótico há uma CMI ideal, sendo utilizado ao menos o dobro da CMI para seleção de transformantes, reduzindo ao máximo a possibilidade de se obter mutantes de resistência natural aos mesmos. Para manutenção da expressão plasmidial, as doses de antibióticos utilizadas nos meios de cultivo podem ser menores, em especial em meios de cultivo líquidos, nos quais as células estão mais expostas à substância, evitando danos metabólicos ou esforços de multiplicação desnecessários.



**Figura 13.** Placas de meio de cultura Dygs contendo ampicilina com as cinco estirpes do inoculante testadas simultaneamente. Estirpes do inoculante testadas contra o antibiótico ampicilina em concentrações de 125 a 4000 mg.L<sup>-1</sup>. Material mantido por 24 horas em estufa a 30°C. De cima para baixo: PAL5, HCC103, Ppe8, Hrc54 e CBAmC.

**Tabela 1.** Concentração mínima inibitória de antibiótico e quantidade aplicada como pressão de seleção plasmidial em meio de cultura sólido

ANTIBIÓTICO	ESTIRPES							
	HRC54		HCC103		CBAmC		PAL5	
	CMI	Aplicado	CMI	Aplicado	CMI	Aplicado	CMI	Aplicado
<b>Canamicina</b>	200	400	50,0	200,0	3,1	20,0	50	200
<b>Tetraciclina</b>	>2	10	>1	10	80	100*	50	100
<b>Ampicilina</b>	**	--	**	--	**	--	**	--
<b>Gentamicina</b>	80	200	40	160	10	40	20	40

(CMI): concentração mínima inibitória, testada em poços de 3mL, em µg.mL<sup>-1</sup>; (Aplicado): concentração utilizada, em placas de 20mL, em µg.mL<sup>-1</sup>. (\*): elevada resistência natural da estirpe ao antibiótico. (\*\*): não recomendado.

Em investigação sobre metodologias de trabalho com *Azospirillum amazonense*, Sant'Anna e colaboradores (2011) testaram experimentalmente a susceptibilidade da estirpe Y2 aos mesmos antibióticos. Corroborando os resultados aqui obtidos, a estirpe Y2 de *A. amazonense* mostrou susceptibilidade a canamicina e gentamicina, tolerância a tetraciclina e resistência a ampicilina.

Os resultados dos testes aqui realizados levaram à escolha de antibióticos preferenciais para seleção plasmidial, sendo canamicina para CBAmC e PAL5, não excluindo-a para HRC54 e HCC103; tetraciclina para HRC54, HCC103 e PAL5; e, alternativamente, gentamicina para todas as estirpes em estudo.

#### 4.2.3 Resistência de HRC54 e HCC103 à tetraciclina

Os testes de resistência a tetraciclina demonstraram alta susceptibilidade das estirpes *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 ao antibiótico. Ambas exibiram poucas colônias já na primeira concentração testada ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ), e por esta característica, determinou-se que a concentração adotada para seleção dos clones positivos para o DNA plasmidial de pH60 seria de  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  e para manutenção do mesmo, de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , evitando possíveis danos metabólicos ou esforços desnecessários para proteção das células transformantes.

A Figura 14 demonstra a eficiência da tetraciclina  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  para seleção de transformantes contendo DNA plasmidial de pH60 nas estirpes. À direita, HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae* e à esquerda HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Em cada caso, à esquerda, em meio Dygs, e à direita, em meio Dygs suplementado com o antibiótico. De cima para baixo, culturas puras e suas diluições seriadas foram aplicadas com hastes estéreis.

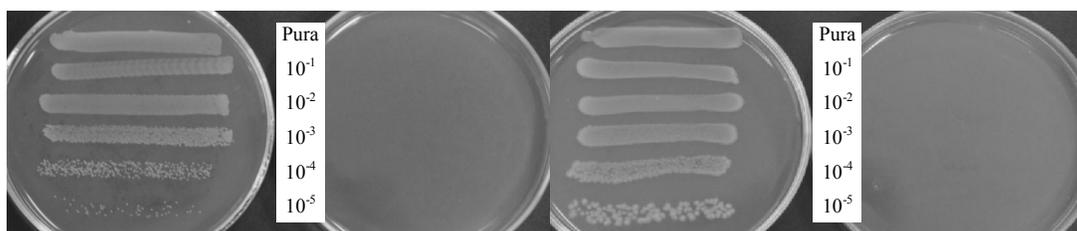


Figura 14. Testes de resistência das estirpes HCC103 e HRC54 à tetraciclina.

### 4.3 Transformação bacteriana

Das metodologias utilizadas para transformação bacteriana, apenas o método de choque térmico foi bem sucedido, havendo o crescimento de transformantes das estirpes HCC103 e HRC54 com o plasmídeo pH60.

Seguem informações adicionais sobre as modificações realizadas nos protocolos testados sem sucesso e os entraves encontrados experimentalmente.

#### 4.3.1 Eletroporação

Os protocolos de eletroporação testados foram os de KLASSEN et al. (1999); ELBELTAGY et al. (2011); ROUWS et al. (2006); SCHWAB (2002) e SANT'ANNA et al. (2011). De maneira geral, as modificações básicas testadas se relacionaram ao meio de cultivo das bactérias a serem transformadas e a densidade óptica da cultura (etapa de eletrocompetência) além dos tempos de recuperação das culturas após a eletroporação. O Quadro 7 simplifica as alterações realizadas nos protocolos testados.

Em alguns ensaios de transformação por eletroporação, HCC103 e HRC54 formaram colônias isoladas nas placas de seleção, estas foram repicadas com auxílio de palitos de madeira estéreis para placas de Petri mapeadas (*master plates*) contendo meio Dygs sólido, quanto para em meio semisólido semi seletivo (JNFB), ambos suplementados com antibióticos, na tentativa de visualização da expressão da proteína repórter. Infelizmente não foi confirmada a expressão do gene repórter, embora em alguns casos (HCC103 e HRC54

versus pMP4641, pMP4658 e pMP4662) a resistência adquirida ao antibiótico tetraciclina indicasse a efetiva transformação plasmidial.

É possível que tenha havido transformação, mas que, devido à configuração genética dos plasmídeos, a atividade de fluorescência do gene repórter não seja suficiente para ser visualizada. Um problema inerente às proteínas autofluorescentes é a necessidade de maturação do cromóforo, pesquisas mostram que promotores fracamente expressos podem provocar um retardo no sinal, uma vez que a proteína autofluorescente deve estar presente em quantidade suficiente para emitir um sinal captável (HOBERT & LORIA, 2006).

**Quadro 7.** Resumo das modificações realizadas nos protocolos de eletroporação testados neste trabalho.

Referência	Meio e competência	Eletroporação	Modificações	Resultado
KLASSEN et al. (1999)	NFbHPN (DO <sub>600</sub> ±0,6) Coleta das células por centrifugação 3 lavagens com água e uma em glicerol 10%	100 µl de células + 1µg DNaplasmidial 4 kV; 330 uF; 200Ω; cubeta 0,2 mm  1 hora de recuperação em DYGS	NFbHPN, JNFB, NFB, TY, Dygs, LGI suplementado ou não com NH <sub>4</sub> Cl  DO <sub>600</sub> 0,2; 0,6; 1,0 e 2,0	Não houve formação de colônias transformantes (CBAmC) ou colônias resistentes ao antibiótico de seleção não exibiram a fluorescência GFP (HCC103 e HRC54)
ROUWS et al. (2006) ELBELTAGY et al. (2001)	C2, (DO <sub>600</sub> ±0,6) ou nutrient broth (DO <sub>600</sub> ±0,6) Coleta das células por centrifugação 3 lavagens com água ultrapura estéril e uma em glicerol 10%	100 µl de células + 1µg DNaplasmidial 2,5 kV; 25 uF; 200Ω; cubeta 0,2 mm  1 hora de recuperação em C2 ou nutrient broth	1, 2, 4, 8 e 12 horas de recuperação em NFbHPN, JNFB, NFB, TY, Dygs, LGI suplementado ou não com NH <sub>4</sub> Cl	
SANT'ANNA et al. (2011)	M79 (DO <sub>600</sub> ±0,12) Coleta das células por centrifugação 3 lavagens com tampão de eletroporação (sacarose-MgCl <sub>2</sub> -Hepes)	50 µl de células + 1µg DNaplasmidial 2,5 kV, 25 uF, 200Ω, cubeta 0,1 mm  4 horas de recuperação em M79	Dygs, LGI suplementado com NH <sub>4</sub> Cl ou TY  DO <sub>600</sub> 0,2; 0,6; 1,0 e 2,0  1, 2, 4, 8 e 12 horas de recuperação em Dygs, LGI suplementado com NH <sub>4</sub> Cl ou TY	CBAmC não precipitou quando cultivada em M79.  Alta contaminação nas placas de seleção (CBAmC) e não obtenção de colônias transformantes (CBAmC, HRC54 e HCC103)
CHOI et al. (2006)	LB overnight Coleta das células por centrifugação 2 lavagens seguidas em sacarose 300mM a temperatura ambiente	100 µl de células + 500 ng DNaplasmidial 2,5 kV; 25 uF; 200Ω; cubeta 0,2 mm  2 horas de recuperação em meio LB	Aumento de lavagens em sacarose (4 a 6)	Estouro de cubetas durante a eletroporação

Valdivia & Cormack (2006) comentam que as principais limitações no uso de proteínas autofluorescentes em procariotos são sua tendência a precipitar no citoplasma na forma de corpos inclusos não fluorescentes, além da magnitude do sinal de fluorescência

obtido poder ser relativamente baixa quando comparada a outras proteínas repórteres, como a atividade da  $\beta$ -galactosidase ou da luciferase. A julgar pela avaliação feita nos transformantes obtidos, é possível que estivesse havendo atividade de fluorescência, mas abaixo do nível de detecção do equipamento utilizado para visualização e documentação da mesma. Outros autores comentam que proteínas repórteres autofluorescentes podem não ser detectadas devido à falta de oxigênio dissolvido, e uma vez este estando disponível, a fluorescência passaria a ser visualizada (HEIM et al., 1994), situação que provavelmente não se aplica a estas culturas, pois são bactérias provenientes de cultivos em meio de cultura líquido sob agitação de 150 a 200 rpm em *erlenmeyers* contendo no máximo um quinto da capacidade de meio de cultura, garantindo boa aeração e taxa de crescimento. Outra alternativa para a não visualização das proteínas autofluorescentes possivelmente expressas e não detectadas é que alterações na temperatura poderiam ter ocasionado erros no dobramento da estrutura terciária das mesmas. Pesquisas demonstram que a temperatura de crescimento da cultura pode influenciar diretamente na detecção de fluorescência (CHALFIE & KAIN, 2006), e talvez o cultivo das estirpes marcadas a uma temperatura menor que os usuais 30°C poderiam melhorar o sinal da fluorescência.

Extrações de material genético foram realizadas, mas não foi possível extrair o DNA plasmidial supostamente inserido, mesmo após protocolos diferentes (SAMBROOK et al., 1989; MANIATIS, 1989; SCHWAB, 2002). O material celular foi então precipitado por centrifugação e congelado para análises posteriores, uma vez que o objetivo de gerar células com atividade repórter não havia sido atingido e novos métodos precisavam ser testados.

Diversos estudos foram realizados com *Herbaspirillum seropedicae* estirpes B501 (ELBELTAGY et al, 2001; NJOLOMA et al., 2005, 2006a,b; ZAKRIA et al., 2008a,b), SMR1 (MONTEIRO et al., 2008), RAM10 (BALDOTTO et al., 2011) expressando genes repórter, tendo os protocolos de transformação referidos sido testados, repetidos e modificados exaustivamente sem, contudo, se obter sucesso com a estirpe HRC54 ou com *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103.

Elbeltagy e colaboradores utilizaram marcação plasmidial de *Herbaspirillum spp.* estirpe B501 em associação com arroz selvagem utilizando o gene repórter *gfp*. A transformação foi realizada com o plasmídeo pUTgfp<sub>x2</sub>, portador do gene de resistência a canamicina. Três dos plasmídeos testados neste trabalho, pHRGFPGUS, pUTKanGFP e pUTKandsRed são portadores de genes de resistência ao mesmo antibiótico, sendo os dois últimos plasmídeos “suicidas”, que integram o gene repórter ao cromossomo bacteriano, de maneira semelhante à marcação realizada pelos autores. Infelizmente não houve sucesso com o uso dos mesmos nas estirpes HCC103 e HRC54.

Os plasmídeos que conferiram resistência às estirpes HRC54 e HCC103 (pMP4641, pMP4658 e pMP4662) com genes de resistência a tetraciclina, foram os mesmos utilizados por Bloemberg e colaboradores (2000) para marcar *Pseudomonas*, e neste caso, a fluorescência exibiu sinal bastante significativo, possibilitando a investigação da interação rizosférica em tomateiro com inoculação conjunta dos diferentes transformantes produzidos. É possível que a construção plasmidial não tenha a mesma eficiência para o gênero *Herbaspirillum* quanto para o gênero *Pseudomonas*.

Na estirpe CBAmC não houve formação de colônias nas placas de seleção em nenhum dos métodos testados, e além disso, em ensaios realizados com os plasmídeos portadores de marca de resistência para o antibiótico tetraciclina, houve crescimento massivo da estirpe não transformada, evidenciando a ineficiência deste antibiótico na seleção desta estirpe de *Azospirillum amazonense*.

Em testes de manipulação de *Azospirillum amazonense* estirpe Y2 Sant’Anna e colaboradores (2011) obtiveram sucesso utilizando o plasmídeo pHRAATEYFP, vetor derivado de pHRGFPGUS, um dos utilizados nos ensaios aqui descritos. Infelizmente o

método de transformação destes autores também foi testado sem sucesso para a estirpe CBAmC, evidenciando diferenças fisiológicas, genéticas e/ou metabólicas entre as estirpes de *Azospirillum amazonense*, que demonstram diferentes comportamentos diante dos mesmos métodos.

*Herbaspirillum seropedicae* estirpe SMR1 recebeu o plasmídeo pUTKandsRed, portador dos genes de fluorescência vermelha e de resistência a canamicina por eletroporação, integrando o repórter ao cromossomo, gerando a estirpe RAM4, utilizada na investigação da associação de *H. seropedicae* com raízes frescas de milho (MONTEIRO et al., 2008). Acreditava-se que a estirpe HRC54 facilmente seria transformada por eletroporação com o mesmo plasmídeo, gentilmente cedido pelos autores, mas depois de vários ensaios mal sucedidos, decidiu-se partir para outros métodos de transformação. A estirpe HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* igualmente não produziu transformantes quando submetida ao mesmo método.

#### 4.3.2 Conjugação

O protocolo básico de conjugação (SCHWAB, 2002) foi modificado em vários aspectos, listados no Quadro 8, e além dele, o protocolo de Sant'Anna e colaboradores (2011) também foi testado.

**Quadro 8.** Protocolo básico de conjugação utilizado e modificações aplicadas.

Receptoras e meios	Doadora e Plasmídeos	Método original	Modificações
CBAmC (LGI:LB) 3:1	<i>E. coli</i> S17.1 pRK2013  pHRGFPGUS pTNGFPGUS pUTKanGFP pUTKandsRed	Cultivo das estirpes <i>overnight</i> Precipitação de 1 ml de cultura e ressuspensão em 1 ml do meio sem antibiótico Cultivo até DO <sub>600</sub> ±0,2 Mix 5 ul doadora + 50 ul receptora Plaqueamento com drigalski em meio misto Incubação 16 hs	DO <sub>600</sub> 0,6 e 1,0 Aplicação de antibiótico de seleção de estirpe-alvo (ácido nalidíxico para <i>Herbaspirillum</i> e Tetraciclina para <i>Azospirillum</i> )
HRC54 HCC103 (JNFB:LB) 3:1	<i>E. coli</i> S17.1 pRK2013  pHRGFPGUS pTNGFPGUS pMP4641 pMP4658 pMP4662 pHRGFPTc	Raspagem com espátula de aço flambada da cultura resultante Ressuspensão do material resultante em meio líquido suplementado com antibióticos Plaqueamento no meio de seleção (LGI ou JNFB + (1) x-gluc; (2) Amp; (3) Kn; (4) Gm; (5) Tc	Uso de membranas com poro 0,22µm para suporte do sistema de conjugação com posterior lavagem com solução salina ou meio de cultivo seletivo com e sem suplementação com antibióticos

Muito embora tenham sido testadas muitas variações no protocolo base, não se obteve sucesso na transformação de *Azospirillum amazonense* CBAmC, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 ou *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 por conjugação.

O resultado foi bastante desanimador, visto que a espécie *Azospirillum amazonense* estirpe Y2 já havia sido transformada tanto pelo método de eletroporação quanto conjugação por Sant'Anna e colaboradores (2011), e variações no protocolo inicial (SCHWAB, 2002) foram utilizadas, além da realização de ensaios com o método de Sant'Anna et al (2011), inclusive com a utilização do plasmídeo auxiliar de transferência pRK2013, utilizado pelos autores na transformação de Y2 com o plasmídeo pKΔK, vetor portador de resistência a

canamicina que se integra ao cromossomo bacteriano. Apesar dos esforços, não foi alcançado êxito nas transformações também com este método, e decidiu-se partir para uma nova abordagem, descrita no próximo item.

#### **4.3.3 Choque térmico**

Como os métodos anteriores não surtiram o efeito desejado, optou-se por novas metodologias de trabalho, e um protocolo gentilmente cedido pelo Laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia, utilizado em estudos com *E.coli* foi adaptado para utilização com as estirpes contempladas por este trabalho.

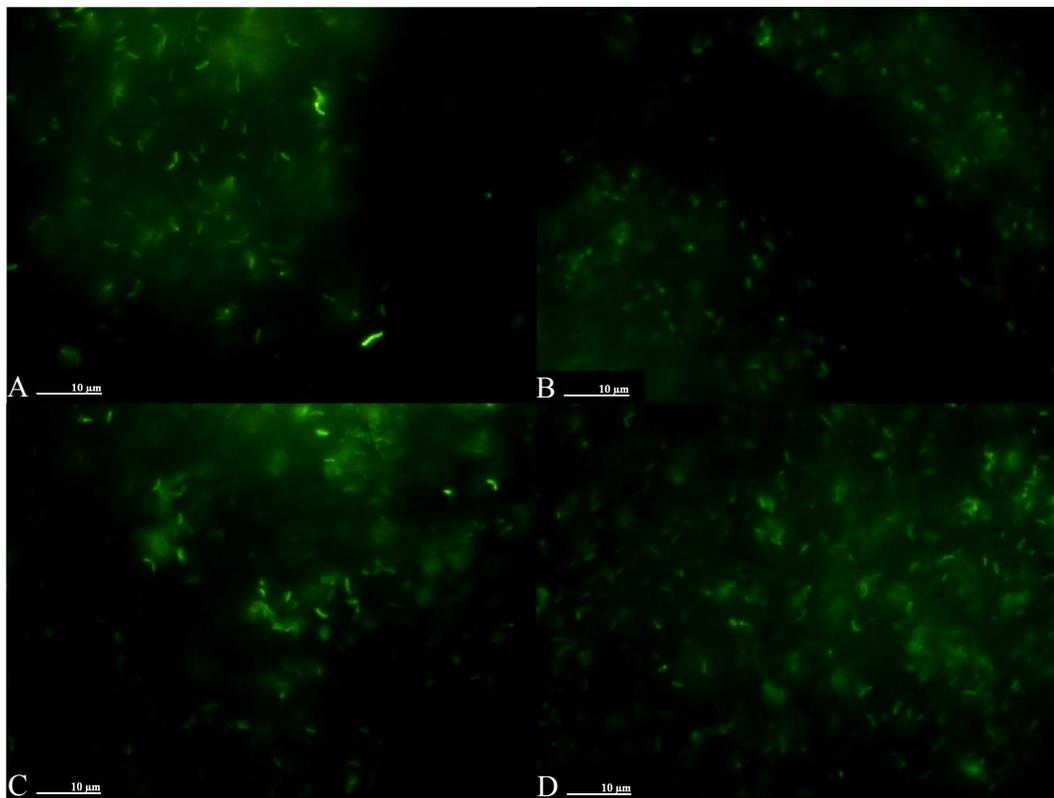
Já no primeiro ensaio obteve-se sucesso, gerando *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 marcadas com o plasmídeo pHc60, portador do gene *gfp* e de resistência a tetraciclina. Os sistemas de transformação com outros plasmídeos não geraram transformantes.

Com *Azospirillum amazonense* CBAmC esta metodologia também não foi bem sucedida, e foram realizadas alterações no pH do tampão de quimio-competência e transformação, mas também não ocorreu transformação.

#### **4.4 Avaliação por microscopia de epifluorescência dos transformantes obtidos por choque térmico**

A expressão da GFP pelas estirpes HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae* e HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi avaliada em microscópio Zeiss® AxioPlan e sistema de captura de imagem Zeiss® AxioCam, utilizando os filtros de excitação 450-490 nm e de emissão 520 nm. A partir da primeira observação positiva da fluorescência emitida pelas estirpes, que indicou o sucesso no processo de transformação, passou-se a referir-se às mesmas como HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup>.

Tanto bactérias oriundas de películas de meio JNFb semi-sólido contendo o antibiótico de seleção tetraciclina quanto de meio sem a pressão seletiva (Figura 16) exibiram forte sinal de fluorescência, demonstrando a forte expressão deste material genético pelas estirpes em estudo.



**Figura 16.** *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup>. A, C: HRC54<sup>GFP</sup> e B, D: HCC103<sup>GFP</sup> em meio de cultura JNFb semi-sólido (C, D) e JNFb semi-sólido suplementado com 30 mg.L<sup>-1</sup> de tetraciclina (A, B).

#### 4.5 Avaliação da atividade do gene repórter em *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5

Com a obtenção dos transformantes HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup> surgiu a oportunidade de realização de ensaios de inoculação conjunta das estirpes de *Herbaspirillum* presentes no inoculante com a estirpe PAL5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, e os estoques mantidos a -80°C foram então solicitados.

Para total surpresa da equipe de trabalho, verificou-se que PAL5 pHRGFPTc e pHRGFPGUS, utilizadas em trabalho anterior (ROUWS et al., 2010) não estavam mais viáveis, e apesar dos esforços para recuperá-las ou mesmo refazer o processo de transformação. Infelizmente não obtivemos sucesso.

#### 4.6 Experimentos de estabilidade plasmidial em HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup>

A estabilidade da expressão da GFP por HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup> foi testada através de dois experimentos distintos, com finalidades específicas. Para avaliar a permanência do DNA plasmidial nas células transformadas mesmo sem pressão seletiva, delineou-se um experimento de repicagens sucessivas sem a presença do antibiótico de seleção. Para avaliação da expressão da GFP em condições de baixa disponibilidade de nutrientes foi realizada a frequente visualização de veículos de inoculação contendo as células marcadas, confirmando ou não a expressão da GFP com o maior período de incubação.

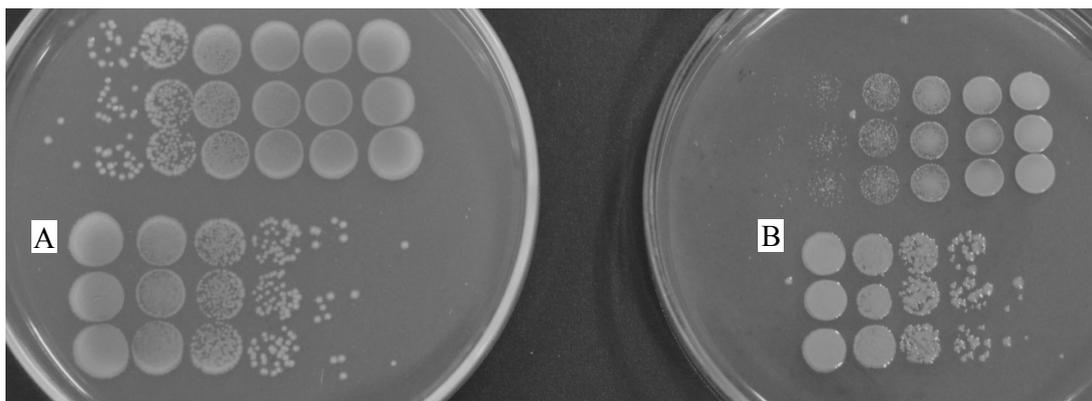
#### 4.6.1 Experimento de repicagem

Apenas no quarto dia de avaliação HRC54<sup>GFP</sup> demonstrou duas ordens de grandeza a mais em unidades formadoras de colônias presentes na quantificação sem antibiótico, quando comparada à quantificação suplementada, havendo plena recuperação do número de microrganismos presentes nas avaliações subseqüentes. Na maioria dos pontos de coleta e avaliação a diferença entre as quantificações, quando houve, foi de apenas uma ordem de grandeza, demonstrando uma boa quantidade de células marcadas mesmo após sucessivas repicagens em meio rico livre do antibiótico de seleção (Tabela 2). A Figura 17 ilustra uma placa de contagem do número de unidades formadoras de colônia a cada ponto de coleta realizado.

**Tabela 2. Avaliação da estabilidade plasmidial pelo método de repicagem sucessiva.**

Estirpe	Meio de Cultivo	Unidades Formadoras de Colônias						
		1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
HRC54 <sup>GFP</sup>	Dygs	6,6.10 <sup>8</sup>	1,0.10 <sup>9</sup>	1,6.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	5,0.10 <sup>7</sup>	7,3.10 <sup>8</sup>	**
	Dygs Tc <sup>30</sup>	5,6.10 <sup>8</sup>	1,3.10 <sup>10</sup>	2,6.10 <sup>8</sup>	6,0.10 <sup>7</sup>	2,1.10 <sup>7</sup>	7,0.10 <sup>8</sup>	4,6.10 <sup>7</sup>
HCC103 <sup>GFP</sup>	Dygs	1,7.10 <sup>9</sup>	1,5.10 <sup>9</sup>	1,7.10 <sup>9</sup>	1,3.10 <sup>9</sup>	1,6.10 <sup>7</sup>	1,8.10 <sup>9</sup>	**
	Dygs Tc <sup>30</sup>	1,5.10 <sup>10</sup>	4,3.10 <sup>9</sup>	1,5.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>9</sup>	8,3.10 <sup>8</sup>	3,6.10 <sup>9</sup>	4,3.10 <sup>8</sup>

\*\* perda de dados por contaminação.

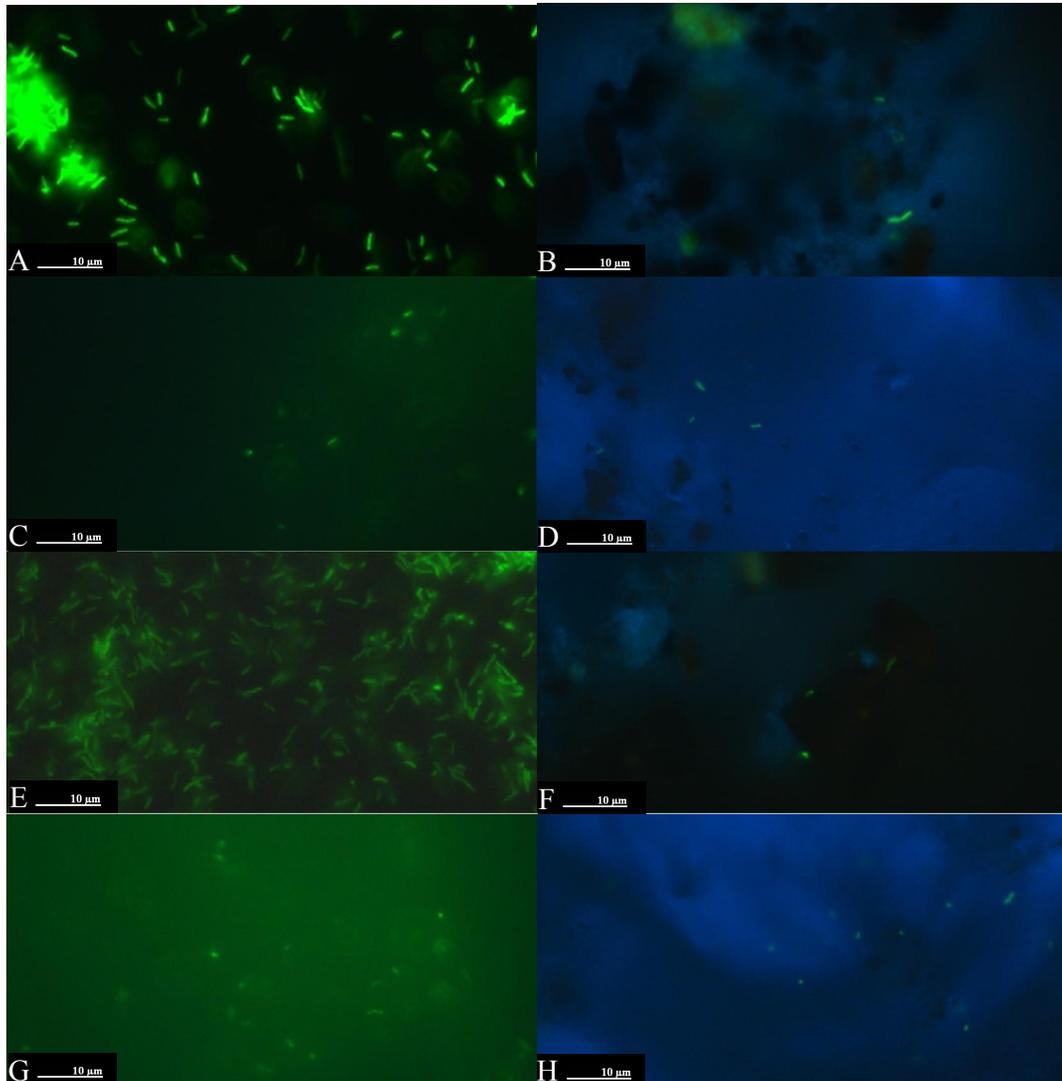


**Figura 17.** Experimento de repicagem sucessiva das estirpes HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup> sem pressão seletiva. Placas de meio Dygs sem (A) e com (B) suplementação com tetraciclina 30 mg.L<sup>-1</sup>. Acima HCC103<sup>GFP</sup> e abaixo, HRC54<sup>GFP</sup>. Microgotas de 10 µl das diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup> foram aplicadas. Material referente ao 5º dia de repicagem.

Uma coloração discretamente esverdeada das colônias formadas também indicava que a expressão da GFP foi mais efetiva quando na presença de tetraciclina (dado não mostrado), bem como que HCC103<sup>GFP</sup> visualmente exibia colônias mais esverdeadas que HRC54<sup>GFP</sup>, apesar de ambas demonstrarem excelente sinal de fluorescência quando observadas microscopicamente.

#### 4.6.2 Avaliação de expressão da GFP em condições de transporte/inoculação

As avaliações semanais dos veículos de transporte/inoculação testados demonstrou que mesmo após seis semanas permanecendo em ambos os veículos (tanto turfa quanto polímero) foram facilmente identificadas via microscopia de epifluorescência células bacterianas exibindo movimento e fluorescência (Figura 18) indicando fortemente a viabilidade do material, confirmando a robustez da marcação das estirpes HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e HRC54 de *Herbaspirillum seropedicae* com o plasmídeo repórter pHc60.



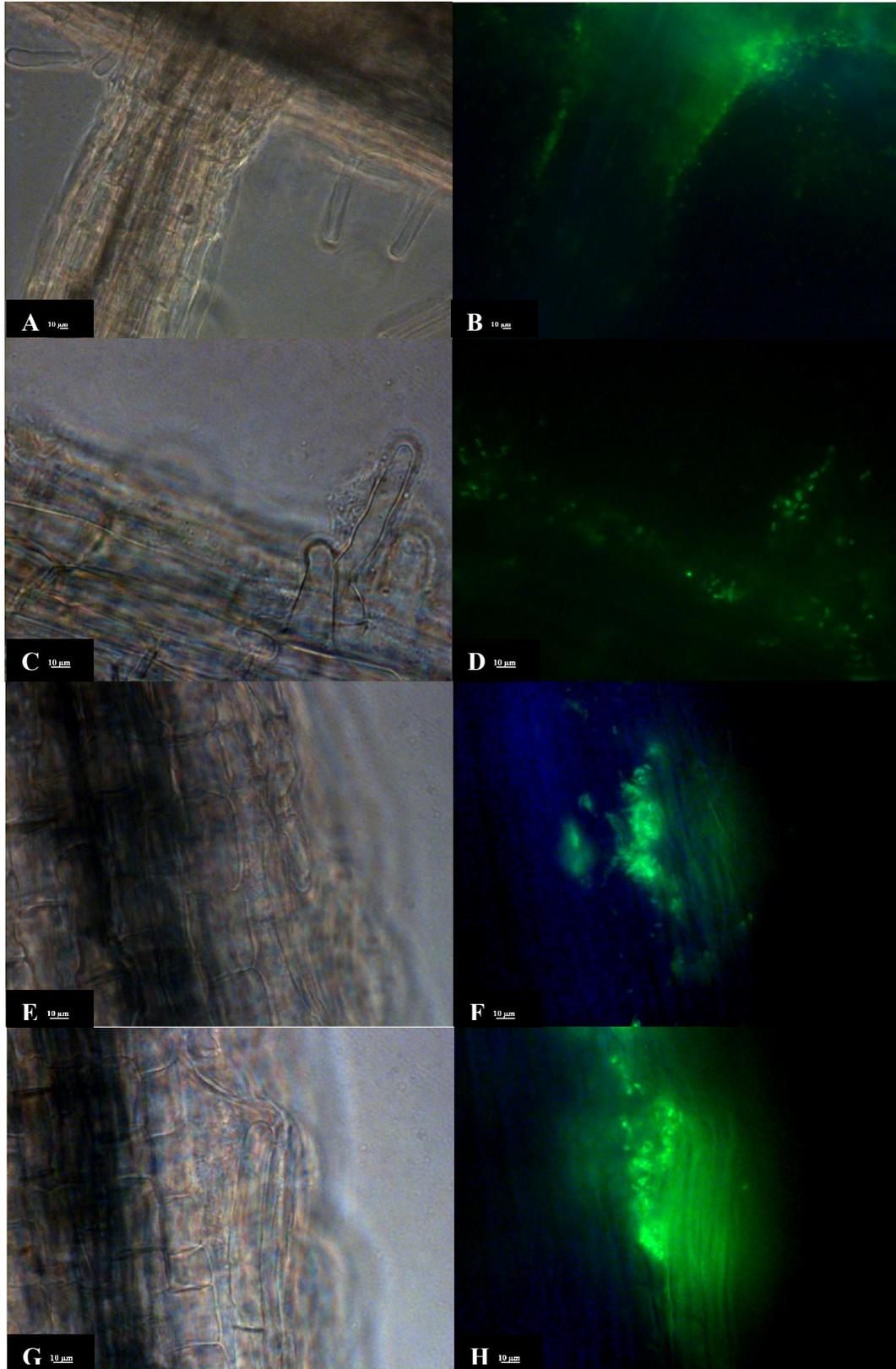
**Figura 18.** Emissão de fluorescência pelas estirpes HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup> quando mantidas em veículos de transporte e inoculação. A a D: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup>. A: cultura pura em meio líquido Dygs<sup>Tc10</sup>. B: cultura fresca em turfa. C: cultura em polímero há 6 semanas. D: cultura em turfa há 6 semanas. E a H: *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup>. E: cultura pura em meio líquido Dygs<sup>Tc10</sup>. F: cultura fresca em turfa. G: cultura em polímero há 6 semanas. H: cultura em turfa há 6 semanas.

#### 4.7 Avaliação do experimento piloto de colonização superficial do sistema radicular de duas variedades de arroz cultivados em condições hidropônicas

A região de emergência de raízes laterais possui rompimentos da camada epidérmica de células, originados da expansão do tecido originado no periciclo crescendo na direção do córtex da raiz principal, local por onde estas raízes secundárias emergirão. Nestes rompimentos, as bactérias que colonizarão os tecidos internos das raízes e/ou permanecerão em atividade rizosféricas se depositam e multiplicam, formando micro-colônias (REIS & OLIVARES, 2006). Ensaios de inoculação avaliados com auxílio de microscopia eletrônica e imunomarcção demonstraram que *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e *Herbaspirillum rubribubalbicans* HCC103 formavam micro-colônias nas rupturas radiculares provocadas pela emergência de raízes secundárias, demonstrando que esta é a principal via de penetração da bactéria associativa na planta hospedeira (OLIVARES, 1997).

Os ensaios de inoculação com as estirpes HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup>, mostraram a formação de micro-colônias nas regiões de emergência de raízes secundárias, rupturas epidérmicas e dobramentos radiculares, além de facilmente terem sido detectadas células individuais sobre toda a epiderme radicular. Alguns pelos radiculares demonstravam colonização superficial intensa (Figura 18C, D), o que pode significar uma possível via de penetração na epiderme radicular, possivelmente facilitando a entrada da bactéria diazotrófica endofítica na epiderme radicular. Ensaios de inoculação de cana-de-açúcar micropropagadas avaliados com auxílio de microscopia eletrônica e imunomarcção demonstraram que as estirpes originais *H. seropedicae* HRC54 e *H. rubribubalbicans* HCC103 formavam micro-colônias nas rupturas radiculares provocadas pela emergência de raízes secundárias, sugerindo que esta é a principal via de penetração da bactéria associativa na planta hospedeira (OLIVARES, 1997). A região de emergência de raízes laterais possui rompimentos da camada epidérmica de células, originados da expansão do tecido originado no periciclo crescendo na direção do córtex da raiz principal, local por onde estas raízes secundárias emergirão, e nestes rompimentos as bactérias que colonizarão os tecidos internos das raízes e/ou permanecerão em atividade rizosféricas se depositam e multiplicam, formando micro-colônias (REIS & OLIVARES, 2006).

Os ensaios foram realizados com duas variedades bastante distintas de arroz: a IAC4440, variedade comercial bastante estudada e já testada em experimentos de colonização com outra bactéria diazotrófica endofítica, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (ROUWS et al., 2010; MENESES et al., 2011) e Vermelho Virgínia, modelo de variedade mais rústica (Figuras 15 a 18). A Figura 23 demonstra a colonização das raízes de plantas de arroz por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> quatro dias após a inoculação em sistema hidropônico de arroz Vermelho Virgínia. A estirpe HCC103<sup>GFP</sup> formou micro-colônias principalmente na base de raízes secundárias, região onde o córtex radicular se rompe, formando aberturas na epiderme. O padrão sub-epidérmico de colonização radicular em arroz (*Oryza officinalis* W0012, rústica e *Oryza sativa* cv. Sasanishiki, comercial) pela estirpe B501gfp1 pertencente ao gênero *Herbaspirillum* já foi descrito (ELBELTAGY et al., 2001). Os autores relataram que a bactéria invadiu e colonizou as raízes pelos espaços intercelulares, de maneira semelhante ao observado nas Figuras 23 F, H e 25 D. A base das raízes secundárias foi igualmente a região de maior detecção de fluorescência da estirpe HCC103<sup>GFP</sup> quando inoculada na variedade comercial de arroz IAC440, demonstrando que a variedade da planta não influenciou visualmente no padrão de colonização.



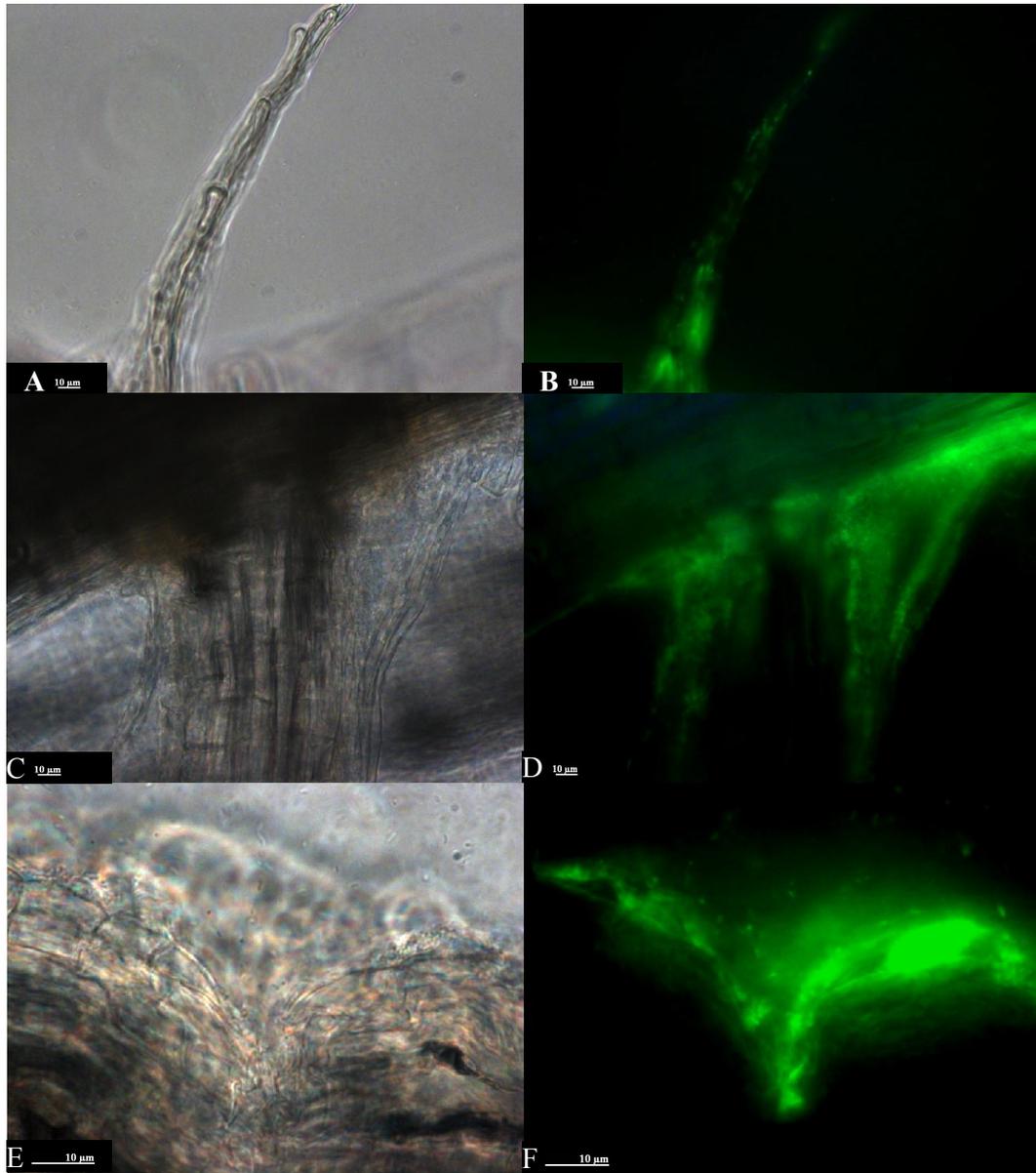
**Figura 19.** *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> colonizando a superfície radicular de arroz Vermelho Virgínia quatro dias após a inoculação. A, C, E e G: sob luz branca. B, D, F e H: sob luz ultravioleta. A e: zona de emergência de raiz lateral; C e D: pelo radicular; E a H: rompimento epidérmico.

Os sistemas hidropônicos inoculados com *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54<sup>GFP</sup> também mostram a formação de micro-colônias na zona radicular, frequentemente detectadas em depressões, dobras e falhas na epiderme radicular, bem como zonas de emergência de raízes laterais e pelos radiculares (Figuras 23 e 26). A zona pilífera das raízes, rica em pelos absorventes, foi fortemente colonizada por HRC54<sup>GFP</sup> (Figura 24 B e D), região de menor detecção de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup>. Botões de emissão de raízes secundárias e a base destas raízes foram colonizados no mesmo padrão que ocorreu com HCC103<sup>GFP</sup>. Muito embora o sinal de fluorescência de HRC54<sup>GFP</sup> não tenha sido da mesma magnitude, tanto bactérias isoladas quanto micro-colônias foram facilmente detectadas.

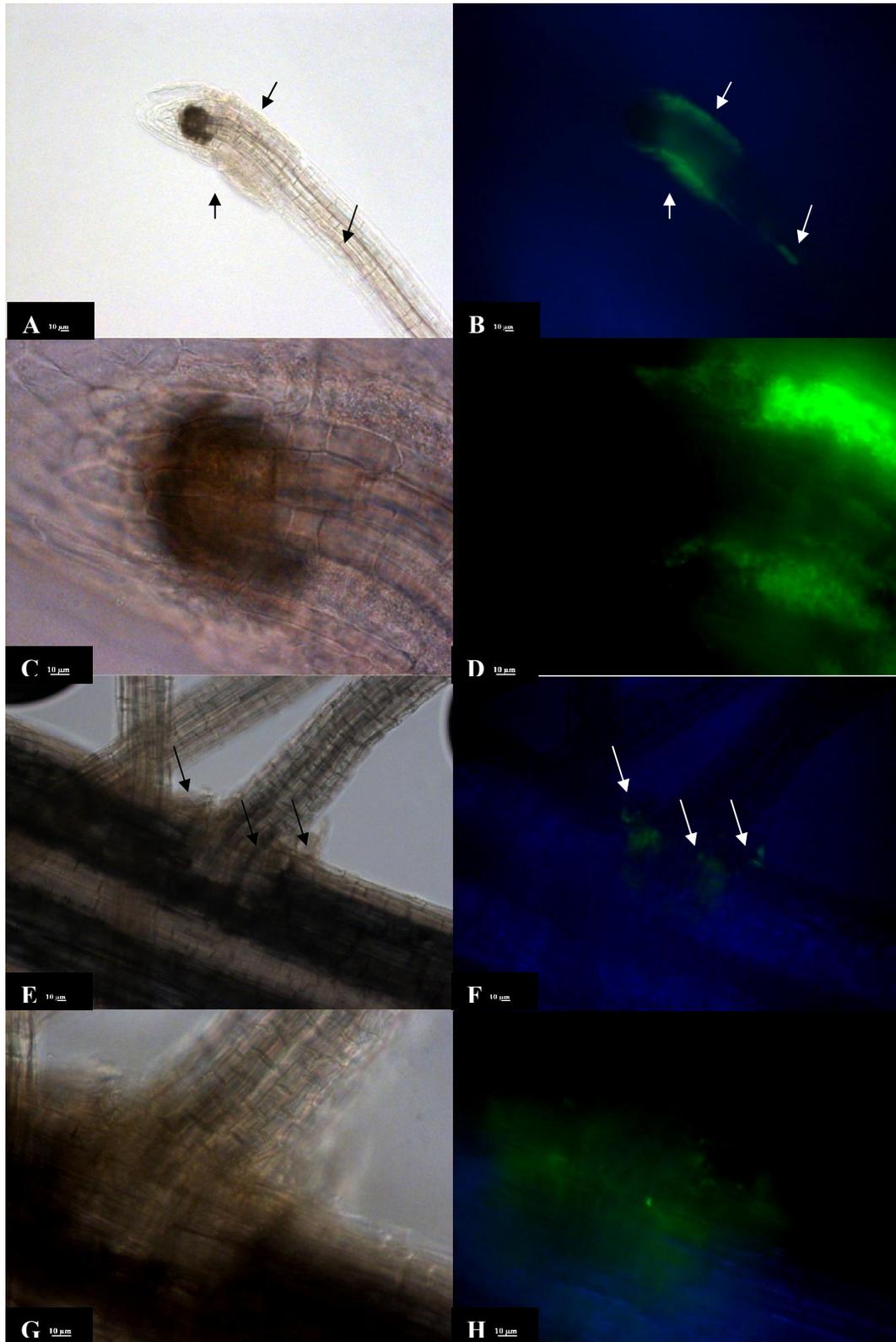
Estudos de interação da estirpe Z67 pertencente à espécie *Herbaspirillum seropedicae* com raízes de plantas de arroz das variedades IR72 e IR42 foram realizados utilizando o sistema de imunomarcção (JAMES et al., 2002). Os resultados mostraram a formação de colônias em regiões adjacentes às zonas de emergência de raízes laterais, concordando com o observado e exposto nas Figuras 19 a 22. O autor também relata que a bactéria parece penetrar neste local via rupturas formadas pelas raízes laterais emergentes, corroborando com o exposto neste trabalho, que claramente visualiza a colonização intensa de falhas na epiderme radicular, principalmente na zona de emergência de raízes laterais (Figuras 19F, H; 21F, 26D). O mesmo foi observado nos ensaios realizados neste trabalho, tanto com arroz IAC4440 quanto com arroz Vermelho Virgínia. As regiões de emergência de botões radiculares mostravam vasta colonização bacteriana, sugerindo que a abertura formada pelo meristema radicular lateral no córtex abria espaços onde as bactérias se fixavam.

Os resultados aqui apresentados concordam com estudos anteriores, onde bactérias diazotróficas endofíticas de diferentes espécies como *Azoarcus sp.* (HUREK et al., 1994), *Serratia marcescens* (GYANESHWAR et al., 2001), *Bacillus megaterium* (LIU et al., 2006) *Burkholderia vietnamensis* (GOVINDARAJAN et al., 2008), e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (ROUWS et al., 2010) colonizaram preferencialmente as regiões de emergência de raízes laterais de arroz, confirmando que esta região é uma das principais vias de entrada de bactérias nos tecidos radiculares das plantas de arroz.

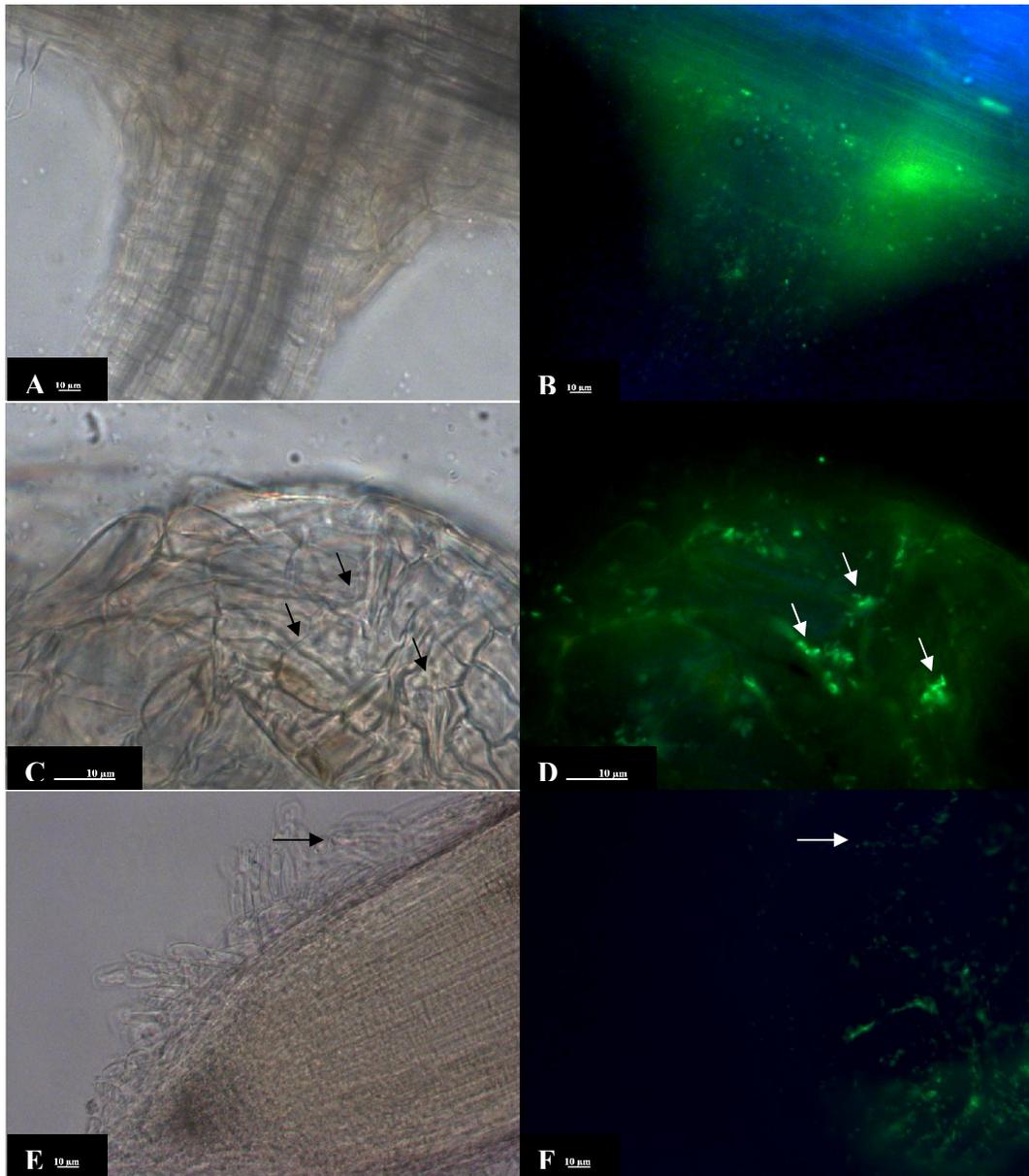
A utilização de sistemas vegetais não-estéreis na avaliação do padrão de colonização pelas estirpes HRC54 e HCC103 pode mudar substancialmente o padrão observado, uma vez que menos pontos de fixação bacteriana podem estar disponíveis, além de as bactérias presentes poderem secretar substâncias antibióticas, ativando respostas de defesa contra a população bacteriana mista (MONTEIRO et al., 2008). Apesar desta possibilidade, Njoloma e colaboradores (2006) estudaram a colonização de plântulas de cana não estéreis destacadadas de gemas caulinares por *Herbaspirillum spp.* B501gfp1 e observaram densa colonização das regiões de emergência de raízes laterais pelas bactérias marcadas, enfatizando esta via de penetração de bactérias diazotróficas endofíticas nos tecidos da planta hospedeira.



**Figura 20.** *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> colonizando a superfície radicular de arroz IAC4440 quatro dias após a inoculação. A e B: radícula emergente; C e D: zona de emergência de raiz lateral; E e F: rompimento epidérmico em dobramento da raiz principal.



**Figura 21.** *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> colonizando a superfície radicular de arroz Vermelho Virgínia. Cinco dias após a inoculação. A a D: zona de desprendimento de células radiculares epidérmicas; E a H: zona de emergência de raízes laterais.



**Figura 22.** *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> colonizando a superfície radicular de arroz IAC4440 sete dias após a inoculação. A e B: zona de emergência de raiz lateral; C e D: botão de emergência de raiz lateral; E e F: pelos na região do ápice radicular.

#### 4.8 Avaliação da ascensão xilemática das culturas por fluxo transpiratório

O objetivo do ensaio de ascensão xilemática foi verificar a capacidade das estirpes penetrarem nos vasos xilemáticos e atravessarem o nó do colmo, região altamente complexa na anatomia da cana-de-açúcar e com descontinuidades nos vasos xilemáticos, que obrigam os microrganismos a percorrer espaços intercelulares no tecido parenquimático.

As avaliações microscópicas realizadas as oito, 12, 24, 48 e 72 horas após a inoculação mostraram a presença de fluorescência mais facilmente detectável entre as 8 e 12 horas, não tendo sido detectada atividade de fluorescência nos cortes de tecido vegetal avaliados por microscopia às 24, 48 e 72 horas após a montagem do experimento. Em ensaios semelhantes avaliados com métodos de microscopia eletrônica, foi verificado que a presença *Gluconacetobacter diazotrophicus* nos vasos xilemáticos de cana-de-açúcar variedade Ja 60-5 provocou uma forte reação por parte da planta, que causou bloqueio dos vasos xilemáticos com uma substância gomosa avermelhada, matando as bactérias e impedindo o fluxo transpiratório (DONG et al., 1994). É possível que a mesma reação tenha ocorrido, uma vez que às 24 horas de condução do experimento já era facilmente observável a senescência das folhas, e por ocasião da avaliação de 72 horas as folhas apresentavam-se completamente secas.

Foram detectados aglomerados das estirpes HCC103<sup>GFP</sup> e HRC54<sup>GFP</sup> unicamente dentro dos vasos xilemáticos, o que já era esperado uma vez que as paredes destes vasos são bastante suberizadas e lignificadas (DONG et al., 1994), provocando bloqueio tanto da passagem de bactérias para os tecidos circundantes quanto de solutos para a seiva xilemática. À medida que as avaliações distanciavam-se da região de contato direto com a cultura, a frequência de detecção das estirpes HCC103<sup>GFP</sup> e HRC54<sup>GFP</sup> caía drasticamente, não havendo visualização de fluorescência a partir do terceiro entrenó. Dong e colaboradores (1997) explicam que o movimento longitudinal de bactérias e outras partículas grandes na variedade de cana Ja 60-5 é fortemente limitado na região dos nós, pois os vasos apresentam fundo cego em 90% dos casos e apenas um por cento dos vasos abertos se estendem além de mais de um nó, quando não estão limitados por células vivas, fato este que explicaria a limitação da ascensão bacteriana pelo colmo da cana-de-açúcar. James & Olivares (1998) descreveram a colonização dos vasos xilemáticos de cana após a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*, e tanto *Herbaspirillum rubrisubalbicans* quanto *Herbaspirillum seropedicae* são frequentemente encontrados nos espaços intercelulares parenquimáticos quanto células xilemáticas do cilindro central quatro dias após a inoculação (OLIVARES et al., 1997). Como aqui demonstrado, provavelmente os vasos xilemáticos são vias de dispersão das bactérias por toda a planta, facilitando uma dispersão sistêmica mais rápida que a migração pelos espaços intercelulares (ROTHBALLER et al., 2008).

Tanto a estirpe HCC103<sup>GFP</sup> quanto HRC54<sup>GFP</sup> foram detectadas com relativa frequência aderidas às paredes dos vasos condutores xilemáticos (Figuras 27 D, F, H e J; 28 F), e em alguns cortes foi possível verificar a obstrução do vaso por *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup>, como exemplificado pelas Figuras 28 B e 28 D. É possível que as bactérias tenham se acumulado nos vasos de fundo cego e limitado o fluxo de seiva para a parte aérea da planta, mesmo no caso de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup>, acelerando o processo de ressecamento das folhas observado a partir das 24 horas de condução do experimento. Ensaos semelhantes demonstraram acúmulo de partículas de látex nos fundos cegos de vasos xilemáticos nas regiões dos nós de cana (DONG et al., 1997), provocando um processo análogo ao entupimento de uma membrana filtrante, prejudicando e até mesmo bloqueando por completo o fluxo xilemático.

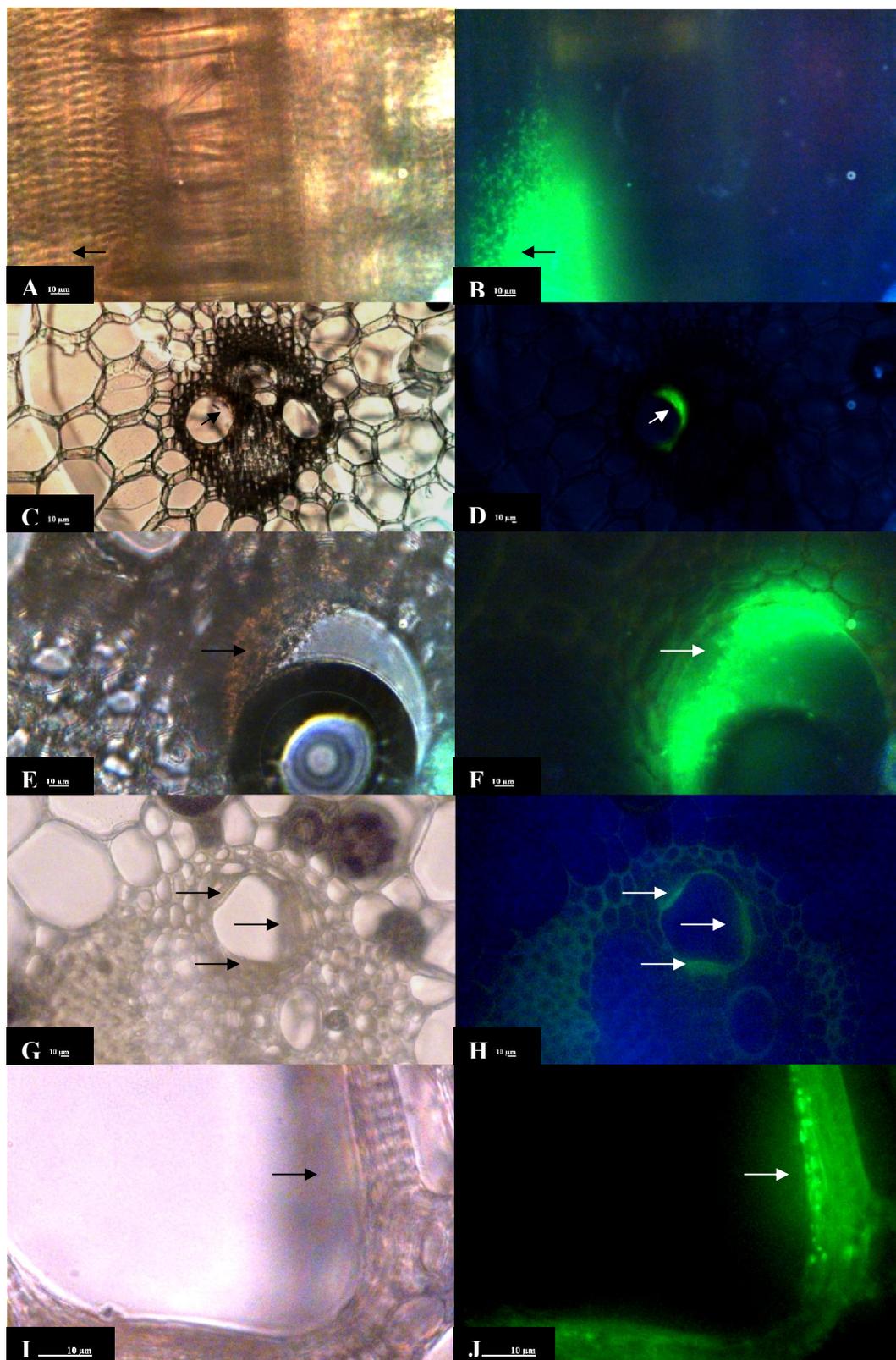
O padrão de ocupação do xilema por *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> diferiu sutilmente daquele exibido por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> nos fragmentos de colmo avaliados. *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> foi detectado, algumas vezes,

ocupando todo o espaço interno de um elemento de vaso (Figuras 28 B e 28 D), levando a crer que este estivesse bloqueado pelas bactérias. Tal visualização foi rara nos colmos submetidos à ascensão xilemática por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> (Figura 23 B).

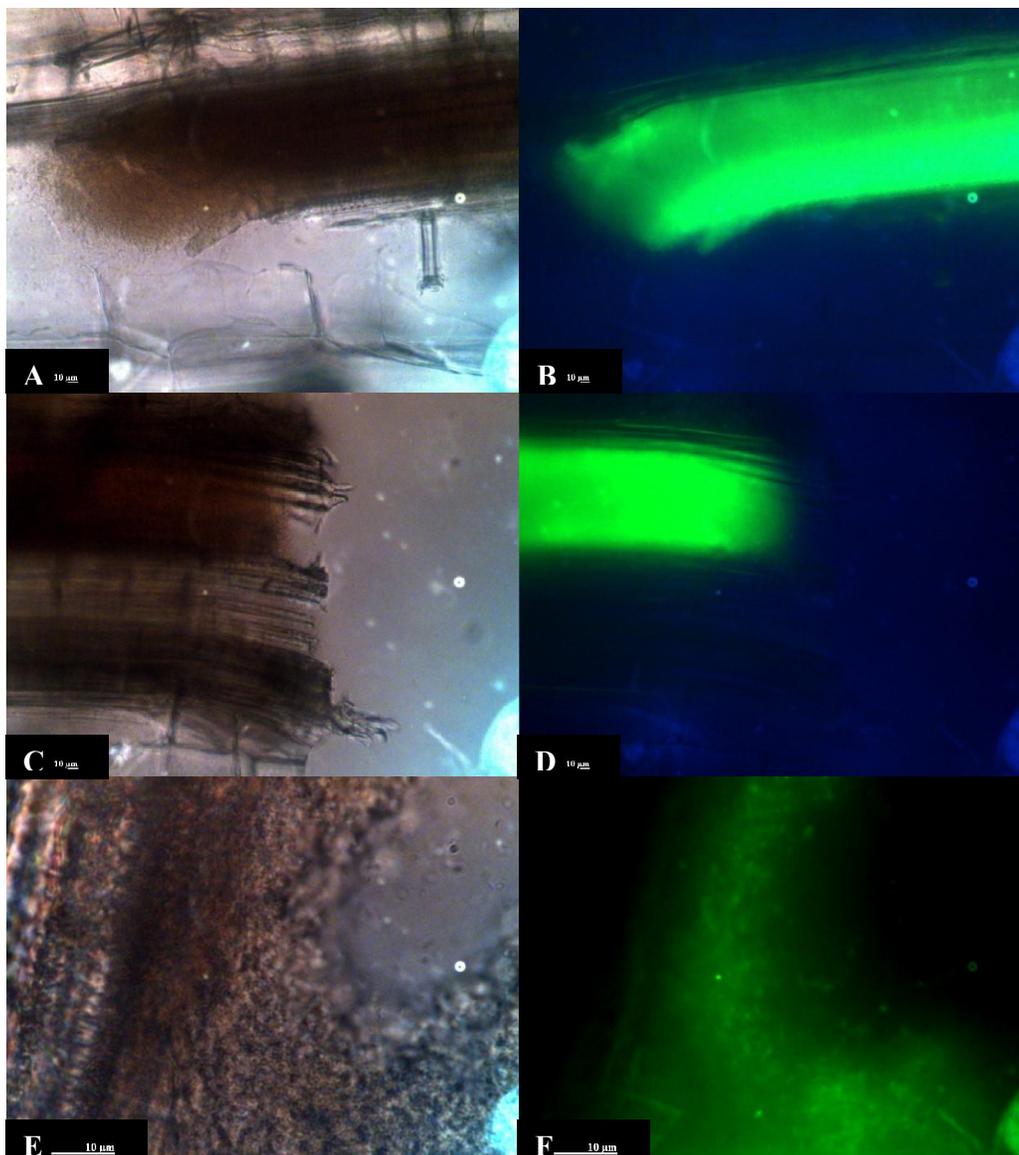
A distribuição de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> assemelhou-se a ensaio já avaliado por ocasião de inoculação da mesma estirpe original em folhas de cana, onde a bactéria foi localizada aparentemente encapsulada, em pequenos aglomerados aderidos à parede secundária metaxilemática, não obstruindo totalmente o feixe vascular (OLIVARES et al., 1997), disposição esta facilmente verificada nas Figuras 23 D, F, H e J. Raras foram as observações nas quais era possível verificar o preenchimento do elemento de vaso com HCC103<sup>GFP</sup>, ilustrado pela Figura 23 B, onde apesar de vasta multiplicação celular, percebe-se que as bactérias estão aderidas à lateral do elemento de vaso, não preenchendo-o totalmente. Possivelmente as bactérias se apresentam aderidas à parede lateral do elemento de vaso devido às pontuações presentes, que fazem a comunicação entre elementos e entre o parênquima adjacente. Apesar de as células maduras dos tecidos parenquimáticos de reserva dos entrenós exibirem alta lignificação e suberização, algumas regiões permanecem não suberizadas (DONG et al., 1997). Estas regiões provavelmente cedem certa quantidade de nutrientes para o fluxo xilemático, funcionando como uma fonte de alimento para as bactérias aderidas, justificando a distribuição das mesmas, acompanhando a parede celular ao invés de dispersarem-se pelo elemento de vaso.

*Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup>, por sua vez, desencadeou uma resposta mais enfática da planta, na qual as bactérias aparentemente foram confinadas no espaço xilemático pela secreção de substâncias de defesa, limitando a distribuição das mesmas e bloqueando sua ascensão mais efetivamente. Foi bastante frequente a observação de vasos aparentemente bloqueados por bactérias marcadas (Figuras 24 B e D) e, não raro, vasos seccionados demonstravam elevada colonização interna, com muitas bactérias “escapando” pela abertura provocada pela lâmina de corte (Figura 24 F), concordando com o exposto por Olivares e colaboradores (1997), que compararam a distribuição de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* em folhas inoculadas de plantas de sorgo.

Esperava-se que fossem localizadas bactérias marcadas no espaço apoplástico intercelular ao menos na região dos nós, o que explicaria a passagem das bactérias por esta região mesmo com a descontinuidade dos feixes vasculares, mas não houve nenhuma visualização positiva desta situação. Revisões sobre a associação entre *Herbaspirillum* e plantas da família *Poaceae* (JAMES & OLIVARES, 1998; MONTEIRO et al., 2012) reportam resultados onde foi possível a visualização da bactéria ocupando tanto espaço apoplástico inter celular quanto xilemático, mas nenhum dos ensaios usou técnica semelhante à aplicada no presente estudo. Como o sistema montado para ascensão por fluxo xilemático é artificial, é possível que não seja prontamente comparável a inoculações por via radicular.



**Figura 23.** Ocupação dos vasos xilêmáticos de colmo de cana-de-açúcar RB867515 por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup>. A e B: corte longitudinal na região do segundo entrenó enfatizando a obstrução do elemento de vaso. C a J: cortes transversais, sendo C a F na região do segundo entrenó e G a I na região do segundo nó, todos enfatizando ocupação dos elementos de vasos xilêmáticos à partir das paredes celulares.



**Figura 24.** Ocupação dos vasos xilemáticos de colmo de cana-de-açúcar RB867515 por *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup>. A a D: cortes longitudinais enfatizando feixes xilemáticos obstruídos pela bactéria no primeiro entrenó. E e F: corte transversal demonstrando adesão às paredes do elemento de vaso.

O apoplasto de cana-de-açúcar tem composição muito semelhante ao meio de cultivo utilizado para seleção de bactérias diazotróficas endofíticas (DONG et al., 1994), o que explicaria a passagem das bactérias pela região do nó via pelo espaço apoplástico intercelular, mas não houve nenhuma ocorrência neste trabalho na qual fosse visualizado esta situação.

Uma vez que a localização por microscopia da fluorescência da estirpe marcada exige cortes extremamente finos de tecido vegetal e o colmo de cana é um material bastante suberizado, muitos cortes são descartados até que se obtenha um minimamente aceitável para análise microscópica. Com o objetivo de aumentar a detecção das estirpes marcadas nos colmos submetidos ao experimento de ascensão xilemática por fluxo respiratório das culturas marcadas, foi realizada a maceração dos tecidos dos quatro entrenós mais próximos da cultura marcada utilizada e uma parte deste material foi disposta em frascos cotendo meio de cultura

semi-sólido com fonte seletiva de carbono e antibiótico de seleção plasmidial. Os testes de compatibilidade do meio de cultura utilizado inoculado com as culturas puras são ilustrados pela Figura 25.

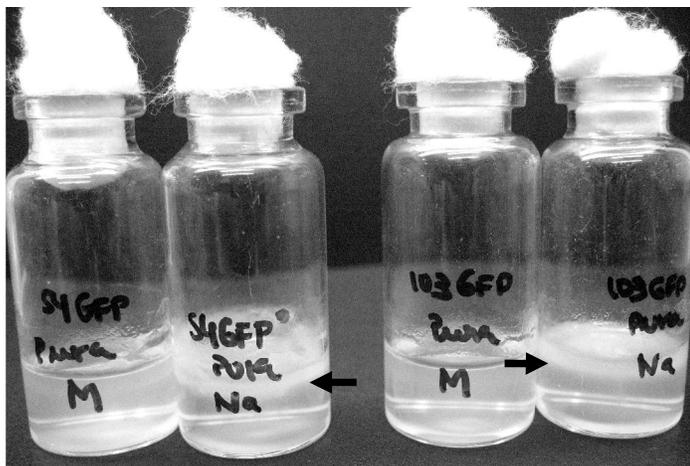


Figura 25. Meio de cultivo JNFB semi-sólido contendo meso-eritritol (M) e N-acetil glicosamina (N) inoculado com HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup>.

De acordo com a literatura, *Herbaspirillum seropedicae* deveria multiplicar-se na presença de N-acetil glicosamina como fonte de carbono, e não na presença de meso-eritritol. Já *Herbaspirillum rubrisubalbicans* deveria ter comportamento contrário, desenvolvendo-se na presença de meso-eritritol e não de N-acetil glicosamina (GARRITY et al., 2005). Baseando-se nesta informação, foram preparados meios de cultivo semi-sólido com as referidas fontes seletivas de carbono. Para total surpresa, a fonte de carbono aparentemente não selecionou as espécies de *Herbaspirillum* como esperado, conforme demonstra a Figura 29. Apesar disso, uma vez que os colmos submetidos à ascensão xilemática por fluxo transpiratório terem sido tratados separadamente com cada estirpe, não ocorreram problemas de contaminação, porém foi necessário um tempo maior para recuperação de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup>, que só formou película característica no meio com meso-eritritol aos 5 dias após inoculação, diferentemente de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup>, que aos 3 dias mostrava uma película bastante significativa. É possível que o observado seja um efeito da estirpe HCC103, que aparentemente utiliza N-acetil glicosamina, semelhante a HRC54, mas também utiliza meso-eritritol, como as estirpes anteriormente relatadas, pois houve crescimento quando na presença desta fonte de carbono, que também é fonte de nitrogênio, embora em quantidades menores do que em meio de cultivo clássico.

Em todos os frascos que receberam material vegetal proveniente de colmos tratados com HRC54<sup>GFP</sup> foi detectada fluorescência, demonstrando que mesmo no quarto entrenó houve a presença das bactérias marcadas, de maneira que o espaço apoplástico intercelular possivelmente participou do fluxo de bactérias em ascensão pelo colmo. Como já comentado, a composição do apoplasto da planta de cana-de-açúcar é bastante parecida com meios de cultivo utilizados para crescimento de bactérias diazotróficas endofíticas, apesar de seu pH 5,5 (DONG et al., 1994), considerado relativamente baixo. Bactérias do gênero *Herbaspirillum* são bastante tolerantes a ampla faixa de pH, abrangendo de 5,3 a 8,0 (SCHMID et al., 2006), não sendo esta característica do espaço apoplástico um fator limitante para a ocupação do mesmo por parte destas bactérias. Uma vez que a expressão da GFP é altamente dependente do pH, onde a protonação da proteína expressa pode modificar o comprimento de onda da emissão da fluorescência (ZACHARIAS, 2006), a visualização da

fluorescência de bactérias possivelmente presentes no espaço apoplástico intercelular em baixas quantidades pode ter sido comprometida, além da dificuldade de produção de cortes suficientemente finos para visualização ao microscópio, o que reduz ainda mais a probabilidade de detecção visual direta nos tecidos vegetais.

No caso de HCC103<sup>GFP</sup>, a visualização de crescimento bacteriano no meio semi-sólido e de fluorescência só foi possível no quinto dia após a inoculação do meio de cultivo, e unicamente nos frascos correspondentes ao material do quarto entrenó. Este dado mostra que a distribuição de bactérias marcadas no colmo era bastante dispersa, e provavelmente durante a inoculação dos frascos correspondentes aos outros entrenós, mais próximos da cultura, o material que foi efetivamente aplicado aos meios de cultura provavelmente não continha bactérias marcadas.

#### **4.9 Avaliação da inoculação de mini-toletes de cana-de-açúcar variedade RB867515 com *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup>**

Os ensaios de inoculação realizados com *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpes HRC54<sup>GFP</sup> e HCC103<sup>GFP</sup>, respectivamente demonstraram sensível diferença no padrão geral de ocupação e colonização dos espaços apoplásticos quando inoculadas em mini-toletes de cana-de-açúcar variedade RB867515.

As duas estirpes colonizaram as escamas externas à gema do mini-tolete, demonstrando que as rachaduras no tecido epidérmico provocadas por ocasião do brotamento do meristema são uma provável via de penetração das bactérias nos tecidos da planta (Figuras 30 e 31). No caso de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> foi possível a visualização de tecidos rompidos na região da gema com seus espaços intercelulares totalmente ocupados por células fluorescentes, mostrando a invasão dos tecidos da planta pela bactéria (Figura 31).

Os espaços apoplásticos intercelulares foram extensivamente colonizados por *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup>, que ocupou várias regiões do tecido equivalente aos internós do mini-tolete (Figura 32). As análises microscópicas realizadas demonstraram tanto colônias estabelecidas quanto células individuais ocupando estes espaços. Autores comentam que a região intercelular do parênquima dos internós maduros de cana-de-açúcar é rica em fontes de carbono, constituindo-se no mais provável local para simbiose com bactérias endofíticas (DONG et al., 1994). A concentração de glicose em colmos de cana da variedade TUC 77-42 foi avaliada em 5,69 a 17,52 mg/100mL, e os autores concluíram que esta concentração é suficiente para a manutenção da espécie *Herbaspirillum seropedicae*, detectada e quantificada no apoplasto da planta, uma vez que esta bactéria é capaz de metabolizar esta fonte de carbono (BELLONE & BELLONE, 2006). Estudos de infiltração de estirpes do inoculante marcadas com GFP em internós de cana demonstraram que as bactérias do gênero *Herbaspirillum* penetravam nos espaços intercelulares e apresentavam atividade de redução de acetileno (ARA) e em população estável até cinco dias após a inoculação, demonstrando que estes tecidos são compatíveis com a manutenção do metabolismo desta espécie endofítica (ZAKRIA et al., 2008a).

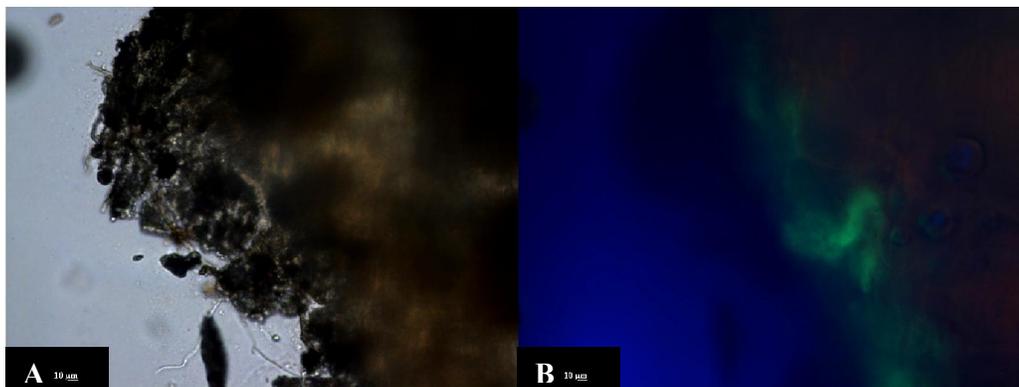


Figura 30. Colonização superficial das escamas epidérmicas da gema do mini-tolete de cana-de-açúcar RB867515 por *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> um dia após a inoculação.

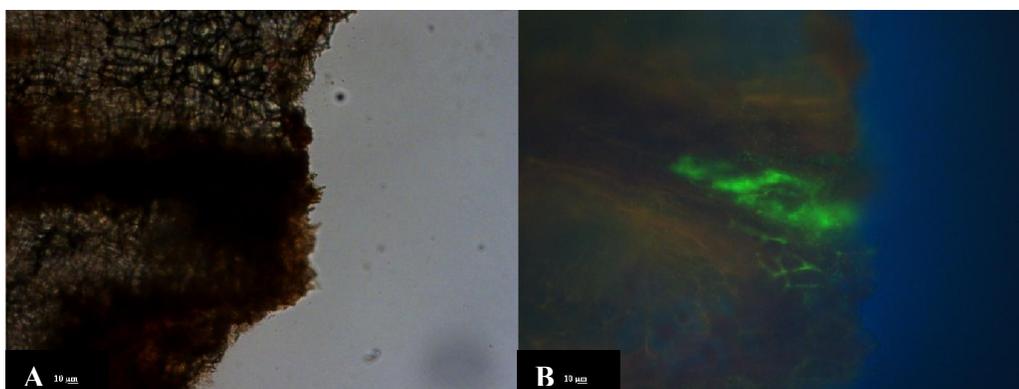


Figura 31. Colonização superficial das escamas epidérmicas da gema do mini-tolete de cana-de-açúcar RB867515 por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> um dia após a inoculação.

Os tecidos parenquimáticos são, principalmente no caso da cana-de-açúcar, ricos em fontes de carbono por serem tecidos de armazenamento (NJOLOMA et al., 2005), justificando a alta detecção de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> nos espaços apoplásticos intercelulares, em comparação à baixa frequência de visualização desta estirpe nos elementos de vaso e traqueídeos dos mini-toletes inoculados concordando com dados de Njoloma e colaboradores (2006), o que demonstra que os vasos xilemáticos são provavelmente apenas transportadores desta estirpe (NJOLOMA et al., 2005), e não um local de multiplicação.

Nas raras oportunidades em que se visualizou a associação entre *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> e vasos xilemáticos, as bactérias estavam claramente ocupando a superfície dos vasos, e não seu interior (Figura 34). Em nenhuma ocasião houve visualização de vasos xilemáticos preenchidos com HRC54<sup>GFP</sup> nos experimentos de inoculação de mini-toletes. A forte reação por parte da planta observada no bloqueio dos elementos de vaso e traqueídeos do colmo de cana submetidos ao experimento de ascensão via fluxo xilemático transpiratório de culturas de HRC54<sup>GFP</sup> associada aos resultados obtidos pelos experimentos de inoculação de mini-toletes nos levam a concluir que o xilema da planta possivelmente não é o habitat natural desta estirpe bacteriana, e que o provável local de multiplicação e associação endofítica de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 com tecidos de cana-de-açúcar são os espaços apoplásticos intercelulares, ricos em fontes de carbono disponíveis, como sacarose e glicose (BELLONE & BELLONE, 2006), corroborando dados de Olivares e colaboradores (1997) e experimentos com *Herbaspirillum spp.* B501gfp1, que também

demonstrou um padrão de colonização densa e alongada quando inoculado em cana micropropagada, aparentemente seguindo espaços intercelulares (NJOLOMA et al., 2006b).

*Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup>, por sua vez, foi raramente detectado nos espaços intercelulares e frequentemente visualizado ocupando paredes de vasos xilemáticos, demonstrando a ocupação diferencial de habitats no interior dos mini-toletes, concordando com o observado no experimento de ascensão xilemática por fluxo transpiratório, ficando aqui demonstrado que a estirpe HCC103 tem algum grau de afinidade com as paredes dos vasos xilemáticos, e que coloniza esta região sem aparentemente multiplicar-se de maneira exagerada, não obstruindo o fluxo no interior dos vasos. Na Figura 35 evidencia-se a forma discreta de ocupação do interior do elemento de vaso na região do entrenó do mini-tolete pela estirpe HCC103<sup>GFP</sup> de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. A Figura 36 igualmente demonstra a ocupação dos vasos xilemáticos por parte da estirpe HCC103<sup>GFP</sup>, porém na região do entrenó, ilustrando que independentemente da região amostrada, é muito comum a observação de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* no interior de vasos xilemáticos, e rara sua visualização nos espaços intercelulares.

As detecções realizadas das estirpes marcadas em mini-toletes concordam com aquelas já apresentadas no experimento de fluxo xilemático, uma vez que *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> ocupou mais frequentemente os espaços intercelulares e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> os elementos de vaso e traqueídeos, demonstrando a ocupação diferencial de regiões nos mini-toletes inoculados por imersão na cultura bacteriana, demonstrando que cada estirpe estudada tem diferentes preferências de locais de colonização dos tecidos da mesma planta hospedeira.

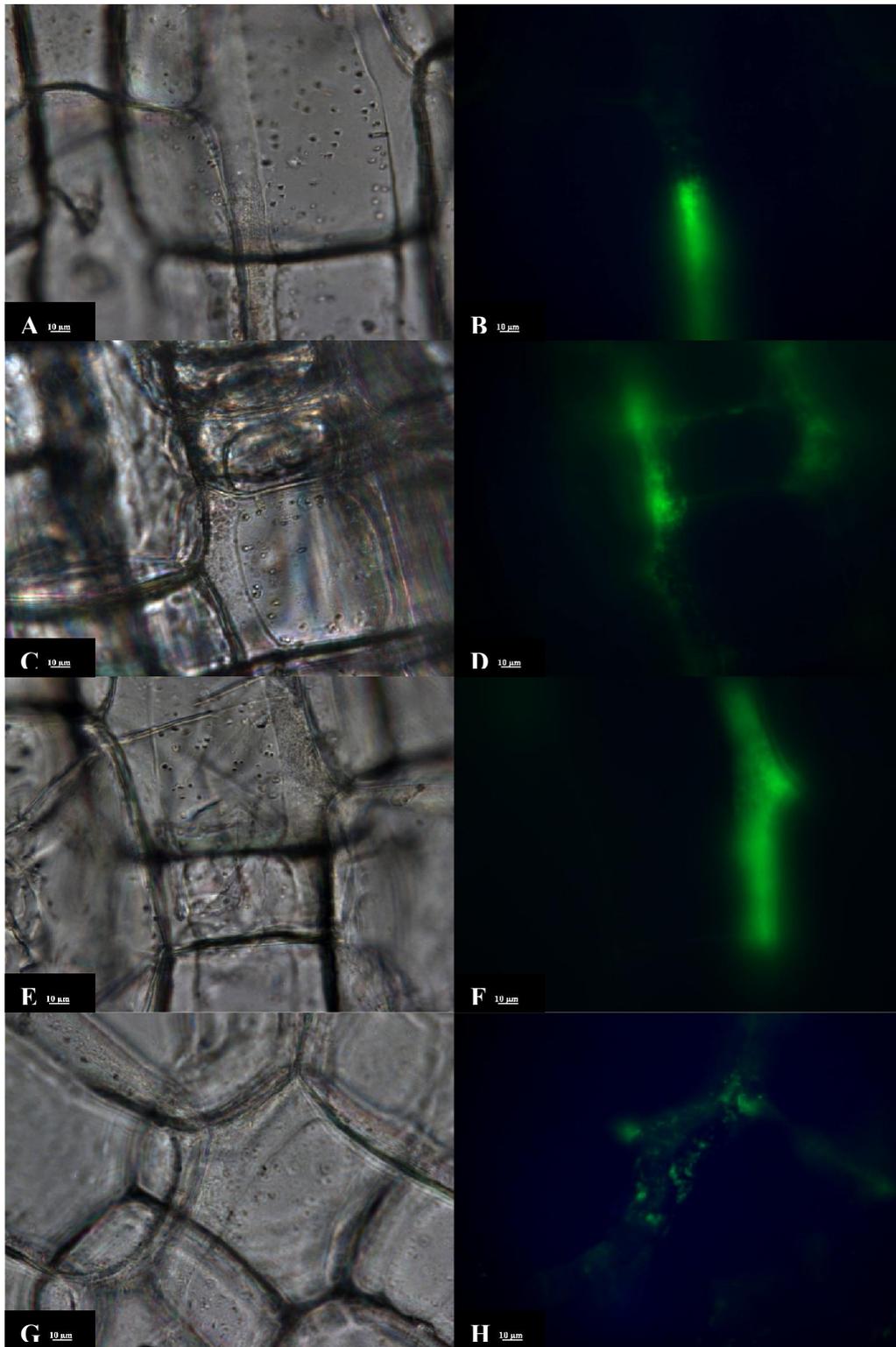


Figura 32. Ocupação do espaço apoplástico intercelular dos tecido parenquimático de mini-toletes de cana-de-açúcar RB867515 por *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> um dia após a inoculação.

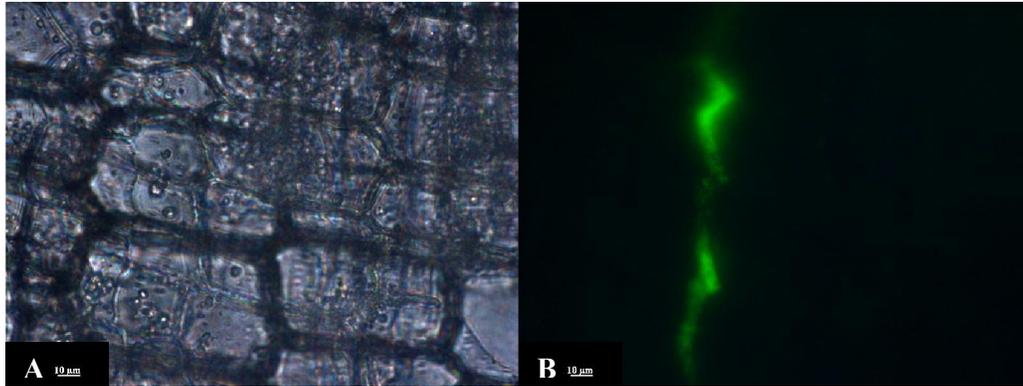


Figura 33. Ocupação do espaço apoplástico intercelular dos tecido parenquimático de mini-toletes de cana-de-açúcar RB867515 por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> um dia após a inoculação.

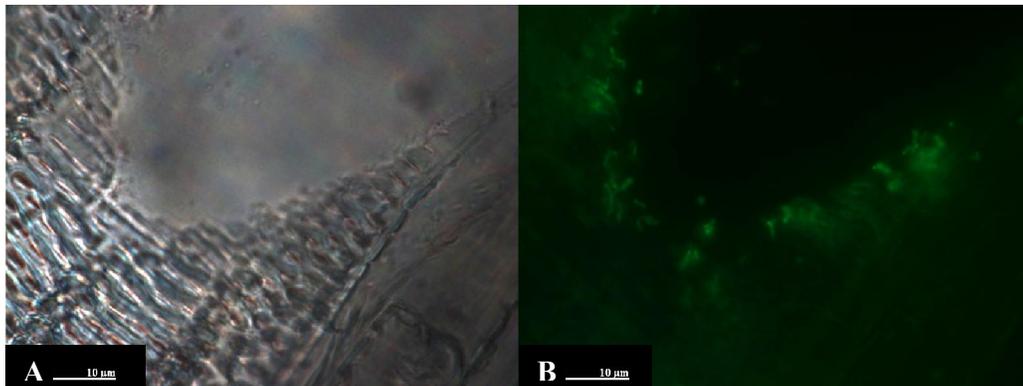


Figura 34. Paredes dos vasos xilêmicos de mini-toletes de cana-de-açúcar RB867515 colonizadas superficialmente por *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> quatro dias após a inoculação.

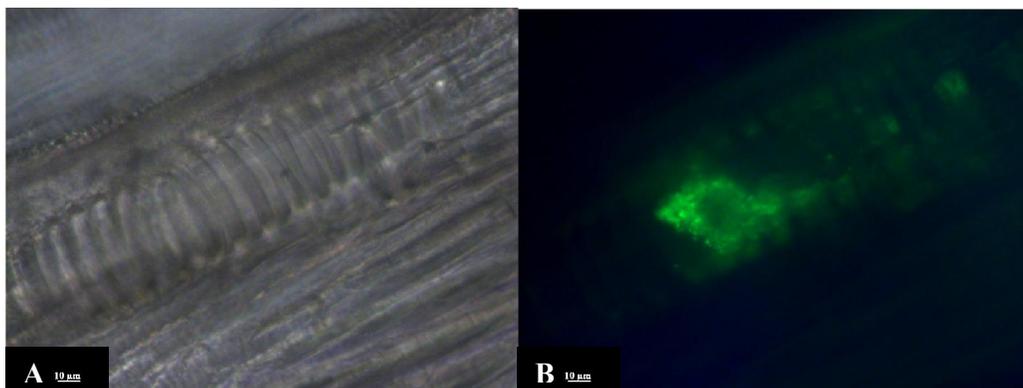
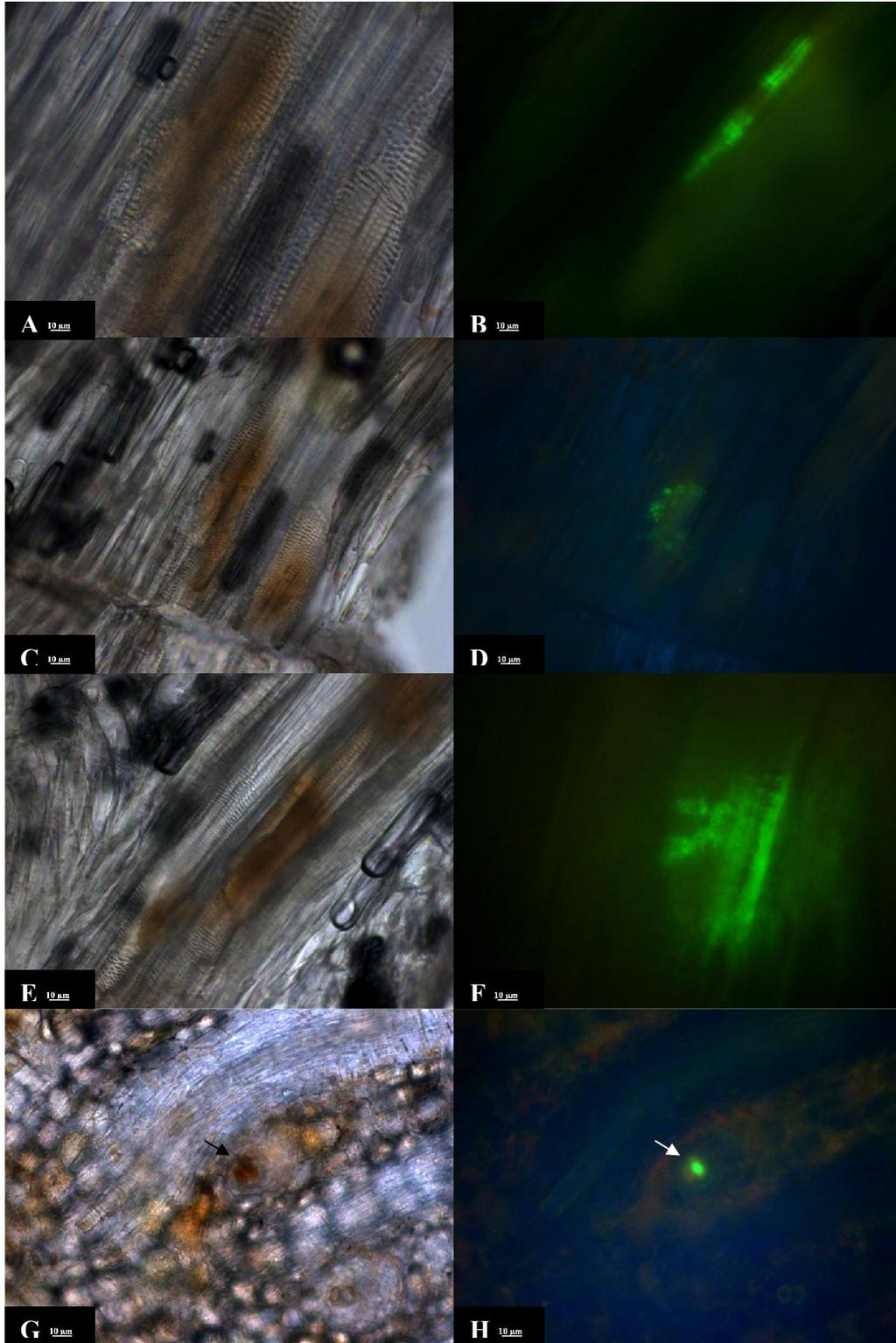


Figura 35. Vaso xilêmico da região do entrenó de mini-tolete de cana-de-açúcar RB867515 colonizado internamente por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> quatro dias após a inoculação.



**Figura 36.** Vasos xilemáticos da região do nó de mini-tolete de cana-de-açúcar RB867515 colonizados internamente por *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> quatro dias após a inoculação.

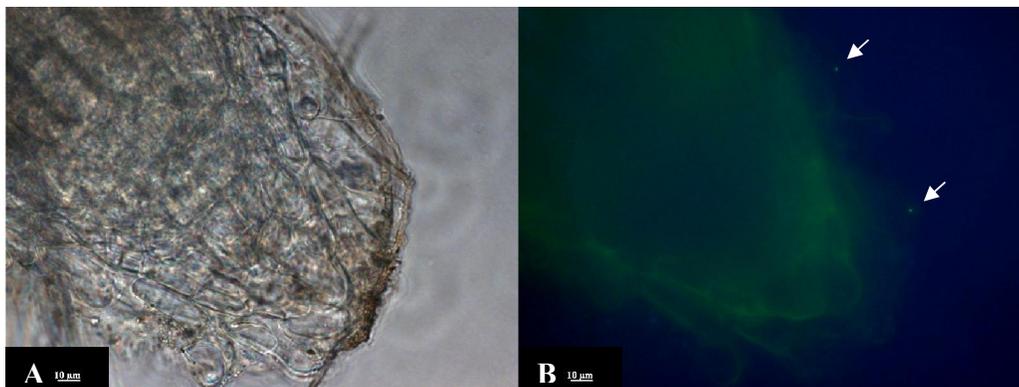
Secções transversais sucessivas de caules de plântulas de cana não estéreis inoculadas com *Herbaspirillum spp.* B501gfp1 demonstraram vasos xilemáticos cheios de bactérias marcadas, além de a colonização ter sido também observada nas células parenquimáticas dos vasos xilemáticos e nos seus espaços intercelulares (NJOLOMA et al., 2006). *Herbaspirillum spp.* B501gfp1 foi também capaz de se multiplicar em tecidos de colmo de cana, especialmente nas células parenquimáticas, consideradas região de estoque de carbono nas plantas (NJOLOMA et al., 2005).

As observações de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> nos vasos xilemáticos de mini-toletes de cana-de-açúcar associadas à sua disposição nos colmos submetidos à ascensão por fluxo transpiratório da cultura desta bactéria demonstram que as paredes xilemáticas são a região preferencial de associação desta estirpe bacteriana nos tecidos de cana. Em ambas as situações observou-se uma colonização discreta e restrita à parede dos vasos, não sendo observada obstrução do mesmo. As paredes dos vasos xilemáticos (sejam eles elementos de vaso ou traqueídeos) e o tecido parenquimático circundante apresentam pontuações (OLIVEIRA & MACHADO, 2009), que são “janelas” de comunicação com o tecido circundante. Acreditamos que, a disposição das bactérias nas paredes internas do xilema seja devido à passagem de substâncias como sacarose e glicose dos tecidos parenquimáticos adjacentes para os vasos através destas pontuações, alimentando as micro-colônias, provavelmente por este motivo estabelecidas nesta posição. Já *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> não se estabeleceu satisfatoriamente dentro dos vasos xilemáticos no experimento de ascensão, e por ocasião da inoculação dos mini-toletes demonstrou que seu habitat preferencial no interior do colmo de cana-de-açúcar realmente não é o interior dos vasos xilemáticos e sim os tecidos parenquimáticos, como demonstram os resultados.

Este ensaio tem alta significância, apesar da simplicidade, devido à utilização de mini-toletes de plantas coletadas no campo experimental, isto é, ricos em uma ampla gama de microrganismos. A maioria dos estudos com inoculação de bactérias marcadas faz uso de materiais estéreis e não reflete totalmente a realidade da ocupação de tecidos internos da planta quando há competição entre diferentes organismos, tanto benéficos quanto patogênicos.

#### **4.10 Avaliação da inoculação em plântulas de cana-de-açúcar provenientes de cariopses germinados**

Os cariopses foram germinados em areia estéril, e acreditava-se que o atrito dos ápices radiculares com os grãos do substrato fossem oferecer regiões ricas em células destacadas aptas a receber as bactérias diazotróficas endofíticas inoculadas, mas apesar de o efeito de descamação e perda de células no ápice radicular ser visível, esta região não foi colonizada nem por HRC54<sup>GFP</sup> nem por HCC103<sup>GFP</sup>, conforme ilustrado pela Figura 37. Uma explicação para este fato é que as células do ápice radicular são protegidas por uma mucilagem que além de lubrificar o ápice radicular que cresce entre os fragmentos do solo, também facilita a absorção de água (RAVEN et al., 2001). Esta mucilagem provavelmente impediu mecanicamente a colonização do ápice radicular, tendo sido localizadas apenas poucas bactérias isoladas nesta região rizosférica, como indicado pelas setas.



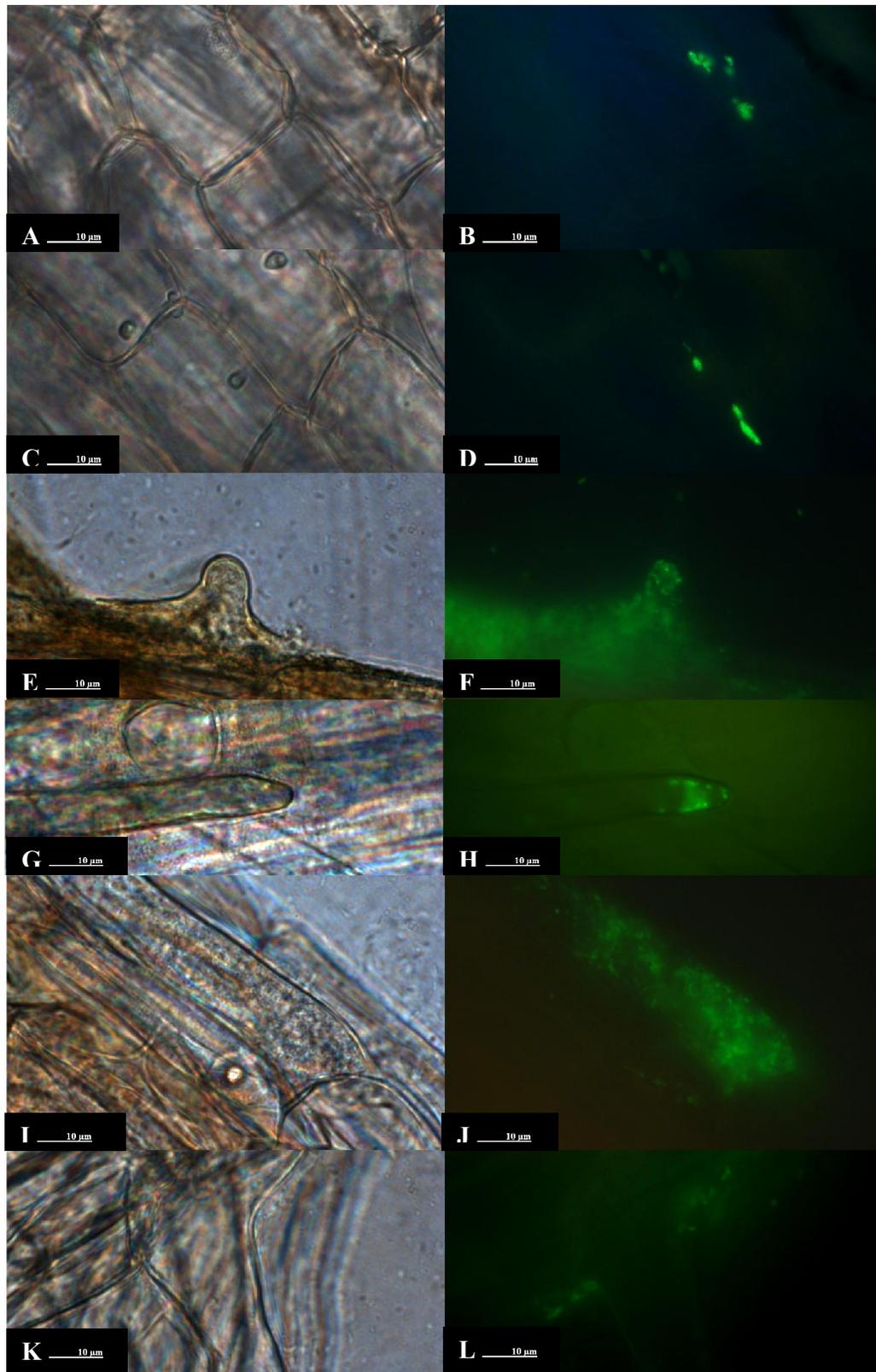
**Figura 37.** Ápice radicular de cariópse germinado de cana-de-açúcar RB867515 colonizados por HRC54<sup>GFP</sup>.

Em comparação com o observado nos experimentos com arroz hidropônico, acredita-se que devido ao sistema radicular estar totalmente imerso num sistema líquido, não havia exsudação tão intensa de mucilagem, o que pode ter facilitado a deposição no ápice radicular por ambas as estirpes de *Herbaspirillum* inoculadas.

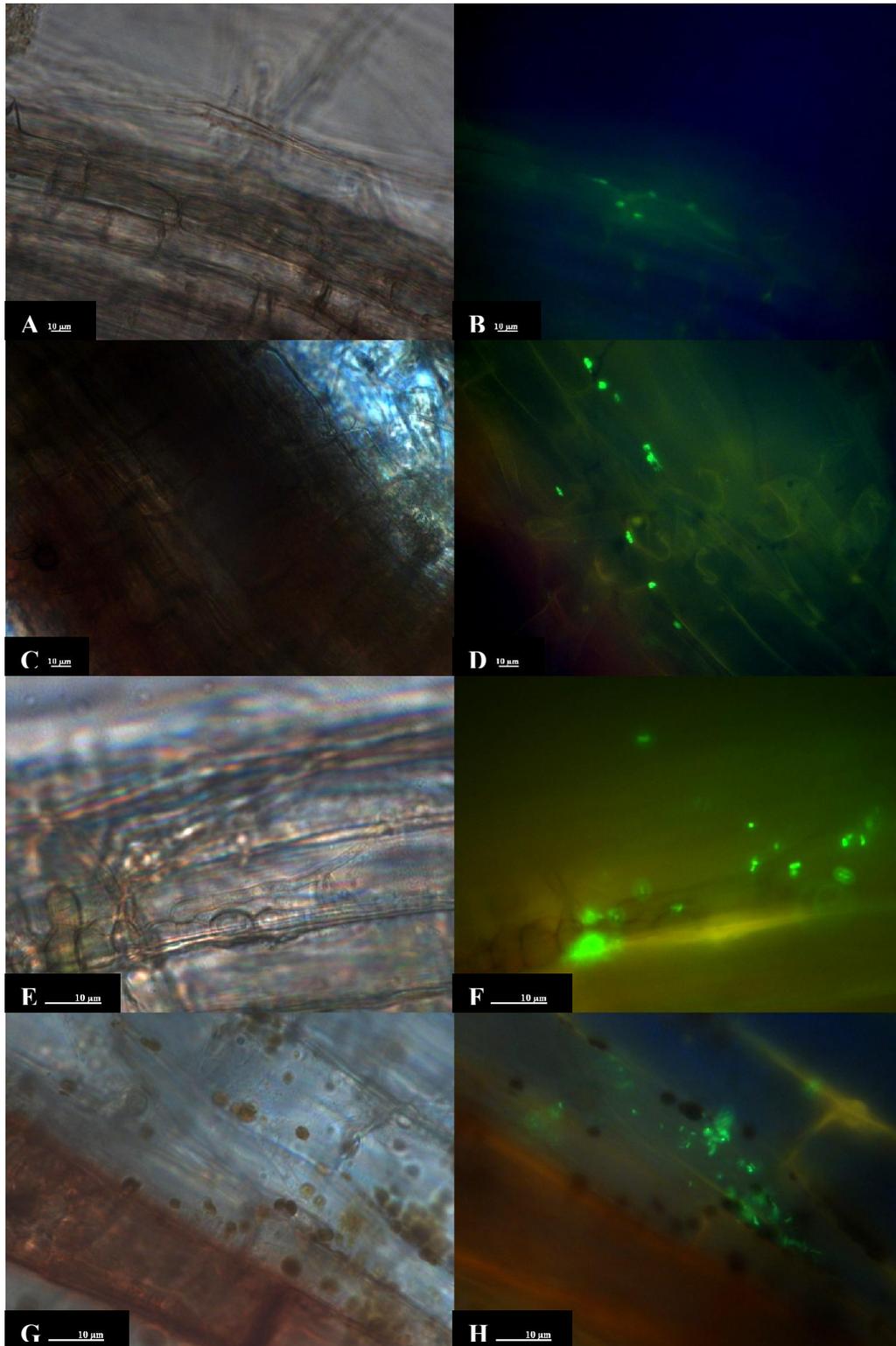
Ressalta-se que apesar de o substrato ter sido esterilizado e da cultura inoculada ser pura, os cariopses não foram totalmente desinfestados, e desta forma as condições experimentais foram de competição entre as estirpes inoculadas e as espécies de fungos e bactérias naturalmente presentes nos cariopses. Esta condição de competição provavelmente teve grande influência nos habitats escolhidos pelas estirpes inoculadas.

Observou-se que a estirpe HRC54<sup>GFP</sup> de *Herbaspirillum seropedicae* colonizou preferencialmente o terço final da radícula emergente, nas proximidades do ápice radicular, porém não nele propriamente dito (Figuras 37 e 38). De maneira geral, *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC54<sup>GFP</sup> foi detectada em rompimentos epidérmicos ocupando espaços intercelulares superficialmente (Figura 38 B e D), colonizando também pêlos radiculares em formação (Figura 38 F) e o ápice dos pelos já formados (Figura 38 H), além de eventualmente ter sido localizada cobrindo células específicas da epiderme (Figura 38 J). Em uma plântula foi localizada também na região de junção de uma raiz lateral (Figura 38 M). A distribuição de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 demonstrada nestes resultados concorda com a literatura (ELBELTAGY et al., 2001; JAMES et al., 2002) mesmo quando a estirpe em avaliação era distinta.

O padrão de colonização dos pelos radiculares exibido por *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> (Figuras 38 F, H) corrobora com o observado por Baldotto e colaboradores (2011), ocasião em que investigando a associação entre *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10 e abacaxizeiro micropropagado, observaram que os pelos radiculares eram um local visivelmente de aderência da bactéria no sistema radicular, muito embora apenas em estado inicial, onde formavam pequenos agregados e em seguida migravam para as junções intercelulares epidérmicas, como observado nas Figuras 38 B e 30 D. Ensaio com *Herbaspirillum seropedicae* marcada também demonstraram que, semelhantemente, raízes de tomate estavam fortemente colonizadas tanto na região dos pelos radiculares quanto de emergência de raízes laterais (BOTTA et al., 2013), e ensaios com sistema radicular de plântulas de feijoeiro desinfestado também demonstraram que os pelos radiculares eram o local de aderência primária de *Herbaspirillum seropedicae* RAM4 no sistema radicular, concordando com o aqui exposto, tanto para arroz quanto para cana-de-açúcar proveniente de cariopses (SCHMIDT et al., 2011).



**Figura 38.** Cariopses germinados de cana-de-açúcar RB867515 colonizados por HRC54<sup>GFP</sup>.



**Figura 39.** Cariópses germinados de cana-de-açúcar RB867515 colonizados por HCC103GFP.

Diferentemente, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103<sup>GFP</sup> exibiu uma colonização bem menos abundante, localizada no terço radicular superior, mais próxima da zona de transição para a parte aérea, colonizando predominantemente a superfície da epiderme radicular (Figura 39). Este resultado pode ser interpretado como uma provável baixa competitividade de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 contra outros organismos rizosféricos persistentes à limpeza superficial, pois nos experimentos com arroz hidropônico em cultura estéril, verificou-se um padrão bastante semelhante de distribuição das bactérias de HCC103<sup>GFP</sup> quando comparadas a HRC54<sup>GFP</sup>, diferentemente do observado nas condições não estéreis aqui testadas. *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 foi originalmente isolada de colmos de cana-de-açúcar (DÖBEREINER, 1992) e descrita como associada aos vasos xilemáticos da parte aérea de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1997) e sorgo (JAMES et al., 1997), talvez não sendo facilmente detectável e/ou suficientemente competitiva em sistemas rizosféricos. Uma vez que a bactéria também coloniza, via dispersão xilemática, as câmaras sub-estomáticas de folhas de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1997), fica ainda mais evidente que a disseminação de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* é aparentemente mais aérea do que radicular.

Concordando com o já observado nos experimentos de inoculação de arroz hidropônico, *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> colonizou os locais de emergência de raízes laterais, comportando-se conforme o esperado e já descrito na literatura por outros autores que estudaram a mesma espécie em associação com arroz (ELBELTAGY et al., 2001) e mesmo outra espécie de bactéria diazotrófica endofítica, *Gluconacetobacter diazotrophicus* (ROUWS et al., 2010; MENESES et al., 2011). Também em outras plantas hospedeiras, como cana micropropagada (JAMES et al., 2002) e plântulas sacadas de brotações de gemas (NJLOMA et al., 2006) o mesmo padrão de colonização foi observado, assim como em plantas de abacaxi (BALDOTTO et al., 2011), tomate (BOTTA et al., 2013) e feijão (SCHMIDT et al., 2011).

Na pesquisa por trabalhos semelhantes, não foram encontrados ensaios de inoculação de cana-de-açúcar proveniente de cariopses com bactérias diazotróficas endofíticas marcadas, não havendo comparação ideal com o experimento aqui realizado. Entretanto, foi demonstrado em trabalho anterior que a contribuição da FBN por bactérias endofíticas em plântulas de cana originadas de cariopses foi muito semelhante à observada em plântulas de cana micropropagadas (CANUTO et al., 2003), o que indica que é válida a utilização de plântulas originadas de cariopses na realização de ensaios visando o detalhamento da associação bactéria-planta. Os resultados aqui demonstrados deixam claro que as bactérias exibiram preferências por diferentes regiões radiculares das plântulas, enfatizando a diferença entre as espécies *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpe HCC103 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54.

Goi e colaboradores (1998) demonstraram que a inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plântulas de cana originadas de cariopses contribuiu significativamente para o aumento do sistema radicular, e apesar deste aspecto não ter sido diretamente quantificado, visivelmente houve maior desenvolvimento radicular nas plântulas inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup>, sendo possível a visualização de emissão de radículas secundárias, o que não foi detectado nas plântulas inoculadas com *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup>.

Em experimento de inoculação conjunta de ambas as espécies em cana micropropagada, Oliveira e colaboradores (2009) sugerem que *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 é mais competitiva que *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103, e atribuem isto ao fato de *H. rubrisubalbicans* HCC103 ser um potencial patógeno para algumas variedades susceptíveis de cana, e a genética relacionada a esta associação possivelmente negativa pode explicar a preferência da planta em associar-se com *H. seropedicae* HRC54.

## 5 CONCLUSÕES

- Mini-toletes de cana de açúcar RB867515 exibiram colonização diferencial quando inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup>, tendo sido observada maior concentração de células de HRC54<sup>GFP</sup> no apoplasto intercelular dos entrenós, enquanto que HCC103<sup>GFP</sup> associou-se mais frequentemente às paredes dos vasos xilemáticos. Houve uma aparente diferenciação na colonização primária dos mini-toletes de cana RB867515 por *H. seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> e *H. rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> com a penetração de HCC103<sup>GFP</sup> pelas escamas da gema, enquanto HRC54<sup>GFP</sup> aparentemente permaneceu apenas saprofiticamente nos tecidos degradados.
- Em condições de ascensão por fluxo transpiratório, *H. rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> tendeu a colonizar as paredes xilemáticas do colmo de cana, formando micro-colônias, enquanto que o *H. seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> obstrui os vasos xilemáticos, o que sinaliza uma possível baixa afinidade por este habitat.
- Cariópses de cana exibiram colonização diferencial tanto quanto à localização quanto ao volume de células visualizadas com *H. seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup>, foi mais abundantemente e ocupou o terço final das radículas, pelos radiculares e zonas de emissão de raízes secundárias, enquanto *H. rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> foi raramente detectada, ocupando apenas a epiderme superficial radicular.
- Em sistema hidropônico gnotobiótico, *Herbaspirillum seropedicae* HRC54<sup>GFP</sup> e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103<sup>GFP</sup> colonizam preferivelmente a zona de emergência de raízes secundárias, bem como a superfície epidérmica, formando micro-colônias em espaços intercelulares independentemente da variedade da planta hospedeira (IAC4440 ou Vermelho Virgínia).
- Não foram obtidos derivados de *Azospirillum amazonense* CBAmC capazes de expressar a proteína GFP mesmo após ser testados diferentes protocolos de transformação com os plasmídeos repórteres disponíveis.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos e aqui apresentados demonstram que *Herbaspirillum rubrisubalbicans* HCC103 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54, apesar de filogeneticamente próximas, são bactérias que interagem com a planta de cana de maneira muito particular. Apesar de ambas possuírem atividade de fixação biológica de nitrogênio e capacidade de promover o crescimento da planta, visivelmente ocupam de maneira diferencial os habitats disponíveis no interior do hospedeiro, o que implica em realizarem diferentes atividades, ocupando diferentes nichos ecológicos no sistema planta.

Investigações sobre a forma de interação entre planta e bactéria *in vivo* esbarram em entraves metodológicos severos, principalmente no que diz respeito à transformação da estirpe em estudo, o que possibilita seu rastreamento no sistema, e visualização direta da associação. Apesar dos esforços, não foi possível realizar um estudo com inoculação conjunta, mas trabalhos futuros devem continuar buscando alcançar as ferramentas necessárias para atingir a este objetivo. Outra dificuldade é a obtenção de cariopses de cana esterilizados, mas este problema se dilui na necessidade da investigação da associação da planta hospedeira com o microrganismo em estudo em condições minimamente semelhantes ao que ocorrem em campo, onde o inoculante será aplicado, simulando a real situação ocorrida.

Uma vez que já está estabelecido que a inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas realmente proporciona aumento na produção e economia na adubação nitrogenada em plantas da família Poaceae, aumenta a necessidade de compreensão minuciosa desta interação, que está revolucionando a agricultura moderna não apenas na produção de alimentos, mas também de combustíveis renováveis. Neste sentido, esforços devem ser feitos para a obtenção de estirpe de CBAmC e PAL5 expressando genes repórteres diferentes dos presentes das estirpes HRC54 e HCC103, bem como na transformação das mesmas com outros repórteres, visando analisar em detalhe a colonização conjunta das estirpes em plantas de cana.

Este trabalho abre caminho para novas investigações sobre o detalhamento da associação entre as bactérias diazotróficas endofíticas e a planta de cana-de-açúcar, demonstrando que muitas lacunas no conhecimento sobre a intimidade desta associação estão sendo preenchidas, e o paradoxo existente entre a presença do oxigênio molecular e a fixação biológica de nitrogênio em plantas não leguminosas poderá ser finalmente desvendado.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, F.; HUSAIN, F. M. & AHMAD, I. Rhizosphere and root colonization by bacterial inoculants and their monitoring methods: A critical area in PGPR research. IN: AHMAD, I., AHMAD, F. & PICHTEL, J. (Eds.) **Microbes and Microbial Technology**, Springer, p. 363, 2011.
- ALVARADO M. C.; ZSIGMOND, L. M.; KOVÁCS, I.; CSÉPLÖ, Á.; KONCZ C. & SZABADOS, L. M. Gene trapping with firefly luciferase in arabidopsis: Tagging of stress responsive genes. **Plant Physiology**, v. 134, p. 18–27, 2004.
- ASH, C.; PRIEST, F. G. & COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Journal of Microbiology Serology**, v. 64, p. 253-260, 1993.
- ASHBOLT, N. J. & INKERMANN, P. A. Acetic acid bacterial biota of the pink sugar cane mealybug, *Saccharococcus sacchari*, and its environs. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 707-712. 1990.
- AZEVEDO, M. S.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; HARTMANN, A. & BALDANI, J. I. Influence of soil and host plant crop on the genetic diversity of *Azospirillum amazonense* isolates. **Pedobiologia**, v. 49, p. 565-576, 2005.
- BALANDREAU, J.; VIALARD, V.; COURNOYER, B.; COENYE, T.; LAEVENS, S. & VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 982–985 2001.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L. & DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Vol. 36, No. 1, p. 86-93, Jan., 1986.
- BALDANI, J. I. & BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.
- BALDANI, J. I. **Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz**. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1984. 110p. (Tese de Mestrado)
- BALDANI, J. I.; AZEVEDO, M. S.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, R. R. S.; OLIVARES, F. L.; GOI, S. R. BALDANI, V. L. D. & DÖBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio em gramíneas: avanços e aplicações. IN: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Eds) **Iter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999, p. 621-666.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. & DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**. v.29, n.5/6, p.911-922, 1997.
- BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M. & DÖBEREINER, J.; Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v.29, n.8, p.869-881, 1983.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. & DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, v. 13, p.65-73, 1992.

BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Localization of *Herbaspirillum spp.* and *Burkholderia sp.* in rice root system. IN: **International Symposium on Microbial Ecology**, v. 7. p. 133. Brazilian Society for Microbiology, Santos, São paulo, 1995.

BALDANI, V. L. D.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Colonization of rice by the nitrogen-fixing bacteria *Herbaspirillum spp.* and *Azospirillum brasilense*. In: **New Horizons in Nitrogen Fixation**, (eds) PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W. E. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 705, 1993.

BALDOTTO, L. E. B.; OLIVARES, F. L. & BRESSAN-SMITH, R. Structural interaction between gfp-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and pineapple plantlets 'vitória'. **Brazilian Journal of Microbiology**, V. 42, p. 114-125, 2011.

BALSANELLI, E.; SERRATO, R. V.; BAURA, V. A.; SASSAKI, G.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. & MONTEIRO, R. A. *Herbaspirillum seropedicae rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, v.12, n.8, p. 2233-2244, 2010.

BARASSI, C. A.; SUELDO, R. J.; CREUS, C. M.; CARROZZI, L. E.; CASANOVAS, E. M. & PEREYRA, M. A. *Azospirillum spp.*, a dynamic soil bacterium favourable to vegetable crop production. **Dynamic Soil, Dynamic Plant**, v. 1, n. 2, p. 68-82, 2007.

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43 p. 103-121, 1997.

BASHAN, Y. *Azospirillum* plant growth-promoting strains are nonpathogenic on tomato, pepper, cotton and wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 168-174, 1998.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. & DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 521-577, 2004.

BELIGNI, M. V. & LAMATTINA, L. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 508-509, 2001.

BELLONE, C. H.; BELLONE, S. D. V. C.; PEDRAZA, R. O. & MONZÓN, M. A. Cell colonization and infection thread formation in sugarcane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 965-967, 1997.

BELLONE, S. C. & BELLONE, C. H. Presence of endophytic diazotrophs in sugarcane juice. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p.1065-1068, 2006.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 84, p.11-18, 2009.

BHATTACHARJEE, R. B.; SINGH, A. & MUKHOPADHYAY, S. N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, p. 199-209, 2008.

BLOEMBERG, G. V. Microscopic analysis of plant-bacterium interactions using auto

fluorescent proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 301–309, 2007.

BLOEMBERG, G. V.; WIJFJES, A. H. M.; LAMERS, G. E. M.; STUURMAN, N. & LUGTENBERG, B. J. J. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 13, p.1170-1176, 2000.

BODDEY, R. M.; XAVIER, D.; ALVES, B. J. R. & URQUIAGA, S. Brazilian agriculture: the transition to sustainability. **Journal of Crop Production**, v.9, p.593-621, 2003.

BODDEY, L. H. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*, isoladas de cana-de-açúcar (*Saccharum sp.*) cultivadas na Austrália e no Brasil. 2002. 109f. **Tese** (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

BODDEY, L. H.; DART, P.; GOI, S. R. & BALDANI, J. I. Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. IN: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 23., Reunião Brasileira sobre Micorrizas, 7., Simpósio Brasileiro de Microbiologia do Solo, 5., Reunião Brasileira de Biologia do solo, 2., 1998, Caxambu, **Resumos...** Caxambu: UFLA/SBCS/SBM, 1998, p. 809.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D. & DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v. 174, p. 195-209, 1995.

BODDEY, R.M. & DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**. Dordrecht, v. 108, p. 53-65, 1988.

BOHLOOL, B.B.; LADHA, J.K.; GARRITY, D.P. & GEORGE, T. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. **Plant Soil**. V.141, p.1–11. 1992.

BOTHE, H.; FERGUSON, S. J. & NEWTON, W. E. Eds. **The Biology of the Nitrogen Cycle**. Amsterdam, Elsevier, 2007.

BOTTA, A. L.; SANTACECILIA, A.; ERCOLE, C.; CACCHIO, P. & DEL GALLO, M. *In vitro* and *in vivo* inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. *New Biotechnology*, (in press) Jan, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. **Classificação de risco dos agentes biológicos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde. – 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G. & ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., in N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophyte species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

CABALLERO-MELLADO, J.; ONOFRE-LEMUS, J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; & MARTINEZ-AGUILA, L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 73, n. 16 p. 5308–5319, Aug. 2007.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L., eds. Fertilidade do

solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p.375-470, 2007.

CANTARELLA, H.; ROSSETO, R.; BARBOSA, W.; PENNA, M. J.; RESENDE, L. C. L. Perdas de nitrogênio por volatilização da amônia e resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada em sistema de colheita sem queima prévia. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.18, n.1, p.25, 1999.

CANUTO, E. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS, V. M. & BALDANI, J. I. Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. **Brazilian Journal of Microbiology**, V.34, p.62-64, 2003.

CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G. & HEMERLY, A. S. Sugarcane Genetic **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 31–41, 2011.

CAVALCANTE, V. & DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitro-gen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant Soil**, v. 108, p. 23– 31, 1988.

CEBOLLA, A.; RUIZ-BERRAQUERO, F. & PALOMARES A. J. Stable tagging of *Rhizobium meliloti* with the firefly luciferase gene for environmental monitoring. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2511–2519, 1993.

CHALFIE, M & KAIN, S. R. **Green Fluorescent Proteins: properties, applications, and protocols**. 2 Ed. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2006.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W. & PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.

CHENG H-P & WALKER G. C. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 5183–5191, 1998.

CHOI, K.; KUMAR, A. & SCHWEIZER, H. P. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, p. 391– 397, 2006.

COJHO, E. H.; REIS, V. M.; SCHENBERG, A. C. G. & DÖBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 106, p. 341-346, 1993.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C. & SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, p. 669-678, 2010.

COMPANT, S.; NOWAK, N. L.; COENYE, T.; CLEMENT, C. & BARKA, E. A. Diversity and occurrence of Burkholderia spp. in the natural environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.32, n.4, p. 607-626, 2008.

CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M. & LAMATTINA, L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. **Planta**, v. 218, p. 900-905, 2004.

CROES, C.; MOENS, S.; BASTELAERE, E. Van; VANDERLEYDEN, J. & MICHIELIS, K. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption-induced to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, Londres, v. 139, p. 2261-2269, 1993.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2375–2379, 2001.

DIXON, R. & KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature**. V.2, p. 621-631, 2004.

DÖBEREINER J. *Azotobacter* em solos ácidos. **Bol Inst Ecol Exp Agr** v.11, p. 1–36. 1953.

DÖBEREINER, J & RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Research Biology**, v.1, p. 261-272, 1958.

DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 19, p. 251-258, 1959.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 44, p. 310-313, 1992.

DONG, Z.; McCULLY, M. E. & CANNY, M. J. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Some anatomical and physiological data. **Annals of Botany**, London, v.80, p.147-158, 1997.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; McCULLY, M. E.; ROBOREDO, R. R.; CABADILLA, C. F. ; ORTEGA, E. & RODÉS, R. A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems: A New Role for the Apoplast. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1139-1147, 1994.

DUTTA, D. & GACHHUI, R. Novel nitrogen-fixing *Acetobacter nitrogenifigens* sp. nov., isolated from Kombucha tea. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, UK, v. 56, 1899–1903, aug. 2006.

EGENER, T.; HUREK, T. & REINHOLD-HUREK, B. Endophytic nitrogenase gene expression of *Azoarcus* sp. inside rice roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 9, 1999.

EGENER, T.; HUREK, T. & REINHOLD-HUREK, B. Use of green fluorescent protein to detect expression of nif genes in *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 11, p.71-75, 1998.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic Colonization and *in planta* Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n.11, p. 5285–5293, 2001

ERRAMPALLI, D. K.; LEUNG, M. B.; CASSIDY, M.; KOSTRZYNSKA, M.; BLEARS, H. L. & TREVOR, J. T. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 35, p. 187–199, 1999.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R. & CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied Environmental Microbiology**. v. 67, p. 2790–2798, 2001.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; MAVINGUI, P.; COURNOYER, B.; FONTAINE, F.; BALANDREAU, J. & CABALLERO-MELLADO, J. A N<sub>2</sub>-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in Mexico. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 48, p. 285–294, 2002.

FALK, E. C.; DOBEREINER, J.; JOHNSON, J. L. & KRIEG, N. R. Deoxyribonucleic acid homology of *Azospirillum amazonense* Magalhães et al. 1984 and emendation of the description of the Genus *Azospirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 35, p. 117-118, 1985.

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. **Current Word Fertilizer trends and Outlook**. FAO, Roma, 2010, 20p.

FERREIRA, A. C.; COZZOLINO, K.; CARVALHO, A. R. V. & DÖBEREINER J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria in oil palm trees. In **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics – The Role of**

- Biological Nitrogen Fixation, p.20. Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 1995.
- FIGURSKI, D. H. & HELINSKI, D. R. Replication of an origin containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. **PNAS**, v. 76, p. 1648, 1979.
- FORESMAN, P. S. Imagens para escola e educação. Disponível em <http://www.educolorir.com/paginas-para-colorir-cana-de-acucar-i16024.html>, capturado em 15 de dezembro de 2012.
- FRANCO, A. A. & DÖBEREINER, J. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v.20, n.1, p.68-74, 1994.
- FUENTEZ-RAMÍREZ, L. E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R. & CABALERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus* a endolacetic producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, v. 154, p. 145-150, 1993.
- GAGE, D. J.; BOBO, T. & LONG, S. R. Use of green fluorescent protein to visualize the early events of symbiosis between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*). **Journal of Bacteriology**, v. 178, p.7159-7166, 1996.
- GALLI, F.; CARVALHO, P. C. T.; TOKESHI H.; BALMER, F.; KIMATI, H.; CARDOSO, C. O.; SALGADO, C. L.; KRUGNER, T. L.; CARDOSO E. J. B. N.; & BERGAMIN, F. A. **Manual del fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**, vol. 2. São Paulo: Agronomica Ceres, 1980.
- GARRITY, G. M. (Ed) **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 2ªEd, v. 2, parte C. Springer, 2005.
- GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J. & DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. Nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 361-364, 1989.
- GILLIS, M.; TRÂN VAN, V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T. & FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 274-289, 1995.
- GOI, S. R.; SILVA, R. A. D. A.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Influência da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas na formação de pêlos radiculares de cana-de-açúcar. Resumo. IN: Fertbio 98 **Anais...** Interrelação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas: Consolidando um Paradigma. Caxambu, 1998, p. 432.
- GOODMAN, R. N.; KIRALY, A. & WOOD, K. E. **The biochemistry and physiology of plant disease**. Columbia: University of Missouri, 1986. 433p.
- GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; KWON, S. W.; WEON, H. Y. & LAKSHMINARASIMHAN, C. Effects of inoculation of *Burkholderia vietnamiensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. **Microbiology Ecology**, V.55, p. 2-37, 2008.
- GRACIOLLI, L. A.; FREITAS, J. R. & RUSCHEL, A. P. Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). **Revista de Microbiologia**, v. 14, p. 191-196, 1983.
- GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J. & POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P. M.; REINHOLD-

HUREK, B. & LADHA, J. K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, V. 83, p. 2634-2645, 2001.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE W. F. & KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p.895–914, 1997.

HARTMANN, A. & ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: OKON, Y. (Ed) ***Azospirillum/Plant Association***, CRC Press, Boca Raton, p. 15-39, 1994.

HARTMANN, A.; FU, H. & BURRIS, R. H. Regulation of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azospirillum spp.* **Journal of Bacteriology**, v. 165, p. 864–870, 1986.

HEIM, R.; PRASHER, D. C. & TSIEN, R. Y. Wavelength mutations and post translational autooxidation of green fluorescent protein. **PNAS USA**, v. 91, p. 12501–12504, 1994.

HOBERT, O. & LORIA, P. Uses of GFP in *Caenorhabditis elegans*. IN: CHALFIE, M. & KAIN, S. R. **Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols**. 2 Ed., p. 202 - 226, John Wiley & Sons, Inc., 433 p., 2006.

HOWARD, J. B. & REES, D. C. Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2965-2982, 1996.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. & VAN MONTAGU, M. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**. Washington, v.176, p.1913-1923, 1994.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, V. 25, N.2, p.1-88, Fev. 2012.

JAMES, E. K. & OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 17, p.77–119, 1998.

JAMES, E. K. Nitrogen Fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, p. 197-209, 2000.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonising vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, V. 48, p. 785–797, 1997.

JAMES, E. K.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I & DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, p. 757-766, 1994.

JAMES, E. K; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W. L.; REDDY, P. M.; IANNETTA, P. P. M.; OLIVARES, F. L. & LADHA, J. K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, p. 894-906, 2002.

JEFFERSON, R. A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS fusion system. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v.5, n.4, p.387-405, 1987.

JEFFERSON, R. A. The GUS reporter gene system. **Nature**, London, v.342, p.837-838, 1989.

JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L. E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPERANZA, A. M.; MARTINEZ-ROMERO, E. & CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing Acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3676-3683, 1997.

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. 452p.

- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. & HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 157-168, 2001.
- KLASSEN, G.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; YATES, M. G.; & RIGO, L. U. Sequencing and functional analysis of the *nifENXorf1orf2* gene cluster of *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 181, p. 165-170, 1999.
- LADHA, J. K.; BARRAQUIO, W. L.; WATANABE, I. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with Rice plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 29, p. 1301-1308, 1983.
- LANGE, A. & MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de *Orchidaceae* e de outras famílias vegetais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 529-533, 2002.
- LI, R. P.; MACRAE I. C. Specific associations of diazotrophic acetobacter with sugarcane. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, US, v.23, n.10, p.999-1002, 1991.
- LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using the <sup>15</sup>N aided nitrogen balance. **Soil Biology Biochemistry**, v. 19, p. 165-170, 1987.
- LOGESHWARAN, P.; THANGARAJU, M. & RAJASUNDARI, K. Hydroxamate Siderophores of Endophytic Bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* Isolated from Sugarcane Roots. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 3(4): 3564-3567, 2009.
- LOMBARDO, M. C.; GRAZIANO, M.; POLACCO, J. C. & LAMATTINA, L. Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. **Plant Signalling and Behavior**, v.1, p. 28-33, 2006.
- MADHAIYAN, M. POONGUZHALI, S., HARI, K., SARAVANAN, U. S., SA, T. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, CA, v.84, n .2, p. 143–154. fev. 2006.
- MAGALHÃES CRUZ, L.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F. O. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.
- MAGALHÃES, F. M. M. & DÖBEREINER, J. Occurrence of *Azospirillum amazonense* in some Amazonian (Brazil) ecosystems. **Research in Microbiology**, v. 15, p. 246-252, 1984.
- MAGALHÃES, F. M. M.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R. & DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 55, p. 417-430, 1983.
- MAHENTHIRALINGAM, E.; URBAN, T. A. & GOLDBERG, J. B. The multifarious multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nature Reviews**, v. 3, p.144–156, 2005.
- MAHESHKUMAR, K. S.; KRISHNARAJ, P.U.; ALAGAWADI, A. R. Mineral phosphate solubilizing activity of *Acetobacter diazotrophicus* a bacterium associated with sugarcane. **Current Science**, Bangalore, India, v.76, p. 874-875, 1999.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C. & OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas**. 2. Ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997, 319 p.
- MANIATIS, Thomas. **Molecular cloning: a laboratory manual**/J. Sambrook, EF Fritsch, T. Maniatis. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

MARCHAL, K. & VANDERLEYDEN, J. The “oxygen paradox” of dinitrogen-fixing bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.363–373, 2000.

MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; DÍAZ, R.; PEÑA-CABRIALES, J. J.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; DUNN, M. F. & CABALLERO-MELLADO, J. Multichromosomal genome structure and confirmation of diazotroph in novel plant-associated *Burkholderia* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4574-4579, 2008.

MARTÍNEZ-FLEITES, C.; ORTIZ-LOMBARDIA, M.; PONA, T.; TARBOURIECH, N.; TAYLOR, E. J.; ARRIETA, J. G. & DAVIES, G. J. Crystal structure of levansucrase from Gram-negative bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Journal of Biochemistry**, V. 390, p.19-27, 2005.

MARTÍNEZ-VIVEROS, O.; JORQUERA, M. A.; CROWLEY, D. E.; GAJARDO, G. & MORA, M. L. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, V.10, n.3, p. 293 – 319, 2010.

MATTOS, K. A.; PÁDUA, V. L. M.; ROMEIRO, A.; HALLACK, L. F.; NEVES, B. C.; ULISSES, T. M. U.; BARROS, C. F.; TODESCHINI, A. R.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Endophytic colonization of rice (*Oryza sativa* L.) by the diazotrophic bacterium *Burkholderia kururiiensis* and its ability to enhance plant growth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 80, n. 3, p. 477-493, 2008.

MATZ, M. M. V.; FRADKOV, A. F.; LABAS, Y. A.; SAVITSKY, A. P.; ZARAISKY, A. G.; MARKELOV, M. L. & LUKYANOV, S. A. Fluorescent proteins from non-bioluminescent *Anthozoa* species. **Nature Biotechnology**, v. 17, p. 969–973, 1999.

MENESES, C. H. S. G.; ROUWS, L. F. M.; ARAUJO, J. L. S.; VIDAL, M. S. & BALDANI, J. I. Exopolysaccharide production is required for biofilm formation and plant colonization by the nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.24, p.1448-58, 2011.

MERCANTE, F. M.; RUMJANEK, N. G.; FRANCO, A. A. Aplicação de genes marcadores em estudos de ecologia microbiana com ênfase no sistema GUS. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 3, p. 533-539, 2000.

MERRICK, M. J. & EDWARDS, R. A. Nitrogen control in bacteria. **Microbiology Reviews**, v.59, p.604-622, 1995.

MICHIELIS, K.; CROES, C.; VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. **Journal of General and Microbiology**, Washington, v. 137, p. 2241-2246, 1991.

MONTEIRO, R. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; MARIN, A. M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C.; SCHMIDT, M. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; PANKIEVICZ, V. C. S.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O. & SOUZA, E. M. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant Soil**, v. 356, p.175–196, 2012.

MONTEIRO, R. A.; SCHMIDT, M. A.; BAURA, V. A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; YATES, M. G.; RANDI, M. A. F.; PEDROSA, F. O. & SOUZA, E. M. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n. 4, p. 932-937, 2008.

MONZÓN DE ASCONEGUI, M. A. & SIROLI, N. S. Presencia de *Azospirillum amazonense* y micorrizas vesículo-arbusculares en rizósfera de gramíneas de Corrientes (Argentina). In: **CONGRESO ARGENTINO DE MICROBIOLOGÍA**, 4, Buenos Aires, 1985. (Resumen, A49).

MORAES, V. & TAUK-TORNISIELO, S. M. Efeito da inoculação de *Acetobacter*

*diazotrophicus* em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) variedade SP70-1143, a partir da cultura de meristemas. IN: XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1977. **Anais...** Rio de Janeiro, p. 215, 1997.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MOROZKINA, E. V. & ZVYAGILSKAYA, R. A. Nitrate Reductases: Structure, Functions, and Effect of Stress Factors. **Biochemistry**, v.72, n.10, p. 1151-1160, 2007.

MUTHUKUMARASAMY, R.; CLEENWERCK, I.; REVATHI, G.; VADIVELU, M.; JANSSENS, D.; HOSTE, B.; GUM, K.U.; PARK, K.D.; SON, C.Y.; SÁ, T.; CABALLERO-MELLADO, J. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.28, n.3, p. 277–286, apr. 2005.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Diazotrophic Associations in sugar cane cultivation in south India. **Tropical Agriculture**, Surrey, UK, v.76, p. 171–178, 1999.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum spp.* from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility Soils**, v. 2, p. 7-14, 2006.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G. & VADIVELU, M. Antagonistic potential of N<sub>2</sub>-fixing *Acetobacter diazotrophicus* against *Colletotrichum falcatum* Went., a causal organism of red-rot of sugarcane. **Current Science**, V. 78, N. 9, p. 1063-1065, 2000.

NJOLOMA, J. P.; OOTA, M.; SAEKI, Y. & AKAO, S. Detection of gfp expression from gfp-labelled bacteria spot inoculated onto sugarcane tissues. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 4 (12), p. 1372-1377, 2005.

NJOLOMA, J. P.; OOTA, M.; TAROURA, K.; SAEKI, Y. & AKAO, S. Colonization ability of *Herbaspirillum spp.* B501gfp1 in sugarcane, a non-host plant in the presence of indigenous diazotrophic endophytes. **African Journal of Biotechnology**, V. 5, n.10, p. 836-841, 2006.

NJOLOMA, J.; TANAKA, K.; SHIMIZU, T.; NISHIGUCHI, T.; ZAKRIA, M.; AKASHI, R.; OOTA, M. & AKAO, S. Infection and colonization of aseptically micropropagated sugarcane seedlings by nitrogen-fixing endophytic bacterium, *Herbaspirillum spp.* B501gfp1. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43, p. 137–143, 2006b.

NOGUEIRA, E. M.; OLIVARES, F. L.; JAPIASSU, J.; VARGAS, C.; VINAGRE, F.; BALDANI, J. I.; HERMELY, A. S. Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. **Plant Science**, v. 169, n. 5, p. 819-832, 2005.

NOGUEIRA, E.M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H.P.; VARGAS, C.; DE PÁDUA, V.L.M.; DA SILVA, F.R.; SANTOS, R.V.; BALDANI, J.I.; CAVALCANTI, P.G.F.; HERMELY, A.S. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**. v.24, n. 24, p.199-206. 2001.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C. Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field incubation. **Soil Biology and Biochemistry**. v.26, n.12, p.1591-1601, 1994.

OLIVARES, F. L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*saccharum sp.* Híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. 1997. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência

do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 1997.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* in roots, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, p. 197-200, 1996.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugarcane by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, V. 135, p. 723–737, 1997.

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

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, n. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, A.L.M; CANUTO, E.L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant Soil**. V.284, p.23-32, 2006.

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. **European Journal of Soil Biology**. V.45, p.106-113, 2009.

OLIVEIRA, D. M. T. & MACHADO, S. R (Eds) **Álbum Didático de Anatomia Vegetal**. Instituto de Biociências de Botucatu. Novembro, 2009. 65p.

PAULA, M. A.; REIS, V. M. & DOBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* and *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), Sugarcane (*Saccharum spp.*), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.11, n.2, p.111-115, may.1991.

PEREIRA, W. **Produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2011.

PERIN, L. **Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Seropédica, RJ, 2003. 63 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I. ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov. a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, UK, v.56, p.1931–1937, 2006a.

PERIN, L.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L. & REIS, V. M. **Infecção e colonização de raízes de arroz de sequeiro por bactérias diazotróficas endofíticas**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 2006b. 32p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 219).

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWS J. & HIRANO S. S. (eds) **Microbial ecology of leaves**. Springer Verlag, p. 179-197, 1991.

PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F. L.; PITARD, R. M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F. & DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 137, p. 61-65, 1991.

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: Embrapa Agrobiologia, dez. 2001. 8p.

POSTGATE, J. R. Prospects for the exploitation of biological nitrogen fixation. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, v. 290, p. 143-7, 1980.

QUISPEL, A. A. Search for signals in endophytic microorganisms. IN: VERMA, P. S. (Ed.) **Molecular signals in plant-microbe communications**. Boca Raton: CRC, 1992, p. 475-491.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K. & REIS V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol-acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.10, p.997-1004, out. 2005.

RAMOS, H. J. O.; RONCATO-MACCARI, L. D. B.; SOUZA, E. M.; SOARES-RAMOS, J. R. L.; HUNGRIA, M.; PEDROSA, F. O. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the *gfp* and *gusA* genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 243-252, 2002.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**, 6 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization and perspectives to study their function. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 29-54, 1998a.

REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 139-141, 1998b.

REIS JÚNIOR, F. B.; REIS, V. M. & TEIXEIRA, K. R. S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 431-438, 2006.

REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S. & REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 103-113, 2004.

REIS, V. M. & OLIVARES, F. L. **Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 2006. 34p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 216).

REIS, V. M. **Aspectos ecológicos e fisiológicos da bactéria fixadora de N<sub>2</sub> *Acetobacter diazotrophicus***. Itaguaí, RJ, 1991. 119f. Dissertação. (Mestrado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; DOS REIS, F. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. **Plant and Soil**, v. 206, p. 205-211, 1999.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR., V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 1-2, n. 12, p. 16-20, 1986.

RODRIGUES, E. P.; RODRIGUES, L. S.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S. & REIS, V. M. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N<sub>2</sub> fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Soil**, v. 302, p. 249-261, 2008.

ROMANTSCHUK, M. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces.

**Annual Review of Plant Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 225-243, 1992.

RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R. & SOUZA, E. M. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 39-47, 2003.

ROTHBALLER, M.; ECKERT, B.; SCHMID, M.; FEKETE, A.; SCHLOTTER, M.; LEHNER, A.; POLLMANN, S. & HARTMANN, A. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. **FEMS Microbiology Ecology**, V. 66, p. 85–95, 2008.

ROUWS, L. F. M.; HEMERLY, A. S.; BALDANI, J. I. **Transformação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Estirpe PAL 5 pela técnica de eletroporação**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 2006. 4p. (EMBRAPA-CNPAB. Comunicado Técnico, 84).

ROUWS, L. F. M.; MENESES, C. H. S. G.; GUEDES, H. V.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. & SCHWAB, S. Monitoring the colonization of sugarcane in Rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes. **Letters in Applied Microbiology**, V. 51, p. 325-330, 2010.

ROVIRA, A. D. Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of microorganisms in the rhizosphere. *Pesticide Science*, v. 4, n. 3, p. 361-366, 1973.

RUSSO, A.; FELICI, C.; TOFFANIN, A.; GÖTZ, M.; COLLADOS, C.; BAREA, J. M.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; SMALLA, K.; VANDERLEYDEN, J. & NUTI, M. Effect of *Azospirillum* inoculants on arbuscular mycorrhiza establishment in wheat and maize plants. **Biology and Fertility of Soils**, v. 41, p. 301-309, 2005.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T. & FRITSCH, E.F.. **Molecular cloning: a laboratory manual**. V.1. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANT'ANNA, F. H.; ANDRADE, D. S.; TRENTINI, D. B.; WEBER, S. S. & SCHRANK, I. S. Tools for genetic manipulation of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. **BMC Microbiology**, v.11:107, 2011.

SANTOS, C. C. R. DOS; PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Isolamento de *Gluconacetobacter spp.* em diferentes tipos de solos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n. 1, p. 85-92, jan. 2006.

SCHMID, M.; BALDANI, J. I. & HARTMANN, A. The Genus *Herbaspirillum*. **The Prokaryotes**, v. 5, p. 141–150, 2006.

SCHMIDT, M. A.; SOUZA, E. M.; BAURA, V.; WASSEM, R.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. & MONTEIRO, R.A. Evidence for the endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* (common bean) roots by the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, V. 44, n. 3, p.182-185, 2011.

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 agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.2, p.261-268, fev. 2012.

SCHWAB, S.; RAMOS, H. J.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; PEDROSA, F. O. & RIGO, L. U. Identification of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-regulated genes of *Herbaspirillum seropedicae* by random insertional mutagenesis. **Archives in Microbiology**, v. 187, 379-386, 2007.

SCHWAB, S. **Caracterização parcial dos elementos em CIS responsáveis pela**

**regulação da expressão do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae*.** 2002. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2002.

SCHWAB, S. **Identificação de genes de *Herbaspirillum seropedicae* regulados pela disponibilidade de amônio.** 2006. 143f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D.; PENIDO, E. G. C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 34, p. 451-456, 1984.

SERRATO, R. V.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; CRUZ, L. M.; PEDROSA, F. O.; CHOUDHURY, B.; CARLSON, R. W. & IACOMINI, M. Structural characterization of an acidic exoheteropolysaccharide produced by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 564-572, 2008.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N. & KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $15\text{N}_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 358-366, 2001.

SØRENSEN, J. & NYBROE, O. Reporter genes in bacterial inoculants can monitor life conditions and functions in soil. IN: Nannipieri, P. & Kornelia, S. (Eds.) **Nucleic Acids and Proteins in Soil**, p. 375–395. Springer-verlag: Berlin, Heidelberg, Germany. 2006.

SOUTO, S. M. & DÖBEREINER, J. Fixação de N atmosférico por Beijerinckia na rizosfera do capim elefante (*Pannisetum purpureum*) “elefante pinda”. IN: **Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, v. 11, p. 32-34, 1967.

SOUTO, S. M. **Variação estacional da fixação de  $\text{N}_2$  e desnitrificação em gramíneas forrageiras tropicais.** Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1982. 268p.

STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 487–506, 2000.

STEPHAN, M. P.; OLIVEIRA M.; TEIXEIRA, K. R. S.; MARTINEZ-DRETS, G. & DOBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, p. 67-72, 1991.

STUURMAN, N.; PACIOS BRAS, C.; SCHLAMMAN, H. R. M.; WIJFJES, A. H. M.; BLOEMBERG, G. V.; SPAINK, H. P. The use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 1163-1169, 2000.

TOLKER-NIELSEN, T.; BRINCH, U. C.; RAGAS, P. C.; ANDERSEN, J. B.; JACOBSEN, C. S. & MOLIN, S. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. **Journal of Bacteriology**, v.182, p.6482-6489, 2000.

TOMBOLINI, R.; VAN DE GAAG, D. J.; GERHARDSON, B.; JANSSON, J. K. Colonization pattern of biocontrol strains *Pseudomonas chlororaphis* MA32 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3674-3680, 1999.

URQUIAGA, S.; JANTALIA, C. P.; RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produtividade dos sistemas agrícolas na América Latina. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável.** Brasília, DF:Embrapa Informação Tecnológica; Seropédica: Embrapa Agrobiologia, cap. 7. p. 181-200, 2005.

- URQUIAGA, S.; ALVER, B. J. R.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. The role of biological nitrogen fixation in biofuel production from sugar cane. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION. **Proceedings**. Rio de Janeiro, EMBRAPA/CNPAB, 1995. P. 62-63.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugarcane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Proceedings**, v.56, p.105-114, 1992.
- URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BATISA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R. & BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data for the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant Soil**, V. 356, p. 5-21, 2011.
- UTERMARK, J. & KARLOVSKY, P. Quantification of green fluorescent protein fluorescence using real-time PCR thermal cycler. **Biotechniques**, v. 41, p. 150–154, 2006.
- VALDIVIA, R. H. & FALKOW, S. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. **Molecular Microbiology**, v. 22, p. 367–378, 1996.
- VALDIVIA, R. H.; CORMACK, B. P. & FALKOW, S. The uses of green fluorescent protein in prokaryotes. IN: CHALFIE, M. & KAIN, S. R. **Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols**. 2 Ed., p. 163 - 178, John Wiley & Sons, Inc., 433 p., 2006.
- VAN BASTELAERE, E.; LAMBRECHT, M.; VERMEIREN, H.; VAN DOMMLEN, A.; KEIJERS, V.; PROOST, P. & VANDERLEYDEN, J. Characterization of a sugar-binding protein from *Azospirillum brasilense* mediated chemotaxis to and uptake of sugars. **Molecular Microbiology**, v.32, p. 703-714, 1999.
- VARGAS, C.; DE PÁDUA, V. L. M.; NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H. P.; DA SILVA, F. R.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach. **Symbiosis**, v. 35, p. 159-180, 2003.
- VEGA, F. E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F. & BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Basic Microbiology**, v. 45, p.371–380, 2005.
- VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K. D.; JAPIASSU, J.; NOGUEIRA, E. M.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G. & HEMERLY, A. S. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N<sub>2</sub> fixing endophytic bacteria association. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 559-569, 2006.
- WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I. & DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.210, p.103-113, 1999.
- WILSON, K. J., SESSITSCH, A., PARRA, A., BECK, D. Biología molecular en el campo: genes marcadores para a visualización rápida y precisa de la competición entre cepas rizobianas y la colonización por bacterias de raíces de plantas. IN: PIJNENBORG, J.; RUÍZ, D., SILES, W., (eds). REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBIOLOGÍA, 18, 1996, Santa Cruz de la Sierra. **Anais...** Santa Cruz de La Sierra, 1996. 547p. p.147-162.
- WILSON, K.J. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, n.4/5, p.501-514, 1995.
- YOUNG, P. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: Stacey G,

Burris RH, Evans HJ (eds) **Biological nitrogen fixation**. Chapman and Hall Inc, New York, pp 43–86, 1992.

ZACHARIAS, D. A. Molecular biology and mutation of green fluorescent protein. IN: CHALFIE, M. & KAIN, S. **Green Fluorescent Protein: properties, applications, and protocols**. 2 ED. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, USA, p. 83-120, 2006.

ZAKRIA, M.; OHSAKO, A.; SAEKI, Y.; YAMAMOTO, A. & AKAO, S. Colonization and growth promotion characteristics of *Enterobacter sp.* and *Herbaspirillum sp.* on *Brassica oleracea*. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 54, n.4, p. 507-516, 2008b.

ZAKRIA, M.; UDONISHI, K.; SAEKI, Y.; YAMAMOTO, A. & AKAO, S. Infection, Multiplication and Evaluation of the Nitrogen-Fixing Ability of *Herbaspirillum sp.* Strain B501*gfp1* in Sugarcane Stems Inoculated by the Vacuum Infiltration Method. **Microbes and Environment**, v. 23, n. 2, p. 128-133, 2008a.