

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ABSCÍSICO EM
Gluconacetobacter diazotrophicus E CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO
DA INOCULAÇÃO POR TAL BACTÉRIA NA RESPOSTA DE
PLANTAS DE CANA DE AÇÚCAR AOS ESTRESSES
HÍDRICO E SALINO

JANICE MARIA RIBEIRO DIAS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2010

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ABSCÍSICO EM
Gluconacetobacter diazotrophicus E CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO
DA INOCULAÇÃO POR TAL BACTERIA NA RESPOSTA DE
PLANTAS DE CANA DE AÇÚCAR AOS ESTRESSES
HÍDRICO E SALINO

JANICE MARIA RIBEIRO DIAS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO - 2010

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO ABSCÍSICO EM
Gluconacetobacter diazotrophicus E CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO
DA INOCULAÇÃO POR TAL BACTERIA NA RESPOSTA DE
PLANTAS DE CANA DE AÇÚCAR AOS ESTRESSES
HÍDRICO E SALINO

JANICE MARIA RIBEIRO DIAS

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutora em Genética e Melhoramento
de Plantas.”

Aprovada em 09 de fevereiro de 2010.

Comissão Examinadora:

José Ivo Baldani (D.Sc. em Ciências do Solo) – Embrapa Agrobiologia

Ângela Pierre Vitória (D.Sc. em Biologia Vegetal) – UENF

Fábio Lopes Olivares (D.Sc. em Agronomia) – UENF

Gonçalo Apolinário de Souza Filho (D.Sc. em Biociências e Biotecnologia)
(Orientador)

"Nada te perturbe, nada te espante, tudo passa, só Deus não muda. Apaciência tudo alcança. Quem a Deus tem, nada lhe falta. Só Deus basta."

Santa Teresa d'Ávila

**Dedico esta tese aos meus pais
e irmão, que compartilharam
dos meus ideais.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a **DEUS**, pelo dom da vida, pelo seu infinito amor, pela oportunidade que mais uma vez me concedeu. Minha eterna gratidão por me acompanhar em todos esses anos, pois sei que só pelo seu amor foi possível chegar até aqui.

A minha querida mãezinha **Maria**, por toda intercessão e por iluminar meus caminhos obscuros, demonstrando, dessa forma, toda sua dedicação e amor.

Aos meus pais, **Dercílio Silva Dias** e **Cléa Maria Ribeiro Athayde**, por todo carinho que dedicaram, por me fazerem acreditar em meus sonhos, por estarem comigo em todos os desafios. Obrigada por compreenderem minha ausência e meu estresse. Enfim, obrigada por toda a dedicação, confiança e oração. Amo vocês!!!

Ao meu irmão e “coleguinha de república”, **Geison Ribeiro Dias**, pelas implicâncias e pelos maravilhosos momentos de descontração. Nossas risadas serviram como uma terapia nos momentos de estresse. *Te admiro e te amo!!!*

Ao meu noivo, **Pedro Miguel de Mello Correia**, pelo amor, companheirismo, mas, principalmente, pela paciência. Apesar de todo meu estresse... você tem tornado minha vida muito mais agradável. Amo-o muito!!!

Ao professor, **Gonçalo Apolinário de Souza Filho**, pela orientação, dedicação, amizade e convívio ao longo desses anos. Meu agradecimento sincero, pois, com sabedoria, confiança, e paciência, soube transmitir seu conhecimento. A você, manifesto meu respeito, admiração e estima.

Às professoras, **Patrícia Noemi Piccoli** e **Ana Carmen Cohen**, por toda a dedicação e colaboração nos trabalhos de quantificação de hormônios. Muito obrigada pela solicitude e ensinamento.

Aos professores colaboradores, **Angela Pierre Vitória**, **Fábio Lopes Olivares** e **Ricardo Enrique Bressan-Smith**, pela ajuda e pelos equipamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos colegas de equipe, **Beatriz Ferreira**, **Adriane Nunes**, **Roberta Barbosa**, **Juliana Ferreira**, **Fernanda Barbosa**, **Mariana Barduco**, **Leandro de Mattos**, **Wellington Campos**, **Paulo Motta**, **Güinevere Fernandes**, **Ana Lídia Rangel**, **Mariana Lugon**, **Patrícia Rangel**, **Valéria Marques**, **Alan Trindade**, **Marcos Vinicius Viana**, **Aline Intorne** e **Verônica Aguiar**, em especial, a **Roberta**, **Patrícia** e **Wellington**, por toda a ajuda na realização deste trabalho.

Às minhas fiéis amigas do 'Clube da Lulu' **Inês Alves da Costa**, **Hérika Chagas Madureira**, **Denise Spellet Klein** e **Beatriz dos Santos Ferreira**, por todos os momentos de risada e descontração. Obrigada pelo apoio, incentivo, companheirismo... pelo ombro amigo já calejado... Enfim, foi um prazer compartilhar dias, tardes e noites de conversas, bebidas e guloseimas, com vocês!!!

À **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, em especial ao coordenador do Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar, **Josil de Barros Carneiro Júnior** e ao técnico **Luiz Francisco P. Manhães**, pela colaboração na obtenção da variedade de cana-de-açúcar.

Aos professores e técnicos dos Laboratórios de Biotecnologia e de Melhoramento Genético Vegetal.

À **UENF/FAPERJ**, pelo apoio financeiro.

À **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro**.

SUMÁRIO

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A cana-de-açúcar	3
2.1.1. Importância econômica da cana-de-açúcar	5
2.1.2. O Projeto Sucest	6
2.1.3. <i>Northern</i> eletrônico: um método automático para determinar o padrão de expressão em banco de dados	7
2.2. Fotografia fluorescente eletrônica (EFP Browser): uma ferramenta para analisar dados biológicos em larga escala	8
2.3. Estresse biológico	9
2.3.1. Estresses abióticos	9
2.3.1.1. Estresse salino	10
2.3.1.2. Estresse hídrico	13
2.4. O estresse oxidativo como resposta secundária ao sal e à seca	14
2.5. A fotossíntese e a resposta da maquinaria fotossintética a estresses ambientais	16
2.5.1. A fluorescência da clorofila a como monitoramento do desempenho do aparelho fotossintético	19
2.6. Sinalização celular em resposta a estresses	22

2.7. Imunidade inata em plantas	26
2.8. Bactérias endofíticas diazotróficas	27
2.8.1. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	29
2.9. Papel dos estômatos na resposta imune inata	30
2.10. Papel dos hormônios na defesa vegetal	32
2.11. COI1, um membro da família F-box, está envolvido na resposta a hormônios e na defesa vegetal	34
2.12. Produção de hormônios por microorganismos	35
3. TRABALHOS	37
3.1. EFEITO DA COLONIZAÇÃO POR <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> SOBRE A RESPOSTA FOTOSSINTÉTICA E ENZIMÁTICA DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS AOS ESTRESSES SALINO E HÍDRICO	37
3.1.1. RESUMO	37
3.1.2. ABSTRACT	38
3.1.3. INTRODUÇÃO	38
3.1.4. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1.4.1. Material biológico	39
3.1.4.1.1. Material vegetal e condições de cultivo	39
3.1.4.1.2. Microorganismo, manutenção e preparo do inóculo	40
3.1.4.2. Inoculação de plantas de cana-de-açúcar	40
3.1.4.3. Indução aos estresses salino e hídrico	41
3.1.4.4. Análise da eficiência fotoquímica do PSII	41
3.1.4.5. Extração de pigmentos fotossintéticos	42
3.1.4.6. Determinação dos níveis de peroxidação de lipídeos	42
3.1.4.7. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes	43
3.1.4.7.1. Extração de proteínas	43
3.1.4.7.2. Estimativa da concentração protéica pelo método de Bradford	43
3.1.4.7.3. Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)	44
3.1.4.7.4. Determinação da atividade da enzima guaiacol peroxidase (GPX)	44
3.1.4.7.5. Determinação da atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX)	45
3.1.5. RESULTADOS	45

3.1.5.1. Efeito dos estresses salino e hídrico sobre a eficiência fotoquímica e teores de pigmentos fotossintéticos em plantas colonizadas por <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	45
3.1.5.1.1. Rendimento quântico do PSII (Fv/Fm)	46
3.1.5.1.2. Quenching fotoquímico (qP)	46
3.1.5.1.3. Quenching não-fotoquímico (qN)	47
3.1.5.1.4. Pigmentos fotossintéticos	51
3.1.5.2. Alterações nos níveis de peroxidação lipídica em plantas de cana-de-açúcar colonizadas por <i>G. diazotrophicus</i> e submetidas à salinidade e desidratação	59
3.1.5.3. Resposta antioxidante em plantas de cana-de-açúcar inoculadas e expostas aos estresses salino e hídrico	61
3.1.6. DISCUSSÃO	63
3.1.7. CONCLUSÕES	69
3.1.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
3.2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES SnRK E COI1, ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO ESTOMÁTICA EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR COLONIZADAS POR <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	75
3.2.1. RESUMO	75
3.2.2. ABSTRACT	76
3.2.3. INTRODUÇÃO	76
3.2.4. MATERIAL E MÉTODOS	78
3.2.4.1. Identificação, alinhamento e análise filogenética das sequências gênicas CDPK-SnRK e COI1	78
3.2.4.2. Northern eletrônico dos genes SnRK e COI1 via banco SUCEST	78
3.2.4.3. Fotografia fluorescente eletrônica dos genes SnRK2.4 e COI1	80
3.2.5. RESULTADOS	80
3.2.5.1. Identificação de sequências gênicas de proteínas quinase da superfamília CDPK-SnRK de cana-de-açúcar e filogenia das proteínas identificadas	80
3.2.5.2. Genes de quinases da classe SnRK2 são regulados na biblioteca de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>G. diazotrophicus</i> (AD1)	84

3.2.5.3. Visualização dos níveis de expressão relativa do gene AtSnRK2.4/ASK1 (SAPK6) de <i>Arabidopsis thaliana</i> , em diferentes tecidos e órgãos vegetais	89
3.2.5.4. COI1 é induzido por plantas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (AD1)	91
3.2.5.5. Visualização dos níveis de expressão relativa do gene COI1 de <i>Arabidopsis thaliana</i> , em diferentes tecidos e órgãos vegetais	96
3.2.6. DISCUSSÃO	98
3.2.7. CONCLUSÕES	103
3.2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
3.3. PRODUÇÃO DE ÁCIDO ABCSÍSICO PELA BACTÉRIA ENDOFÍTICA <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> PAL5 E QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS	107
3.3.1. RESUMO	107
3.3.2. ABSTRACT	108
3.3.3. INTRODUÇÃO	108
3.3.4. MATERIAL E MÉTODOS	110
3.3.4.1. Material biológico	110
3.3.4.2. Microorganismo e condições da cultura	110
3.3.4.3. Colonização de plantas de cana-de-açúcar por <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	111
3.3.4.4. Teste de germinação em sementes de <i>Arabidopsis thaliana</i>	111
3.3.4.5. Identificação e quantificação de ABA endógeno em <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	111
3.3.4.6. Identificação e quantificação de ABA endógeno em plantas de cana-de-açúcar inoculadas	112
3.3.5. RESULTADOS	113
3.3.5.1. Ácido abscísico é produzido pela bactéria endofítica <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	113
3.3.5.2. O ABA bacteriano inibe a germinação de sementes de <i>Arabidopsis</i>	115
3.3.5.3. Níveis endógenos de ABA são aumentados em plantas de cana-de-açúcar colonizadas por <i>G. diazotrophicus</i>	116
3.3.5.4. Genes responsivos a ABA apresentam expressão diferencial na presença da bactéria	117

3.3.6. DISCUSSÃO	118
3.3.7. CONCLUSÕES	121
3.3.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
4. RESUMOS E CONCLUSÕES	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 O Fluxo de elétrons durante a fotossíntese na membrana tilacoidal	18
Figura 2 Cinética da emissão de fluorescência	20
Figura 3 Representação da via de sinalização em resposta a uma condição de estresse	23
Figura 4 Representação esquemática da estrutura dos domínios de proteínas quinase pertencentes à família CDPK-SnRK	25
Figura 5 Diferentes tipos de endófitos e o processo de colonização bacteriana	28
Figura 6 Células bacterianas presentes na superfície foliar	31
Figura 7 Esquema ilustrativo indicando receptores de ABA atuando em diferentes locais celulares	33
Figura 8 Esquema ilustrativo da resposta a ácido jasmônico	35
Figura 9 Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o rendimento quântico	48
Figura 10 Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o <i>quenching</i> fotoquímico	49
Figura 11 Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o <i>quenching</i> não fotoquímico	50
Figura 12 Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o teor de clorofila total	52
Figura 13 Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o teor de clorofila a ..	53

Figura 14 Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o teor de clorofila <i>b</i> ..	54
Figura 15 Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o teor de carotenóides	56
Figura 16 Efeito dos estresses salino e hídrico sobre a razão clorofila <i>a/b</i> .	57
Figura 17 Efeito dos estresses salino e hídrico sobre a razão carotenoide/clorofila	58
Figura 18 Alterações nos níveis de peroxidação lipídica de folhas e raízes	60
Figura 19 Efeito dos estresses salino e hídrico sobre a atividade de enzimas antioxidantes	62
Figura 20 Análise filogenética da superfamília CDPK-SnRK de cana-de-açúcar	83
Figura 21 <i>Northern</i> eletrônico dos <i>clusters</i> que codifica proteínas da família SnRK2, em uma biblioteca de cDNA de plantas inoculadas com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	84
Figura 22 Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos dos <i>clusters</i> correspondentes à subclasse SnRK2	85
Figura 23 <i>Northern</i> eletrônico, demonstrando a expressão relativa do cluster SCCST1006B11.g, que corresponde à proteína SAPK6, nas diferentes bibliotecas do SUCEST	86
Figura 24 <i>Northern</i> eletrônico, demonstrando a expressão relativa dos <i>clusters</i> SCQGHR1011E10.g, SCCCLB1003E11.g, SCRFLR1034G06.g, SCCCLR1068F10.g, SCJFLR1074F04.g e SCEZRZ1013F09.g, que corresponde às proteínas SAPKs (subclasse SnRK2)	87
Figura 25 Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos da proteína quinase SAPK6 (SnRK2) de 11 espécies	88
Figura 26 Árvore filogenética da proteína quinase SAPK6 (SnRK2) de 11 espécies	89
Figura 27 Fotografia eletrônica fluorescente representando os níveis de expressão relativa do gene SnRK2.4/ASK1 (SAPK6), em diferentes tecidos e órgãos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	90
Figura 28 Fotografia eletrônica fluorescente do padrão de expressão tecido específico do gene SnRK2.4/ASK1 (SAPK6), em estômatos e células do mesofilo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	91
Figura 29 <i>Northern</i> eletrônico dos <i>clusters</i> que codifica proteínas da COI1,	

em uma biblioteca de cDNA de plantas inoculadas com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	92
Figura 30 Northern eletrônico, demonstrando a expressão relativa do cluster SCQSRT1034B12.g, que corresponde à proteína COI1, nas diferentes bibliotecas do SUCEST	93
Figura 31 Northern eletrônico, demonstrando a expressão relativa dos clusters, SCCCLR1C01E03.g, SCEZLB1009F12.g, SCBFLR1039D08.g, SCQSRT1034B12.g, SCRFLR1055F12.g e SCJFAD1010G04.g, correspondentes à proteína COI1, nas diferentes bibliotecas do SUCEST .	94
Figura 32 Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos da proteína COI1 de 13 espécies	95
Figura 33 Árvore filogenética da proteína COI1 de 13 espécies	96
Figura 34 Fotografia eletrônica fluorescente representando os níveis de expressão relativa do gene COI1, em diferentes tecidos e órgãos de <i>Arabidopsis thaliana</i>	97
Figura 35 Fotografia eletrônica fluorescente do padrão de expressão tecido específico do gene COI1, em estômatos e células do mesofilo de <i>Arabidopsis thaliana</i>	98
Figura 36 Espectro de massas de ABA proveniente da cultura de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 (acima) comparado ao espectro de ABA comercial (abaixo)	114
Figura 37 Germinação de sementes de <i>Arabidopsis thaliana</i> (Columbia e <i>abi1</i>) em placas de petri contendo meio MS líquido, acrescido de ABA 2 µM e do exudado bacteriano filtrado	116
Figura 38 Northern <i>in silico</i> de ESTs, correspondendo aos genes GPA1 (SCRFLR2034A04.g), PLC1 (SCSBHR1052C05.g), PP2C (SCEPRZ1011A11.g) e CDPK1 (SCEQRT1027E02.g) de cana-de-açúcar, usando o banco de dados do SUCEST	118

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Produção de açúcar (em toneladas) na Região Sudeste	5
Tabela 2 Produção de etanol (em litros) na Região Sudeste	5
Tabela 3 Complexidade da resposta ao estresse salino	12
Tabela 4 Bibliotecas de cDNA de cana-de-açúcar do banco SUCEST	79
Tabela 5 Transcritos identificados em cana-de-açúcar que codificam proteínas quinase, indicando sua possível similaridade com outra espécie	82
Tabela 6 Teor de ABA, em ng mL^{-1} , de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 crescida em meio quimicamente definido (LGIP), contendo sacarose e NaCl	115
Tabela 7 Níveis de ABA endógeno, em ng mL^{-1} , em plantas de cana-de-açúcar	117

RESUMO

DIAS, Janice Maria Ribeiro; DSc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Fevereiro de 2010. Estudo da produção de ácido abscísico em *Gluconacetobacter diazotrophicus* e caracterização do efeito da inoculação por tal bactéria na resposta de plantas de cana de açúcar aos estresses hídrico e salino. Orientador: D.Sc. Gonçalo Apolinário de Souza Filho. Conselheiros: D.Sc. Ricardo Enrique Bressan-Smith e D.Sc. Fábio Lopes Olivares.

Em culturas, como a cana-de-açúcar, a desidratação e o excesso de sais no solo podem causar alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares, resultando em uma redução do crescimento, da qualidade e, conseqüentemente, em uma queda na produção. Recentemente, foi demonstrado que plantas colonizadas com bactérias endofíticas induzem alterações na resposta a estresses abióticos. Entre as bactérias endofíticas de cana-de-açúcar, está a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que é conhecida por fixar nitrogênio atmosférico e produzir hormônios, o que poderia interferir na resposta fisiológica. O objetivo, deste trabalho, foi estudar o efeito da inoculação de *G. diazotrophicus* na resposta de plantas de cana-de-açúcar aos estresses salino e hídrico, por meio de análises fisiológicas (capítulo I); expressão de genes de proteínas envolvidas na sinalização de resposta a hormônios e interação planta-bactéria (capítulo II); quantificação do hormônio ácido abscísico em cultura de *G. diazotrophicus* e em plantas de cana-de-açúcar colonizadas pela bactéria (capítulo III). Os resultados obtidos demonstraram que as plantas de cana-de-açúcar inoculadas

apresentaram diferentes respostas aos estresses salino e hídrico. Verificou-se que a colonização pelo endófito aumentou a susceptibilidade ao sal e à seca, mas principalmente à seca. Duas proteínas de resposta a hormônio e de defesa apresentaram-se reguladas durante a colonização pela bactéria. Adicionalmente, foi possível identificar e quantificar a produção do hormônio ácido abscísico em cultura de *G. diazotrophicus*. Tal observação indica que a presença da bactéria interfere no mecanismo de resposta ao estresse. Embora a pesquisa na área de fixação biológica do nitrogênio, durante a interação entre planta e bactéria, esteja avançada, pouco é sabido a respeito do efeito da colonização por simbiontes endofíticos, em plantas submetidas a estresses abióticos. Neste contexto, os resultados obtidos, neste trabalho, poderão contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos dessa associação, particularmente em resposta a estresses abióticos.

ABSTRACT

DIAS, Janice Maria Ribeiro; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; 2010, February. Study of production of abscisic acid in *Gluconacetobacter diazotrophicus* and characterization of the effect of inoculation by bacteria in response of sugarcane plants to drought and salt stress. Advisor: D.Sc. Gonçalo Apolinário de Souza Filho. Co-advisors: D.Sc. Ricardo Enrique Bressan-Smith and D.Sc. Fábio Lopes Olivares.

In crops, such as sugarcane, dehydration and excessive salts in the soil can cause biochemical, physiological and molecular alterations resulting in a reduction in growth, quality and consequently a decrease in production. Recently it has been showed that plants colonized by endophytic bacteria changes the response to abiotic stresses. Among the sugarcane endophytic bacteria, there are the *Gluconacetobacter diazotrophicus*, which is recognized by atmospheric nitrogen fixation and produce hormones, which could interfere with the physiological response. The objective of this work was to study the effect of inoculation with *G. diazotrophicus* in response to sugarcane plant to salt and water stress through physiological analysis (Chapter I) gene expression of proteins involved in signaling in response to hormones and plant-bacteria interaction (Chapter II) and quantification of the hormone abscisic acid in culture of *G. diazotrophicus* and colonized plants (Chapter III). The results showed that control and inoculated plants showed different responses to salt and water stress. It was found that colonization by the endophyte increased susceptibility to salt and drought, but

mainly to drought. Two proteins in response to hormone and defense showed up regulated during the colonization by bacteria. Additionally, it was possible to identify and quantify the production of the hormone abscisic acid in culture of *G. diazotrophicus*. This observation indicates that the presence of bacteria interfere in the mechanism of stress response. Although research in the area of biological nitrogen fixation, during the interaction between plant and bacteria is well advanced, little is known about the effect of colonization by endophytic symbionts for plants exposed to abiotic stresses. In this context, the results obtained in this study may contribute to a better understanding of the mechanisms of this association, particularly in response to abiotic stresses.

1. INTRODUÇÃO

A Região Norte Fluminense tem como uma de suas principais atividades econômicas a indústria agroaçucareira, ocupando aproximadamente 15% da área agricultável. A produção canavieira no Estado do Rio de Janeiro teve seu crescimento acentuado a partir de 1930, tornando a região uma das grandes produtoras nacionais. Na década de 70, os lançamentos do Proálcool e do Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR), instalados em Campos dos Goytacazes elevaram ainda mais a produção, contribuindo, dessa forma, para o desenvolvimento da Região Norte Fluminense.

Devido ao fato de que parte da cultura canavieira, na Região Norte Fluminense, está localizada em locais de solos salino-sódicos (*solonchak* sódico), verifica-se uma deficiência da cultura, acarretando em expressiva redução na produtividade. Adicionalmente, a região apresenta um déficit hídrico para o cultivo da cana-de-açúcar de 400 a 600 mm anuais (Valicheski, 2006).

A seca e a salinidade do solo estão entre os principais estresses ambientais para a agricultura. Devido a esses estresses, as lavouras têm sua produtividade reduzida ou mesmo inviabilizada.

Todas essas condições adversas impostas às plantas podem induzir alterações estruturais, fisiológicas, bioquímicas e moleculares. Em conjunto, todas essas respostas estão envolvidas no mecanismo de adaptação ao agente estressante.

De acordo com Mayak e colaboradores (2004), bactérias endofíticas podem alterar a resposta a esses estresses abióticos. Entre as bactérias endofíticas caracterizadas, objeto de estudo de muitos pesquisadores, está a *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Inicialmente, essas bactérias foram caracterizadas como endofíticas fixadoras de nitrogênio. Porém, seu potencial agrobiotecnológico se ampliou quando foi demonstrada sua capacidade de excretar 50% do nitrogênio fixado, bem como sua biossíntese de hormônios, que poderiam, juntamente com o nitrogênio, exercer efeitos diretos sobre a fisiologia da planta, influenciando no crescimento vegetal.

Embora a pesquisa na área de fixação biológica do nitrogênio, durante a interação entre planta e bactéria, esteja avançada, pouco é sabido a respeito do efeito da colonização por endofíticos diazotróficos, em plantas submetidas a estresses abióticos. Portanto, levando-se em consideração que *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria endofítica de cana-de-açúcar, fixadora de nitrogênio e produtora de hormônios análogos aos vegetais, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito dos estresses salino e hídrico sobre plantas de cana-de-açúcar inoculadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cana-de-açúcar

A região de origem presumível da cana-de-açúcar é o norte da Índia, de onde se supõe que tenha sido levada para a China e o Oriente Próximo. Os árabes a transportaram para o norte da África e o sul da Europa, e os chineses a introduziram em Java e nas Filipinas. Cristóvão Colombo trouxe a cana para a América, em sua segunda viagem, começando o seu plantio, no ano de 1494, em São Domingos. Daí foi levada para Cuba, Antilhas e o continente, iniciando-se o seu cultivo nos Estados Unidos da América, em 1751, no estado de Louisiana (Leme Júnior e Borges, 1965). No Brasil, a cultura teve início, em 1532, na capitania de São Vicente, trazida por Martim Afonso de Souza, com canas oriundas da Ilha da Madeira (Fernandes, 1984).

Acredita-se que o primeiro engenho do Brasil tenha sido o que Jerônimo de Albuquerque estabeleceu em Olinda, em 1540, com a denominação de Nossa Senhora da Ajuda. Por volta de 1590, havia seis engenhos na capitania de São Vicente, 36 na da Bahia e 66 na de Pernambuco (Leme Júnior e Borges, 1965).

O melhoramento da cana-de-açúcar, no Brasil, presume-se que tenha se iniciado por volta do século XIX (Matsuoka *et al.*, 1999). Segundo alguns autores, os primeiros relatos de que sementes (não os colmos) de cana-de-açúcar poderiam originar descendentes, surgiram em Barbados, em 1858 (Deerr, 1921; Stevenson, 1965). Assume-se que foi em 1885, em Java, que o melhoramento da

cana-de-açúcar iniciou-se efetivamente, a partir da germinação de sementes de *Saccharum spontaneum*. Cruzaram-se a variedade Glagah com Loethers e o seu recíproco, obtendo sementes férteis somente da Glagah. Dessa forma, foi demonstrada a viabilidade do melhoramento genético da cana-de-açúcar, por intermédio de cruzamentos controlados.

O Brasil, nessa época, e durante muito tempo, importava variedades de cana-de-açúcar de outros países. Não havia quarentenário e nenhum controle fitossanitário dessas importações. Devido a essas importações não controladas, não demorou que ocorressem introduções de germoplasmas contaminados por pragas e doenças, ocasionando, dessa forma, uma queda na produção.

Essa baixa produtividade fez com que os pesquisadores voltassem sua atenção para a lavoura. Assim sendo, em 1910, o governo federal criou as duas primeiras estações experimentais de cana-de-açúcar do Brasil, a de Escada, em Pernambuco, e a de Campos dos Goytacazes, no Rio de Janeiro.

Em 1972, foi criado o Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR), o qual, após sua extinção em 1990, passou a ser conduzido pelas Universidades Federais que compõem a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA). A RIDESA é composta por sete Universidades Federais. Essas instituições são responsáveis pelas cultivares de cana-de-açúcar com a sigla RB (República do Brasil). Atualmente, existem no Brasil quatro principais programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar: RIDESA (RB), Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e, o mais recente deles, CANAVIALIS (CV).

2.1.1. Importância econômica da cana-de-açúcar

A agroindústria açucareira é a mais antiga atividade agroindustrial do Brasil e está relacionada a alguns dos principais eventos históricos do país. O agronegócio sucroalcooleiro é responsável por 1,76% do PIB nacional, com a geração de 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos, além de congregar mais de 72.000 agricultores e 373 usinas. Atualmente, o Brasil e a Índia são os maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar. O Brasil é isoladamente o maior produtor

de açúcar, e o maior exportador mundial, obtendo 32 milhões de toneladas ano⁻¹ (Tabela 1) das quais 62% são exportadas (www.jornalcana.com.br).

Tabela 1 - Produção de açúcar (em toneladas) na Região Sudeste

ESTADOS/SAFRA	05/06	06/07	07/08	08/09*
MINAS GERAIS	1.741.649	1.909.516	2.117.696	2.207.621
ESPIRITO SANTO	48.260	48.949	86.823	85.324
RIO DE JANEIRO	286.203	262.104	243.472	241.005
SÃO PAULO	16.833.595	19.503.032	19.107.894	19.662.436
REGIÃO CENTRO-SUL	22.084.810	25.784.133	26.171.148	26.749.819
REGIÃO NORTE-NORDESTE	3.820.913	4.098.300	4.825.564	4.297.486
BRASIL	25.905.723	29.882.433	30.996.712	31.047.305

*Posição em 16/05/09.

Fonte: União da Indústria e Cana-de-açúcar/UNICA e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/MAPA.

A produção brasileira de etanol também é a maior do mundo, com 27 bilhões de litros de álcool ano⁻¹ (Tabela 2), devido à utilização em larga escala do etanol como combustível renovável e alternativo ao petróleo.

Tabela 2 - Produção de etanol (em litros) na Região Sudeste

ESTADOS/SAFRA	05/06	06/07	07/08	08/09*
MINAS GERAIS	958.902	1.291.445	1.776.760	2.167.616
ESPIRITO SANTO	234.960	173.192	252.270	274.592
RIO DE JANEIRO	135.536	87.455	120.274	127.795
SÃO PAULO	9.985.276	10.910.013	13.345.207	16.722.478
REGIÃO CENTRO-SUL	14.352.542	16.006.345	20.345.559	25.101.963
REGIÃO NORTE-NORDESTE	1.594.452	1.712.864	2.193.358	2.404.133
BRASIL	15.946.994	17.719.209	22.538.917	27.506.096

*Posição em 16/05/09.

Fonte: União da Indústria e Cana-de-açúcar/UNICA e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/MAPA.

A Região Sudeste é a mais produtiva, sendo o Estado de São Paulo o principal produtor de açúcar e álcool. O Estado do Rio de Janeiro está em 11º lugar no ranking brasileiro na produção de álcool e, em 9º lugar, na produção de açúcar.

Com a crescente preocupação da sociedade mundial sobre o uso dos combustíveis fósseis, vários países estão buscando reduzir ao máximo o uso dos mesmos, seja pela substituição do produto ou pela adição de outros combustíveis

para diminuir a carga poluidora (Maule *et al.*, 2001). Estima-se que, com o grande uso de carros bicompostíveis, a demanda interna de etanol combustível será de 22,1 bilhões de litros anuais até 2010, enquanto, no mercado externo, a demanda projetada seja de 5,2 bilhões de litros (Albino *et al.*, 2006).

Segundo a FAO (<http://apps.fao.org>), a cana-de-açúcar é cultivada em, aproximadamente, 20 milhões de hectares em mais de 90 países. Com o aumento da produção ao longo dos anos, as exportações no Brasil saltaram de 8%, na safra de 95/96 (Pinazza e Alimandro, 2001), para 60% do total comercializado no mercado internacional, colocando o açúcar como o produto de maior sucesso no *agrobusiness* brasileiro.

Anualmente, 560 milhões de toneladas de cana são processadas no Brasil. Para isso, são cultivados 7,7 milhões de hectares, localizados principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Sul, representando 3,5% das terras sob agricultura (www.jornalcana.com.br).

Essa alta eficiência de produção alcançada pelo produtor brasileiro vem de uma longa tradição na produção de cana e açúcar, de aproximadamente cinco séculos. Isso se deve também ao esforço conjunto em pesquisas, criando novas variedades, com maior teor de sacarose, aclimatadas a diferentes condições edafoclimáticas, exibindo tolerância a estresses bióticos e abióticos, de modo a extrair um máximo potencial da cultura sob diferentes condições ambientais.

2.1.2. O projeto SUCEST

O rápido avanço da era genômica permitiu a identificação e caracterização de muitos genes, e o desenvolvimento de ferramentas *in silico*, para analisar a abundância de transcritos, tornou-se um método alternativo mais fácil e bastante informativo (Gygi *et al.*, 2000). Vários métodos têm sido desenvolvidos para medir quantitativamente a população de mRNAs transcrita em um determinado organismo (White *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2003). Esses programas, visando à caracterização transcriptômica de algumas espécies, são denominados projetos EST.

O objetivo de um projeto EST é conhecer rapidamente genes expressos de um organismo. Por meio do sequenciamento de cDNAs é possível obter a

sequência de nucleotídeos de um gene expresso por uma célula. Um projeto EST inclui a produção de uma biblioteca de cDNA, a clonagem dos cDNAs, o sequenciamento dos clones, identificação e anotação dos mesmos. (Baudet e Dias, 2006).

O projeto SUCEST ('*Sugarcane* EST' - <http://sucest.lad.ic.unicamp.br>) foi desenvolvido no Estado de São Paulo e financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), com objetivo de sequenciar os genes expressos em cana-de-açúcar. O acesso ao banco de dados do SUCEST ainda é restrito aos pesquisadores e grupos que participaram do projeto.

O projeto gerou 237.954 ESTs, e as sequências foram reunidas em 43.141 *cluster* (Menossi, 2008). Todas as sequências foram obtidas a partir de clones de 37 bibliotecas de cDNAs, construídas a partir de diferentes tecidos e/ou condição fisiológica da planta (Vettore, 2001). Os clones de cDNA sequenciados são denominados *reads*, que são agrupados, de acordo com seu grau de homologia, em um mesmo arquivo, o cluster (Ferreira, 2002).

Dentre as bibliotecas do SUCEST, está presente a biblioteca de cDNA, obtida de plantas inoculadas com a bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Dessa forma, o banco de dados SUCEST vem a ser uma poderosa ferramenta para identificar genes expressos em resposta à colonização pelo endófito

2.1.3. Northern eletrônico: um método automatizado para determinar o padrão de expressão em banco de dados EST

Com o grande aumento dos bancos de dados ESTs (marcas de sequências expressas - *expressed sequence tags*), tem sido possível adquirir conhecimento acerca da expressão de genes tecido-específicos, mediante experimentos simplificados, como a bioinformática. Análises baseadas em computadores são usualmente referidas com o termo *in silico*, devido ao fato de a análise da expressão gênica, pela utilização de banco de dados ESTs, apresentarem similaridade com o método laboratorial *northern blotting*, sendo este, conseqüentemente, denominado *Northern in silico* ou *Northern* eletrônico (Keller *et al.*, 2006; Altschul *et al.*, 1997).

Após a seleção do gene a ser analisado, é possível verificar a ocorrência do EST, em diferentes tecidos e/ou condição (bibliotecas) (Ferreira, 2002). O EST é um cDNA (DNA complementar) que é a cópia de um RNAm (RNA mensageiro). Essa contagem do número de vezes em que cada EST aparece na biblioteca de interesse (tecido e/ou condição) é conhecida como análise da expressão gênica *in silico* ou *Northern* eletrônico (Rafalski *et al.*, 1998). Tal método representa uma alternativa de baixo custo para a análise genômica, permitindo a análise da transcrição de genes *in silico* e viabilizando a descoberta de funções biológicas.

2.2. Fotografia fluorescente eletrônica (EFP Browser): uma ferramenta para analisar dados biológicos em larga escala

A fotografia eletrônica fluorescente (EFP Browser - <http://www.bar.utoronto.ca>) foi desenvolvida para facilitar a interpretação de dados de expressão gênica e de outros dados em larga escala. Atualmente, estão disponíveis para uso, as fotografias eletrônicas de *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula*, *Oryza sativa* (arroz), *Populus trichocarpa* (álamo), *Hordeum vulgare* (cevada), *Mus musculus* (camundongo) e células de *Arabidopsis*. No caso de *Arabidopsis*, essa ferramenta permite explorar dados de microarranjo e visualizar a expressão de aproximadamente 22.000 genes, representados em um *genechip* da empresa Affymetrix (Winter *et al.*, 2007).

O uso do método fornece imagens coloridas, representando os níveis de expressão de um gene em diferentes tecidos, órgãos ou em resposta a algum tratamento em particular. Tal expressão pode ser visualizada como uma expressão gênica absoluta, relativa ou comparada.

Nesse contexto, o EFP Browser pode ser uma ferramenta conveniente para interpretar, mas principalmente visualizar a expressão de genes de interesse.

2.3. Estresse biológico

O estresse, em termos físicos, é definido como uma força mecânica por unidade de área aplicada a um objeto. Em resposta ao estresse aplicado, um objeto pode alterar sua dimensão. As plantas, como um sistema biológico, tendo seu sistema delimitado por membranas, impossibilitam a medição da exata força exercida pelo estresse e, portanto, é difícil definir e dimensionar o estresse em termos biológicos. A maioria das definições de estresse define estresse biológico como uma condição ou força adversa capaz de inibir o funcionamento normal de um sistema biológico (Jones e Jones, 1989; Mahajan e Tujeta, 2005).

O estresse é percebido e iniciado pela interação de um material extracelular com uma proteína de membrana. Essa molécula extracelular é denominada ligante ou eliciador, e a proteína de membrana é chamada de receptor. Vários sinais de estresse, bióticos (vírus, bactérias, fungos, insetos, herbívoros, roedores etc.) e abióticos (frio, calor, sal, seca, radiação, químicos, poluentes etc.), servem como eliciadores para a célula vegetal (Mahajan e Tujeta, 2005).

2.3.1. Estresses abióticos

O crescimento e a produtividade vegetal são frequentemente afetados por distúrbios naturais na forma de vários fatores de estresse abiótico, como frio, sal, seca, calor, metal pesado. Atividades antropogênicas têm acentuado a existência desses fatores de estresse, inibindo o potencial genético do vegetal e limitando sua produtividade (Mahajan e Tuteja, 2005).

Plantas respondem a esses estresses por meio de alterações metabólicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas. Conseqüentemente, existe uma rede de sinalização complexa e fundamental para possíveis respostas e adaptações a essas condições ambientais adversas (Zhu, 2001).

2.3.1.1. Estresse salino

A salinidade do solo é um dos principais fatores limitantes na agricultura mundial (Allakhverdiev *et al.*, 2000), que vem sendo agravada por práticas agrícolas, como por exemplo, manejos de irrigação inadequados. Sabe-se que o desenvolvimento das técnicas de irrigação tem causado numerosos casos de salinização. Dos 270 milhões de hectares irrigados, 110 milhões (40%) estão localizados em regiões áridas, embora 60% dessa irrigação seja praticada em regiões de clima tropical e subtropical (Smedema e Shitati, 2002). Aproximadamente 1/3 das terras irrigadas é considerada afetada pela salinidade (Flowers e Yeo, 1997).

Devido ao acúmulo de sal no solo, a salinidade causa um decréscimo no potencial osmótico do vegetal, resultando em estresse hídrico. O estresse iônico é também ocasionado em plantas expostas ao sal, principalmente o Na e o Cl (Ueda *et al.*, 2003). Adicionalmente, ocorre um desequilíbrio iônico pelo distúrbio na concentração intracelular de íons essenciais (Greenway e Munns, 1980; Gorham *et al.*, 1985). Todos esses efeitos podem perturbar funções fisiológicas e bioquímicas da célula, permitindo eventuais mortes celulares.

Durante o estresse salino, a membrana plasmática é o primeiro contato com o sal. A permeabilidade da membrana reflete o status da matriz lipídica e da interação proteína-lipídeo (Mansour e Salama, 2004). Alguns estudos evidenciam a importância de se estudar a permeabilidade da membrana sob salinidade, já que esta pode ser o primeiro sítio de trauma durante o estresse (Lauchli, 1990; Mansour, 1997; Mansour e Salama, 2004).

Diferenças na viscosidade do citoplasma também são evidências de sinais de resposta ao sal. Plantas com maior viscosidade citoplasmática são consideradas mais tolerantes quando impostas à salinidade (Plant e Bray, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000).

A salinidade no solo também pode ocorrer naturalmente, principalmente em regiões costeiras, onde o lençol freático frequentemente é contaminado pela água do mar. Muitas vezes, a recuperação destes solos é economicamente inviável (Smith *et al.*, 1994).

De acordo com a Tabela 1, apesar de o estado do Rio de Janeiro possuir uma longa tradição no cultivo de cana-de-açúcar, sua produção é baixa quando comparada ao dos Estados de Minas Gerais e São Paulo.

Tendo em vista que grande parte da cultura canavieira no Brasil, principalmente na região Norte Fluminense, está distribuída em áreas litorâneas, a cana-de-açúcar também é afetada pela salinidade. Isso se deve ao fato de a cultura passar por deficiências hídricas, dependendo dessa forma da irrigação e devido a possíveis contaminações do lençol freático pela água do mar. Como resultado, ocorre uma queda na produção.

O estresse salino provoca uma série de mudanças nas funções biossintéticas básicas, incluindo fotossíntese, fotorrespiração e síntese de aminoácidos e carboidratos (Kawasaki *et al.*, 2001; Ozturk *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2002). Essas alterações metabólicas resultam no declínio da produtividade.

Em resposta ao estresse salino, as plantas desenvolvem uma série de mecanismos moleculares e bioquímicos (Parida e Das, 2004). A maioria das plantas pode adaptar-se a níveis de salinidade baixos e moderados, porém, seu crescimento é severamente limitado a 200 mM de NaCl (Hasegawa *et al.*, 2000).

Neste contexto, vários genes são envolvidos. Esses genes são responsáveis por codificar proteínas de resposta ao sal (Tabela 3), que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro grupo inclui proteínas que, provavelmente, respondem ao estresse, no intuito de combatê-lo. Como exemplo, podemos citar enzimas requeridas na biossíntese de osmólitos, chaperoninas, proteínas LEA (Late embryogenesis abundant), proteínas ligadoras de mRNA, transportadores de íons, transportadores de açúcar e prolina, enzimas antioxidantes, hormônios vegetais, como o ABA, e várias proteases (Bohnert e Jensen, 1996; Ingram e Bartels, 1996; Seki *et al.*, 2002). O segundo grupo inclui proteínas que estão envolvidas na regulação da transdução de sinais e expressão de genes que, provavelmente, são regulados para responder ao estresse – como proteínas quinase, fatores de transcrição e enzimas do metabolismo de lipídios (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Tabela 3 - Complexidade da resposta ao estresse salino. (Adaptado de Cushman e Bohnert, 2000)

Compostos e proteínas	Exemplos	Possíveis modos de ação
Osmoprotetores	Aminoácidos (prolina, ectoína) Compostos dimetil sulfonados (glicina-betaína) Polióis (manitol, sorbitol) Açúcares (sacarose, trealose)	Ajuste osmótico, proteção da membrana celular e proteção contra espécies reativas de oxigênio
Moléculas de resposta a estresse oxidativo	Enzimas (catalase, glutatona redutase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase, oxidase alternativa), Compostos não-enzimáticos (ascorbato, carotenoides, antocianinas)	Desintoxicação celular
Proteínas de estresse	Proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant)	Estabilização de proteínas e da membrana, redução de estresse hídrico
Proteínas Heat shock (HSP)	Proteínas de resposta a sal, frio, calor, localizadas em diferentes compartimentos subcelulares (chaperonina)	Modulação traducional, prevenção do dobramento incorreto de proteínas
Transportadores de prótons e íons	Transportadores de K^+ , Na^+ , H^+ ATPases, Na^+/H^+ antiporter	Remoção e seqüestro de íons tóxicos do citosol, formação do gradiente de prótons
Transportadores de prótons e íons	Transportadores de K^+ , Na^+ , H^+ ATPases, Na^+/H^+ antiporter	Remoção e sequestro de íons tóxicos do citosol, formação do gradiente de prótons
Moléculas responsáveis por manter a fluidez da membrana	H^+ ATPase, Na^+/H^+ antiporter, desaturases de ácidos graxos	Aumento da fluidez da membrana
Transporte hídrico	Aquaporinas (CIP, TIP, PIP)	Relações hídricas, abertura e fechamento estomático
Moléculas de sinalização celular	MAP quinases, quinases Ca^{+2} dependente, fosfatases, sensores de Ca^{+2} (SOS3)	Sinalização celular
Fatores de transcrição	EREBP, DREB, zinc finger	Ativação da transcrição gênica
Reguladores de crescimento	Ácido abscísico, etileno, brassinosteroides, poliaminas, citocininas	Homeostase hormonal e regulação gênica

No caso da salinidade, Rozeff (1995) reportou que o sal afeta a cultura de cana-de-açúcar e pode interferir na produção de duas maneiras: afetando o crescimento e desenvolvimento vegetal e reduzindo a concentração de sacarose no colmo. A cana-de-açúcar, atualmente, tem-se tornado uma cultura atrativa economicamente, usada para a produção de aproximadamente 60% do açúcar mundial e também de etanol. Dessa forma, plantas de cana, apresentando aumento de tolerância às condições adversas, são altamente desejáveis, pois fatores ambientais que desfavoreçam a cultura são os principais causadores de perda e redução da produtividade agrícola (Rocha *et al.*, 2007; Bray *et al.*, 2000).

2.3.1.2. Estresse hídrico

O estresse hídrico pode ocorrer como o resultado de duas condições, devido ao excesso ou o déficit de água. O estresse hídrico mais comum é o déficit hídrico ou desidratação. A remoção da água de uma membrana biológica ocasiona distúrbios na estrutura lipídica e resulta em uma membrana excessivamente porosa.

A desidratação pode resultar também em perda da integridade de membrana, da seletividade, da atividade enzimática e alterações na compartimentalização celular (Mahajan e Tuteja, 2005).

Os componentes da via de sinalização dos estresses hídrico e salino apresentam resposta cruzada. Virtualmente, cada aspecto da fisiologia vegetal bem como do metabolismo celular é afetado pela salinidade e pela seca (Liu e Zhu, 1998).

Existem alguns efeitos fisiológicos evidentes no estresse hídrico, como alterações no fluxo de íons, fechamento estomático, produção de osmoprotetores e redução no crescimento vegetativo e na divisão celular (Rieira *et al.*, 2005; Schuppler *et al.*, 1998). O crescimento e expansão foliar são geralmente os mais sensíveis. Isso se deve ao fato de que áreas foliares menores apresentam taxa de transpiração reduzida.

O crescimento vegetal e a resposta a estresses são amplamente controlados por hormônios. Em particular, o hormônio ácido abscísico (ABA) é bem caracterizado na via de sinalização em resposta à desidratação. O ABA

regula a transpiração por meio de movimentos estomáticos, promovendo o fechamento e inibindo a abertura de células-guarda (Schoeder *et al.*, 2001). Respostas como aceleração da senescência e abscisão das folhas mais velhas também são encontradas.

Entre os estresses abióticos, o estresse hídrico é o principal fator que influencia a produtividade canavieira. Este afeta diretamente o tamanho do colmo, diminuindo a produção de sacarose (Sugiharto, 2004). A cana-de-açúcar apresenta elevado consumo de água, necessitando de 250 partes de água para formar uma parte da matéria seca da planta (Dillewijn, 1952). Sua irrigação só é cessada antes da colheita, para reduzir a compactação do solo, facilitando o uso de máquinas agrícolas e para aumentar o teor de sacarose (Robertson *et al.*, 1999). Dessa forma, a disponibilidade de água é um fator limitante na produção agrícola da cana-de-açúcar, tornando-a dependente parcial ou total da irrigação.

2.4. O estresse oxidativo como resposta secundária ao sal e à seca

Uma das alterações bioquímicas que ocorrem, quando as plantas são sujeitas aos estresses salino e hídrico, é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *Reactive Oxygen Species*) (Meloni *et al.*, 2003). Porém, durante o metabolismo vegetal normal, as ROS são geradas como produto da cadeia transportadora de elétrons (Moller, 2001), sendo as mitocôndrias e os cloroplastos importantes geradores intracelulares de ROS (Meloni *et al.*, 2003). Em cloroplastos, as ROS podem ser geradas pela transferência direta da energia de excitação da clorofila *a*, para produzir um oxigênio singlete, ou pela redução univalente do oxigênio do fotossistema I, na reação de Mehler (Asada, 1999).

Níveis intermediários de ROS dão início a uma cascata de morte celular programada, permitindo que células comprometidas sejam eliminadas (Datt *et al.*, 2003). A indução e execução da morte celular desencadeiam processos controlados e podem ser modulados por moléculas sinalizadoras, como o ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno (Lam *et al.*, 1999).

As ROS têm sido consideradas, tradicionalmente, produtos tóxicos do metabolismo aeróbico (Rentel e Knight, 2004). Entretanto, nos últimos anos, tornou-se aparente que células vegetais produzem níveis endógenos basais de

ROS (Wohlgemut *et al.*, 2002). Dessa forma, as ROS estariam atuando como moléculas sinalizadoras, quando um aumento no acúmulo de H_2O_2 e alterações no estado redox alertariam a célula vegetal para uma possível mudança do ambiente (Foyer e Noctor, 2003).

As plantas possuem uma série de mecanismos que atua na proteção contra os danos mediados pelas ROS. O termo antioxidante pode ser considerado para descrever inúmeros compostos capazes de dissipar essas espécies reativas, sem que a planta passe por uma destruição severa (Dröge, 2002). Enzimas antioxidantes, como a ascorbato peroxidase (APX), a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), estão envolvidas nos principais mecanismos de detoxificação do meio intracelular (Mittler, 2002).

A redução da taxa fotossintética também aumenta a formação de ROS, e aumenta a atividade de enzimas detoxificadoras (Foyer e Noctor, 2005; Logan, 2005; Apel e Hirt, 2004). Quando as plantas se aclimatam, devido às mudanças do ambiente, ajuste na morfologia da folha, alterações na composição de pigmentos e distúrbios em processos bioquímicos, a prevenção do dano oxidativo pode ser verificada.

A superóxido dismutase é o principal dissipador de superóxidos (O_2^-), e sua ação enzimática resulta na formação de H_2O_2 e O_2 . O peróxido de hidrogênio produzido é então retirado pela ação da catalase e uma variedade de peroxidases (Foyer e Noctor, 1998).

A peroxidação de lipídeos insaturados presentes em membranas biológicas é o sintoma mais proeminente da ocorrência de estresses oxidativos em plantas (Yamamoto *et al.*, 2001). O malonaldeído (MDA), como produto da decomposição de ácidos graxos poli-insaturados de biomembranas, apresenta um grande acúmulo em condições de estresse (Gosset *et al.*, 1994). Em alguns casos, uma alta estabilidade da membrana pode ser correlacionada à tolerância a estresses abióticos (Premachandra *et al.*, 1992).

O sistema antioxidante de resposta não está confinado somente a estresses abióticos, mas é responsivo também à ataque de patógenos, entre outros, podendo também desencadear morte celular programada (Apel e Hirt, 2004).

2.5. A fotossíntese e a resposta da maquinaria fotossintética a estresses ambientais

A fotossíntese é um processo pelo qual plantas, algas e bactérias fotossintetizantes convertem a energia solar em uma forma quimicamente estável de energia, para sintetizar compostos orgânicos. Essa transdução energética é complexa, envolvendo diversos mecanismos físicos e químicos (Strasser *et al.*, 1998).

O processo fotossintético ocorre no cloroplasto. Essa organela, em plantas superiores, possui entre 3 e 10 μm de diâmetro, com comprimento de 1 a 4 μm . A dupla membrana do cloroplasto, interna e externa, separa o sistema fotossintético do citoplasma. A membrana externa é altamente permeável a pequenas moléculas, enquanto a membrana interna possui proteínas transportadoras para transferência seletiva de certos metabólitos (Steffen, 2003). No interior do cloroplasto, localiza-se um sistema de membranas altamente organizado, denominado membranas tilacoidais ou tilacoide, cercado por uma matriz aquosa, o estroma.

A membrana tilacoidal possui um sistema altamente complexo de proteínas inseridas na bicamada lipídica, incluindo também um espaço aquoso denominado lúmen. Os lipídeos correspondem aproximadamente a 50% da massa total do tilacoide, sendo os outros 50% correspondentes aos principais complexos proteicos: fotossistema I e II (PSI e PSII), citocromo b_6f (Cyt b_6f) e ATP sintase (ATPase) (Steffen, 2003).

Um elemento-chave na conversão da energia fotossintética é o transporte de elétrons dentro e entre os complexos proteicos. As reações de transferência de elétrons são rápidas (picossegundos) e altamente específicas (Jajoo *et al.*, 2001). O processo é iniciado quando a luz é absorvida por complexos pigmento-proteína (PSI, PSII, Cyt b_6f e ATPase) que estão envolvidos na separação de cargas, transferência de elétrons e síntese de ATP (Steffen, 2003).

Outro princípio básico compartilhado por todos os organismos fotossintetizantes é o uso de clorofilas e carotenoides como pigmentos coletores de luz. Esses pigmentos orgânicos são capazes de absorver a energia luminosa que iniciará as reações fotoquímicas da fotossíntese. A energia luminosa, absorvida pelos coletores de luz (LHC), composta por complexos de pigmento-

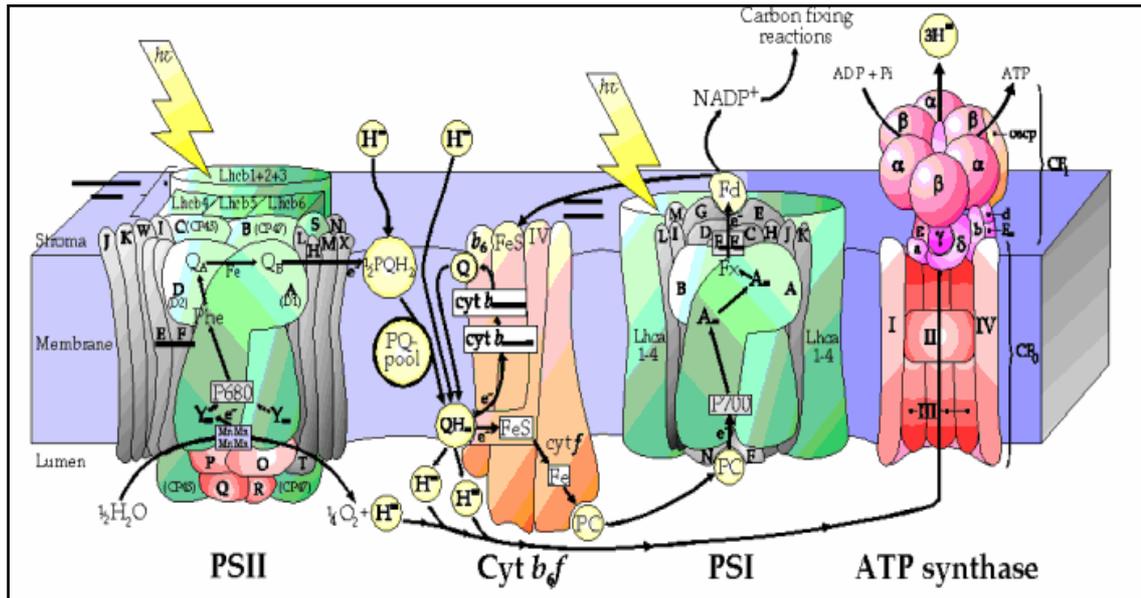
proteína, é transferida para os centros de reação do PSI e PSII onde é usada para iniciar a separação primária de cargas.

Considerando que as clorofilas são os principais pigmentos coletores de luz, os carotenoides, são então chamados de pigmentos acessórios, possuindo também um papel fundamental na proteção dos complexos de pigmento-proteína contra excessos de luz e espécies reativas de oxigênio.

Biossinteticamente, as clorofilas derivam-se de uma porfirina e consistem de um anel tetrapirrólico, contendo um átomo central de Mg^{2+} . A diferença entre clorofila *a* e *b* reside no fato de que a primeira possui um radical metil e a segunda possui um radical aldeído.

A denominação carotenoide é um termo genérico para classificar uma classe de carotenos e seus derivados oxigenados, as xantofilas. Aproximadamente 150 dos 600 carotenoides conhecidos são encontrados em organismos fotossintetizantes. Os carotenoides consistem de uma cadeia de oito unidades isoprênicas conjugadas. Geralmente, eles são distintos por seu grupo final. Entretanto, derivados foram encontrados onde o esqueleto de carbono foi encurtado pela remoção de fragmentos. Esses derivados são denominados apocarotenoides, diapocarotenoides ou norcarotenoides. Já em relação a plantas superiores e algas verdes, os pigmentos encontrados são β -, ϵ - e ψ - carotenos (Steffen, 2003). Um possível método de extração desses pigmentos das folhas é pela utilização de solventes orgânicos (Steffen, 2003).

Sendo a fotossíntese um processo físico-químico dependente de luz, esta também pode ser influenciada pelas condições ambientais do meio em que a planta se encontra (Devlin, 1976). Portanto, diferentes estresses ambientais podem afetar a eficiência fotossintética de uma planta, prejudicando a taxa de reações químicas inerentes ao processo, ou a organização estrutural dos componentes envolvidos. Neste sentido, a configuração dos complexos proteicos ao longo da membrana tilacoidal (Figura 1) representa papel fundamental (Opanasenko *et al.*, 1999), visto que esses, ao atuarem sobre o sistema, podem ser danificados pelos estresses ambientais, prejudicando seu funcionamento.



Barber et al., 1997 (*Physiology Plantarum*).

Figura 1 - O Fluxo de elétrons durante a fotossíntese na membrana tilacoidal.

Diversos estresses exercem, sobre o organismo, um aumento no custo da manutenção, refletindo em sua respiração. Alta temperatura, luz excessiva, drogas, doenças e a própria salinidade mostraram um aumento na respiração com redução da fotossíntese (Takemura *et al.*, 2000).

A provável sequência de eventos fisiológicos e bioquímicos pode mudar com o aumento da salinidade, alterando o nível de gás carbônico intracelular e a abertura de estômatos (Takemura *et al.*, 2000). Pelo aumento de CO₂, foi demonstrado que a salinidade interfere diretamente na fotossíntese, provavelmente pela inibição parcial da atividade da Rubisco, enzima primordial da fase bioquímica de fixação do carbono (Nazaenko, 1992). A Rubisco existe como uma holoenzima composta de oito subunidades maiores (LSUs; 55 kD), codificadas pelo gene cloroplastídico *rbcL* e oito subunidades menores (SSUs; 15 kD), codificadas no núcleo, pela família gênica *rbcS* (Spreitzer, 1993).

A sensibilidade da holoenzima Rubisco ao estresse oxidativo também é bastante elucidada (Cohen, 2005). Shapira *et al.* (1997) demonstraram que a oxidação é seguida de clivagem proteolítica de polipeptídeos da subunidade LSU e, paralelamente, a tradução de *rbcL* cessa, retornando apenas quando condições ótimas são reestabelecidas.

A membrana tilacoidal também pode se adequar a condições de estresse abiótico. Isso requer respostas a curto prazo, como transição de estado e

aumento nos componentes de dissipação de energia, e respostas a longo prazo, como mudanças na razão PSI/PSII (Aro e Andersson, 2001).

O estresse salino também resulta num significativo acúmulo de sódio e cloro nas folhas, induzindo uma redução no teor de pigmentos e, portanto, um decréscimo na eficiência fotossintética (Lu *et al.*, 2002). Esse decréscimo poderia ser, de outro modo, uma consequência indireta de uma fisiologia prejudicada devido ao estresse.

Um método que tem sido bastante proposto para se estudar o desempenho fotossintético é o uso de medidas da fluorescência da clorofila *a*, associada ao fotossistema II (Newton e McBeath, 1996). Isso foi possível devido ao desenvolvimento de fluorímetros modulados (Ögren *et al.*, 1985) que utilizam uma fonte luminosa de excitação modulada (1 a 100 kHz), juntamente com um sistema de detecção de fluorescência. Em alguns casos, mudanças nas variáveis de fluorescência podem ser observadas, porque a maioria das cultivares tolerantes exibe um reduzido decréscimo na eficiência fotoquímica, quando crescem em condições de estresse (Plaut *et al.*, 1990).

2.5.1. A fluorescência da clorofila *a* como monitoramento do desempenho do aparelho fotossintético

A energia do fóton absorvido pelos pigmentos fotossintéticos desencadeia as reações fotoquímicas (Schreiber *et al.*, 2000). O fluxo de fótons excita a molécula de clorofila, levando-a a um primeiro estado excitado, singleto (Holzwarth, 1991), e a separação de cargas no centro de reação ocorre após alguns picossegundos (Bolhàr-Nordenkampf *et al.*, 1993). Quando não ocorre a separação de cargas, o pigmento excitado retorna a um nível basal e a energia absorvida é emitida como calor (D) e fluorescência (F) (Krause e Weis, 1991).

Com o início da absorção da energia luminosa, os aceptores localizados nos tilacoides estão aptos a receber elétrons das moléculas de clorofila *a* especial. Como resultado, o número de aceptores apto a aceitar os elétrons é rapidamente reduzido a zero, visto que todos os sítios de redução estão ocupados em consequência da ativação da fase fotoquímica. Dessa forma, a fluorescência é elevada durante a atividade do aparelho fotossintético, sendo reduzida

posteriormente. A cinética de emissão da fluorescência e as fases da curva são convencionalmente denominadas de **OJIP** (Figura 2).

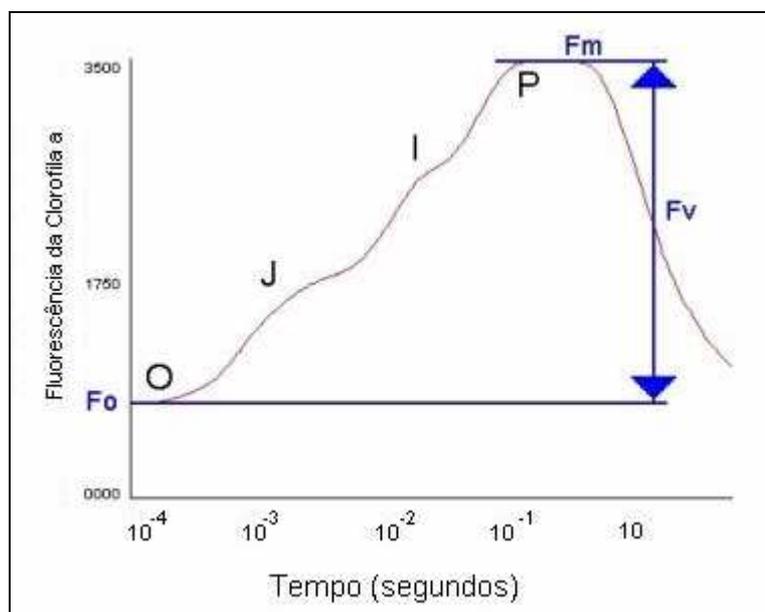


Figura 2 - Cinética da emissão de fluorescência.

Após o tecido fotossintetizante ser mantido no escuro (adaptação de 15 a 30 minutos), verifica-se que, durante a iluminação, há uma elevação inicial da fluorescência denominada de F_0 (fluorescência mínima ou inicial). O valor F_0 representa a emissão de luz pelas moléculas de clorofila *a* excitadas, antes de a energia ser transferida para o centro de reação do PSII (Mathis *et al.*, 1981). O valor de F_0 é alterado por estresses ambientais, devido a mudanças estruturais nos pigmentos fotossintéticos do PSII (Adams *et al.*, 1993).

A indução da fluorescência da clorofila envolve uma fase transiente, que é rápida (**OJIP**), e uma fase não transiente, lenta (após **P**). A fluorescência transiente da clorofila é conhecida como fluorescência variável (F_v), representando a fluorescência entre os níveis **O** (F_0 – fluorescência inicial) e **P** (F_m – fluorescência máxima) (Krause e Weis, 1991).

A diminuição da fluorescência, após o nível **P**, é denominada *quenching* (**q**), que é uma forma de dissipação. Os *quenchings* são divididos em dois tipos: *quenching* fotoquímico (**qP**) e *quenching* não-fotoquímico (**qN**). O *quenching* fotoquímico é a dissipação ocasionada pela utilização da energia absorvida pelo processo fotoquímico. O *quenching* não-fotoquímico representa a dissipação da energia absorvida por outras formas, principalmente por calor.

Em fluorímetros de luz modulada de modelo Mini-Pam, o processo de dissipação de energia, denominado *quenching*, é expresso matematicamente:

$$qP = (F'_m - F) / (F'_m - F_0)$$

Se considerarmos $qN = 1 - qP$

$$qN = (F_m - F'_m) / (F_m - F_0)$$

Onde o sinal (') está relacionado ao tecido fotossintetizante previamente iluminado.

Como já citado anteriormente, a energia absorvida pode ser utilizada na produção de ATP e NADPH₂, liberada na forma de calor (D) e emitida na forma de fluorescência (F).

Neste sentido, os processos fotoquímicos poderiam ser representados pela equação:

$$Ph + D + F = 1$$

Onde:

Ph - rendimento quântico do fotossistema II

F - fluorescência

D - dissipação na forma de calor

De acordo com Schreiber *et al.* (1998), o rendimento quântico do fotossistema II (Ph) pode ser representado pela razão F_v/F_m . Em condições normais, as plantas apresentam essa razão entre 0,75 e 0,85 (Butler e Kitajima, 1975), verificada em diferentes espécies e entre variedades de uma mesma espécie.

Sendo assim, a razão F_v/F_m é proporcional ao rendimento quântico máximo do PSII, sendo sensível a diversas alterações ambientais que possam afetar a eficiência na absorção de energia (Babani e Lichtenthaler, 1996).

2.6. Sinalização celular em resposta a estresses

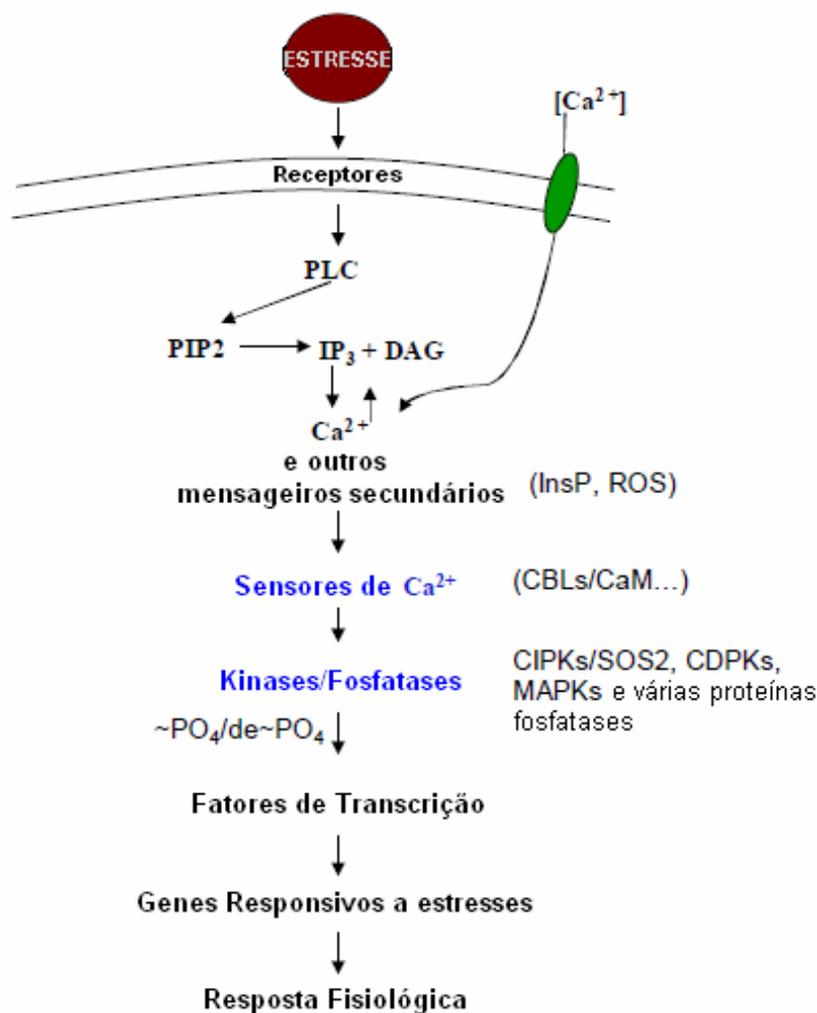
Plantas são organismos sésseis que, para sobreviver às condições adversas, desenvolveram uma via de resposta sofisticada ao primeiro sinal de alteração do ambiente, e então transduzir o sinal, obtendo, posteriormente, uma resposta fisiológica à condição imposta (Cao *et al.*, 2007; Finkelstein *et al.*, 2002).

O estresse é primeiramente percebido por receptores presentes na membrana das células, o sinal é então transduzido e isto resulta em uma geração de mensageiros secundários, incluindo cálcio, espécies reativas de oxigênio (ROS) e fosfatidil inositol (Figura 3). Esses mensageiros secundários, como o fosfatidil inositol, modulam os níveis de cálcio intracelular (Mahajan e Tuteja, 2005).

A perturbação nos níveis de Ca^{2+} é percebida por proteínas ligadoras de cálcio, bem como por sensores de cálcio. Essas proteínas sensoriais interagem com seus respectivos padrões de interação e iniciam uma cascata de fosforilação, resultando na ativação de fatores de transcrição e de genes responsivos a estresses (Mahajan e Tuteja, 2005). O produto dessa resposta é a adaptação e possível sobrevivência à condição desfavorável imposta.

Em eucariotos, proteínas quinase estão envolvidas em aspectos-chave da regulação celular, incluindo divisão celular, metabolismo, e resposta a sinais externos, como estresses. Em plantas, diversas MPKs (proteínas quinase ativadas por mitogênese – do inglês *mitogen activated protein kinase*) são ativadas em resposta a estresses abióticos. Os níveis de transcritos de um número de proteínas quinase, incluindo MAPKKK, MAPKK e MAPK, aumentam em resposta a essas condições adversas (Mikolajczyk *et al.*, 2000).

As respostas celulares e moleculares a estresses ambientais têm sido estudadas intensivamente (Thomashow, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000). O entendimento desses mecanismos, pelos quais as plantas percebem os sinais ambientais e os transmitem à maquinaria celular, para ativar respostas adaptativas, é de fundamental importância para a biologia (Xiong *et al.*, 2002).



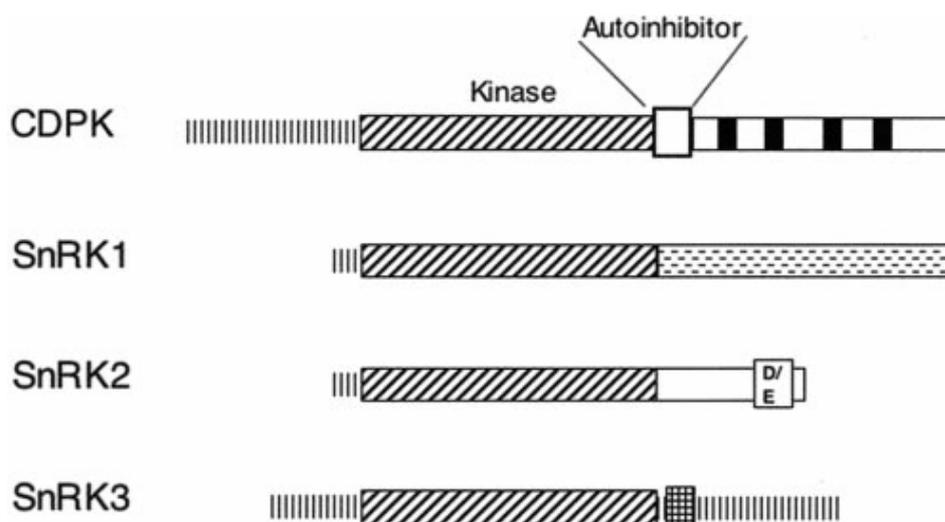
Adaptado de Mahajan e Tuteja, 2005.

Figura 3 - Representação da via de sinalização em resposta a uma condição de estresse. O sinal é percebido por receptor de membrana, pelo qual ativa PLC (fosfolipase C) e hidrolisa PIP₂ (fosfatidil inositol 4,5-bifosfato), para gerar IP₃ (inositol trifosfato) e DAG (diacilglicerol). Com a duração do estresse, os níveis de cálcio citosólico são aumentados. Essa alteração é percebida por sensores de Ca²⁺ que interagem com seus respectivos componentes da via de sinalização, como quinases e fosfatases. Essas proteínas são responsáveis por ativar fatores de transcrição e desencadear a expressão de genes responsivos, permitindo uma resposta fisiológica ao estresse.

Proteínas quinase possuem um papel-chave na cascata de sinalização celular. Em resposta ao estresse osmótico, bem como a outros estresses abióticos e bióticos, há um aumento na concentração de Ca²⁺ citosólico (Knight, 2000). A via de sinalização é complexa e envolve uma ação coordenada de vários genes. O Ca²⁺ é o candidato primário, que funciona como um fator central na coordenação e sincronização de diversos estímulos da resposta celular. Na célula vegetal, muitos sensores de cálcio têm sido descritos como proteínas quinase

dependentes de Ca^{2+} (CDPKs) (Zielinski *et al.*, 1998; Luan *et al.*, 2002) e como proteínas sensoriais CBLs (similares a calcinerina, do inglês - *calcineurin B-like*) (Liu e Zhu, 1998). Várias isoformas de CBL são induzidas em condições de estresse (Kim *et al.*, 2003; Cheong *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2004; Albrecht *et al.*, 2003; Nozawa *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2005). As CBLs interagem especificamente com uma classe de proteínas quinase, conhecida como CIPK (*CBL-interacting protein kinase*) para transduzir o sinal via fosforilação.

Plantas possuem algumas famílias de quinases que não são encontradas em animais ou leveduras, ou são altamente divergentes. Por exemplo, CDPKs são encontradas em plantas vasculares, não-vasculares, em algas e em certos protozoários (Hrabak, 2000). Adicionalmente, existe um grupo de quinases vegetais, relacionada a uma classe de quinases de levedura (SNF1-type), porém, a maioria dessas enzimas, em *Arabidopsis*, apresenta função similar e estrutura primária diferente, quando comparadas com as de seu ortólogo em levedura (Hrabak *et al.*, 2003). Em 1998, Halford e Hardie deram o nome SnRK (quinase relacionada a SNF1 – *Sucrose Nonfermenting1-Related Protein Kinase*) a esse grupo de quinases e as distribuíram em três classes: SnRK1, SnRK2 e SnRK3 (Figura 4), em que SnRK1 tem um papel na regulação global do metabolismo de carbono e nitrogênio; e SnRK2 e 3 estão envolvidos na sinalização em resposta a estresses (Shukla e Mattoo, 2008). Todas essas proteínas possuem um domínio catalítico típico – Ser-Thr – que foram usadas na classificação inicial (Hanks e Hunter, 1995). A maioria dos membros da família CDPK-SnRK apresenta uma região C-terminal que funciona como um regulador da atividade quinase ou um mediador na interação com outras proteínas.



Adaptado de Hrabak et al., 2003.

Figura 4 - Representação esquemática da estrutura dos domínios de proteínas quinase pertencentes à família CDPK-SnRK. As linhas verticais indicam as regiões N e C-terminal. Os sítios de ligação de cálcio estão indicados por caixas pretas. O domínio regulatório de SnRK1 está indicado por linhas pontilhadas, enquanto SnRK2 e SnRK3 estão representados por D/E e a caixa quadriculada, respectivamente.

Ao todo, foram encontrados 38 SnRKs, em *Arabidopsis*, três SnRK1, dez SnRK2 e 25 SnRK3. As duas últimas classes parecem ser exclusivas de plantas (Halford et al., 2000). Existem evidências de que a classe SnRK2 apresenta papel importante na resposta a estresses abióticos em plantas, principalmente a ABA e estresse osmótico (Umezawa et al. 2004; Mustilli et al. 2002; Yoshida et al. 2002; Li et al., 2000;). Com relação à classe SnRK3, as 25 proteínas são representadas por CIPKs (proteínas quinase que interagem com CBLs, do inglês – *CBL-interacting protein kinase*) (Albrecht et al., 2001); SOS2 (*salt overly sensitive 2*) (Liu et al., 2000); SIPs (*SOS3 interacting proteins*) (Halford et al., 2000); e PKSs (proteínas quinase S) (Guo et al., 2001).

Os dois primeiros genes de SnRK2, encontrados em *Arabidopsis*, foram clonados em 1993 e denominados ASK1 e ASK2 (Parker et al., 1993). Posteriormente, a classe SnRK2 foi renomeada como SnRK2.1 a SnRK2.10 (Halford e Hardie, 1998; Hrabak et al., 2003). Em arroz, dez quinases ortólogas, as proteínas da classe SnRK2 foram identificadas por sua ativação durante o estresse osmótico e exposição ao ABA, e classificadas como SAPKs – SAPK1 a SAPK10 (Kobayashi et al., 2004).

2.7. Imunidade inata em plantas

Praticamente todas as plantas encontradas em um ecossistema natural podem ser infestadas por bactérias, vírus, fungos, nematoides ou insetos. Esses diferentes organismos liberam moléculas efetoras (também chamadas fatores de virulência) dentro da célula vegetal, causando doenças. Apesar de todos esses ataques, as plantas são capazes de se proteger. Os mecanismos de defesa vegetal são complexos e compostos de múltiplas linhas de defesa que são efetivas contra uma diversidade de patógenos. Essas barreiras de defesa podem ser químicas ou físicas, inibindo a infecção (Bari e Jones, 2009).

O sistema de defesa induzido inclui alterações moleculares, bioquímicas, e mudanças morfológicas, como estresse oxidativo, expressão de genes relacionados, produção de compostos antimicrobianos, e morte celular programada (van Loon *et al.*, 2006).

Ao contrário dos animais, as plantas não possuem células especializadas em desencadear resposta imune. Em resposta a essa alteração, as células vegetais se reprogramam, priorizando a defesa do sistema para que as funções celulares voltem à homeostase (Spoel *et al.*, 2008).

As plantas se defendem contra a maioria dos patógenos mediante um mecanismo basal de defesa (também chamado de sistema imune inato). O sistema imune vegetal tem sido representado em esquemas como um modelo 'zig-zag', no qual, a percepção de padrões moleculares associados a micróbios e patógenos (MAMPs e PAMPs – *microbial- or pathogen- associated molecular patterns*) reconhecem receptores relacionados a esses padrões (PRRs – *pattern recognition receptors*) na imunidade desencadeada por PAMPs. Como uma forma de burlar esse sistema, os patógenos secretam moléculas efetoras capazes de suprimir essa imunidade e desencadear a doença, resultando na susceptibilidade do vegetal desencadeada por efetores. Mais uma vez, as plantas reconhecem essas moléculas efetoras e ativam o sistema imune, formando um sistema de inativação e ativação ('zig-zag') (Chisholm *et al.*, 2006; Jones e Dangl, 2006).

2.8. Bactérias endofíticas diazotróficas

As plantas podem interagir especificamente com diferentes microorganismos formando associações mutualísticas e patogênicas. A presença desses microorganismos pode ser requerida para o crescimento e o desenvolvimento do vegetal em diferentes ecossistemas (Hardoim *et al.*, 2008). Durante o desenvolvimento dessa associação, o sistema de defesa da planta é estritamente regulado por uma sinalização complexa (*cross-talking*) e por transdução de sinais (Eugem *et al.*, 1999; McDowell e Dangl, 2000), determinando se a interação será benéfica (Lambais, 2001).

De modo geral, a palavra endofítico inclui todos os organismos capazes de colonizar, durante alguma parte do seu ciclo de vida, os espaços intercelulares e tecidos vasculares de diferentes órgãos vegetais, sem causar, na planta hospedeira, dano aparente ou algum sintoma de doença (Petrini 1991). As bactérias endofíticas são estudadas há mais de 120 anos. Durante todo esse tempo, várias bactérias foram isoladas e caracterizadas. *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia* são alguns dos exemplos de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio.

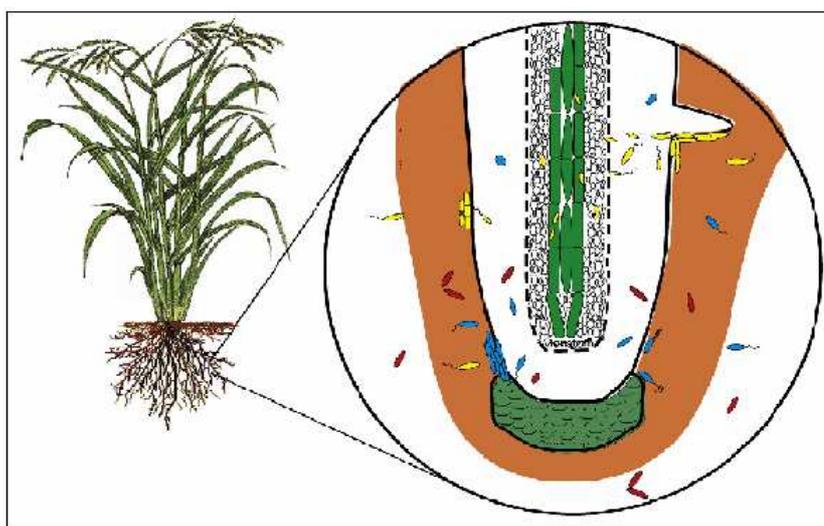
O termo endofítico foi primeiramente introduzido na área de pesquisa de fixação de nitrogênio associado com gramíneas, por Döbereiner (Baldani e Baldani, 2005). A definição da palavra foi dada por De Bary (1866) e refere-se à flora micótica que habita o interior dos tecidos vegetais. Posteriormente, o termo foi também aplicado para bactérias, passando por diversas definições conceituais.

As bactérias endofíticas são classificadas em obrigatórias e facultativas, sendo as últimas caracterizadas como bifásicas, alternando entre plantas e ambiente (principalmente o solo).

Embora a presença de bactérias endofíticas nas plantas seja variável e, ocasionalmente, transiente, elas são capazes de desencadear mudanças drásticas na fisiologia e modular o crescimento e desenvolvimento vegetal (Conrath *et al.*, 2006). Adicionalmente, vários mecanismos moleculares estão envolvidos devido às alterações acarretadas pela invasão bacteriana. Muitos genes candidatos com função desconhecida têm sido encontrados e caracterizados por serem diferencialmente expressos durante a associação planta-bactéria (Rocha *et al.*, 2007). Isso indica que as etapas iniciais da

colonização endofítica são ativamente monitoradas e, possivelmente, aumentadas ou diminuídas pela planta (Vargas *et al.*, 2003).

A diversidade e a composição da comunidade bacteriana na endosfera são provavelmente governadas por eventos estocásticos e influenciadas por processos que determinam a colonização (Battin *et al.*, 2007), como, por exemplo, fatores do solo. Considerando a heterogeneidade do solo nos níveis microhabitados e a distribuição heterogênea da raiz vegetal no solo, as etapas de colonização dependem da probabilidade de ocorrer a interação raiz-bactéria (Figura 5) (Hardoim *et al.*, 2008).



Adaptado de Hardoim et al., 2008.

Figura 5 - Diferentes tipos de endófitos e o processo de colonização bacteriana. Os fatores do solo e a comunidade bacteriana determinam os eventos de associação raiz-bactéria. Bactérias oportunistas e endófitos passageiros (células azuis e vermelhas) são restritos ao espaço do córtex. Elas são incapazes de invadir o tecido-específico e manipular o metabolismo vegetal. Os endófitos verdadeiros (células amarelas) possuem algumas propriedades oportunistas e, adicionalmente, são capazes de invadir o tecido vascular, adaptando-se ao ambiente vegetal sem causar aparente desarmonia.

Nesses últimos anos, vários efeitos positivos foram atribuídos às bactérias endofíticas, como a promoção do crescimento vegetal, controle biológico de pragas e doenças nas plantas, fixação biológica de nitrogênio (Downing *et al.*, 2000; Verma *et al.*, 2001), indução de resistência sistêmica (Hallmann, 1997), produção de sideróforos (Burd *et al.*, 1998; Wenbo *et al.*, 2001) e produção de antibióticos (Strobel e Daisy, 2003).

Outros estudos com endofíticos diazotróficos demonstraram que essas bactérias produzem hormônios reguladores do crescimento vegetal, como auxina (Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993), giberelina (Bastian *et al.*, 1998) e citocininas, as quais contribuem para melhorar a nutrição mineral e a utilização de água pelas plantas (Bazzicalupo e Okon, 2000). Adicionalmente, foi verificado que muitas dessas bactérias promotoras de crescimento produzem e metabolizam a enzima 1-amino ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, um precursor do etileno (Mayak *et al.*, 2004).

A síntese desses hormônios, pelas células bacterianas, poderia atuar na modulação dos níveis endógenos. Com o desequilíbrio desses níveis hormonais, poderia haver alterações na resposta vegetal aos diferentes estresses ou condição ambiental imposta.

Relativamente poucos mecanismos foram demonstrados para explicar as alterações na resposta a estresses ambientais, em plantas inoculadas com essas bactérias promotoras do crescimento vegetal (Mayak *et al.*, 2004). Porém, acredita-se que essas bactérias diazotróficas, em associação com plantas crescidas sob condições adversas, como seca e salinidade, poderiam modificar a adaptação às condições de estresse.

2.8.1. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Gluconacetobacter diazotrophicus, anteriormente denominada *Acetobacter diazotrophicus*, é uma bactéria gram negativa, aeróbia, medindo de 0,7 a 0,8 x 2 a 4 µm e não apresentando movimento espiralado. Sua ocorrência é restrita, podendo ser encontrada em associações com plantas de propagação vegetativa, ricas em açúcar, como cana-de-açúcar, batata doce, capim Camerrom (Döbereiner *et al.*, 1993) e abacaxi (Tapia-Hernandez *et al.*, 2000).

As pesquisas com bactérias diazotróficas foram iniciadas, na década de 60, com a observação de que algumas variedades de cana-de-açúcar poderiam obter aproximadamente 60% de seu nitrogênio por meio da fixação biológica do nitrogênio (Baldani e Baldani, 2005). Esses resultados permitiram, posteriormente, o isolamento e a identificação de *G. diazotrophicus*, em plantas de cana-de-açúcar (Cavalcante e Döbereiner, 1988).

Adicionalmente, entre as propriedades fisiológicas dessa bactéria, foram observadas a tolerância a altas concentrações de sacarose (até 30%), sensibilidade ao sal, tolerância a acidez (baixo pH e ácidos orgânicos) e habilidade de excretar o nitrogênio fixado, sendo capaz de fixar nitrogênio em ambientes com pH a 2,5 (Bertalan *et al.*, 2009; Cojho *et al.* 1993). Em 1999, Baldani e colaboradores demonstraram que a inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, estirpe PAL5, em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, aumentou o peso fresco de parte aérea em 28%, o que é considerado comercialmente significativo. Um outro efeito da colonização dessa bactéria é sua relação com a biossíntese de hormônios vegetais (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993).

A *Gluconacetobacter* é capaz de colonizar tecidos radiculares e partes aéreas pela penetração na ponta da raiz e raízes laterais (James *et al.*, 1994). Essa colonização da cana-de-açúcar pela bactéria foi demonstrada por meio de microscopia eletrônica e ótica (James *et al.*, 1994; Olivares *et al.*, 1996). Na superfície da raiz, a bactéria se concentra nas regiões de junção das raízes laterais. Dentro da raiz, esta pode ser vista no interior de células da epiderme e nos espaços intercelulares do parênquima, bem como dentro de vasos do xilema, através dos quais, a bactéria parece migrar para a parte aérea da cana-de-açúcar (Dong *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 1995).

Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5 foi a terceira bactéria endofítica diazotrófica a ter seu genoma completamente sequenciado. Seu genoma é composto de 3,9 Mpb e dois plasmídeos de 16,6 e 38,8 Kb, respectivamente. As 894 sequências gênicas encontradas estão relacionadas ao modo de vida endofítico, como fixação de nitrogênio, promoção do crescimento vegetal, metabolismo de açúcar, transportadores, biossíntese de auxina e a ocorrência de bacteriocinas (Bertalan *et al.*, 2009).

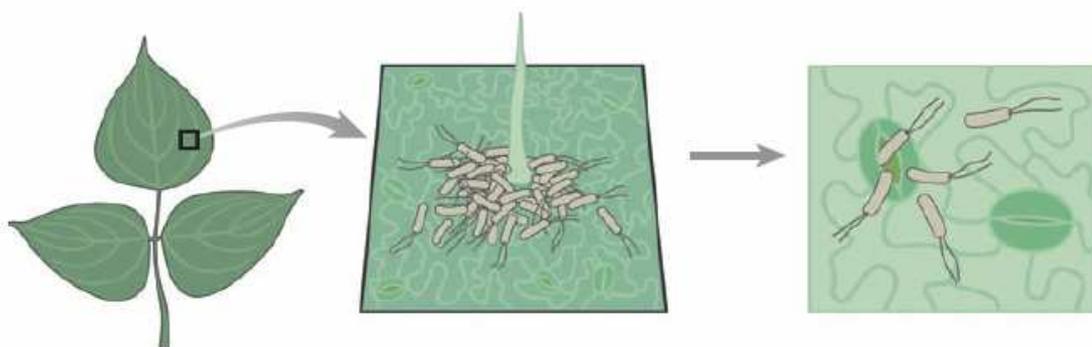
2.9. Papel dos estômatos na resposta imune inata

Estômatos são poros microscópicos presentes na superfície da área foliar, compostos de duas células especializadas da epiderme, denominadas células-guarda (Lawson, 2008). Através dos estômatos, as plantas conduzem as trocas gasosas necessárias para a fotossíntese e controla a perda de água por meio da

regulação da abertura do poro. As plantas regulam a abertura e o fechamento desse poro mediante as alterações na pressão de turgor dentro das células-guarda. Os movimentos estomáticos são influenciados por numerosas condições ambientais, como intensidade de luz, umidade relativa do ar, concentração de CO₂, salinidade e desidratação (Underwood *et al.*, 2007).

Mudanças na abertura estomática em resposta ao ambiente são mediadas por uma complexa sinalização. O hormônio ácido abscísico (ABA) é um componente-chave de diferentes vias de sinalização, relacionadas ao estresse em plantas, e desempenha um papel central na sinalização celular, permitindo o fechamento estomático. Essa sinalização via ABA é transduzida por meio de sinais, incluindo a produção de compostos como óxido nítrico (NO) e H₂O₂, e sinais intermediários, como a quinase específica de células-guarda OST1 *open stomata 1* (SnRK2.6), e alterações e oscilações nos níveis de Ca²⁺ citosólico (Fan *et al.*, 2004; Mustilli *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2001).

Historicamente, essa abertura na superfície foliar era considerada uma porta de entrada passiva para microorganismos (Figura 6). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que o estômato desempenha um papel ativo, durante a invasão bacteriana, como parte de um sistema imune inato da planta (Melotto *et al.*, 2008).



Adaptado de Melotto et al., 2008.

Figura 6 - Células bacterianas presentes na superfície foliar, ilustrando a agregação de algumas bactérias próximas ao tricoma e a invasão bacteriana através dos poros estomáticos.

Em 2006, Melotto e colaboradores usaram plantas de *Arabidopsis* adaptadas à luz, nas quais 70-80% dos estômatos estavam abertos. Quando as folhas foram expostas a uma suspensão bacteriana de *Pst* DC300, a um patógeno de tomate e *Arabidopsis*, uma redução marcante nos números de

estômatos abertos foi observada dentro de 1 a 2 horas de incubação. No entanto, após 3 horas, muitos dos estômatos reverteram seu estado para aberto.

Diversos estudos verificaram que estômatos de *Arabidopsis* apresentaram resposta à presença de bactérias e ao tratamento com padrões moleculares associados a patógenos, derivados de bactérias (PAMPs). A percepção de PAMPs, por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), é a base da imunidade inata em muitos organismos superiores, incluindo animais, insetos e plantas (Ausubel, 2005; Chisholm *et al.*, 2006; Jones e Dangl, 2006).

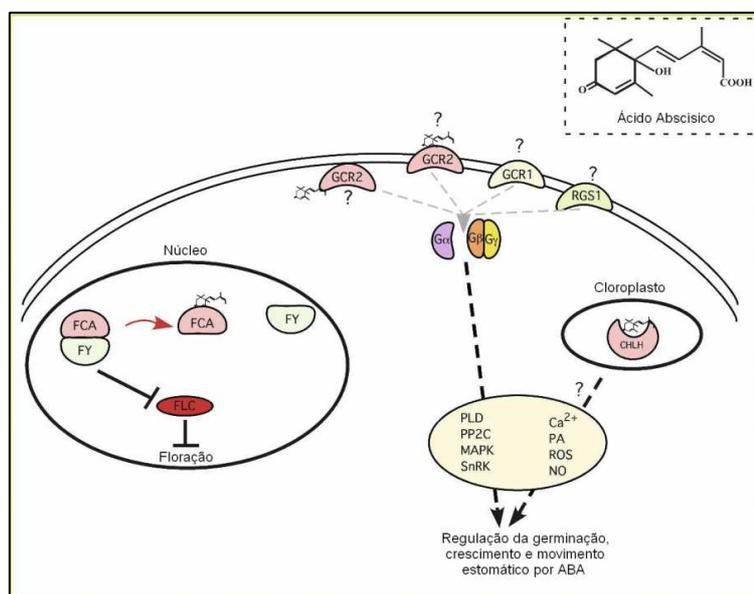
2.10. Papel dos hormônios na defesa vegetal

Alguns patógenos apresentam, em seu sistema regulatório, a capacidade de sintetizar biomoléculas que mimetizam fitormônios e interferem na resposta imune do vegetal. Esses hormônios microbianos resultam em um desequilíbrio hormonal e ativação inapropriada de defesa (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007), promovendo virulência.

O etileno, o ácido salicílico, o ácido abscísico e o ácido jasmônico são descritos como reguladores da resposta a vários patógenos, pestes e a estresses abióticos (Glazebrook, 2005; Lorenzo e Solano, 2005; Broekaert *et al.*, 2006; Loake e Grant, 2007; Balbi e Devoto, 2008). O ácido salicílico tem um papel crucial na resposta de defesa e está geralmente envolvido na ativação da resposta contra biotróficos, bem como no estabelecimento da resistência sistêmica adquirida (Grant e Lamb, 2006). Em contraste, o etileno e o ácido jasmônico estão usualmente associados à defesa contra necrotróficos e insetos herbívoros (Beckers e Spoel, 2006; Mur *et al.*, 2006).

Outro hormônio que também tem sido observado, na resposta de defesa vegetal, é o fitormônio ácido abscísico. Ele é um dos principais hormônios que regula a adaptação de plantas a estresses ambientais, pela modulação da expressão de genes responsivos a condições adversas e pelo controle do fechamento estomático, durante o estresse hídrico. Algumas pesquisas incluem quinases, fosfatases, proteínas-G, enzimas ligadoras de RNA, fatores de transcrição, mensageiros secundários (Ca^{2+}), espécies reativas de oxigênio, óxido

nítrico e fosfolípidos na via de sinalização a ABA (Himmelbach *et al.*, 2003; Israelsson *et al.*, 2006; Hirayama e Shinozaki, 2007) (Figura 7).



Adaptado de Spartz e Gray, 2009.

Figura 7 - Esquema ilustrativo indicando receptores de ABA atuando em diferentes locais celulares. A proteína ligadora de RNA (FCA) interage no núcleo com o fator FY para controlar a abundância de FLC, um inibidor da floração. No cloroplasto, a subunidade H da quelatase-Mg (CHLH) se liga ao ABA e atua como regulador positivo na via de sinalização. Estudos genéticos têm demonstrado a participação de receptores do tipo GPCRs e da proteína-G na via sinalização de ABA. Adicionalmente, proteínas como fosfolipase D (PLD), fosfatase 2C (PP2C), quinase ativadas por mitogênese (MAPK), quinase relacionada a SNF1 (SnRK), ácido fosfatídico (PA), espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) também estão envolvidos na resposta a esse hormônio.

Em geral, acredita-se que o ABA esteja envolvido na regulação negativa da defesa vegetal contra organismos biotróficos e necrotróficos (Bari e Jones, 2009). Estudos demonstraram que a aplicação exógena de ABA aumentou a susceptibilidade de *Arabidopsis* (de Torres-Zabala *et al.*, 2007), feijão (Mohr e Cahill, 2001) e arroz (Koga *et al.*, 2004) a bactérias e fungos. Recentemente, Yasuda e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento com ABA reprime a indução de resistência sistêmica adquirida (SAR), indicando uma interação entre SAR e a via de sinalização de ABA em *Arabidopsis*.

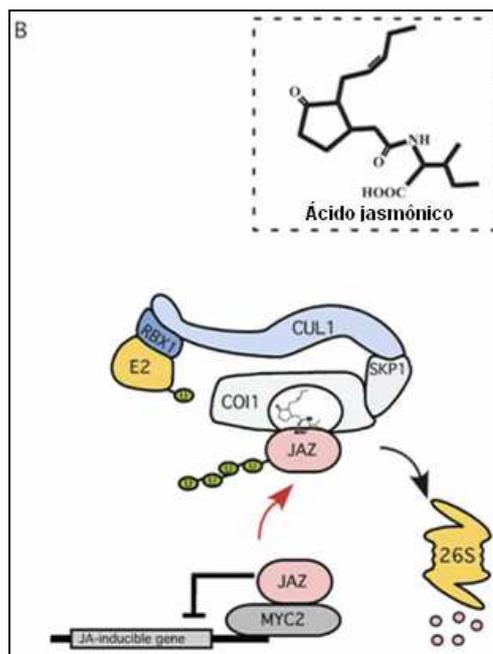
Alguns patógenos são capazes de alterar os níveis de ABA endógeno da planta. Por exemplo, plantas de tabaco infectadas com o vírus do mosaico apresentaram aumento do teor de ABA e a resistência do vegetal ao vírus (Whenham *et al.*, 1986). Similarmente, plantas de *Arabidopsis* infectadas com *Pst*

DC3000 acumularam altos níveis do hormônio quando comparados aos das plantas-controle (de Torres-Zabala *et al.*, 2007). Esses dados sugerem que alguns patógenos podem possuir a habilidade de produzir ABA ou alguma molécula que mimetize sua função, interferindo na resposta de defesa do vegetal (Bari e Jones, 2009).

2.11. COI1, um membro da família F-box, está envolvido na resposta a hormônios e na defesa vegetal

Diversos estudos têm demonstrado que a concentração de ácido jasmônico aumenta na resposta à infecção por patógenos, ferimentos ou pela sua aplicação exógena, induzindo genes relacionados à defesa (Lorenzo e Solano, 2005; Wasternack, 2007). Por exemplo, a síntese de coronatina – uma fitotoxina de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, que mimetiza ácido jasmônico – desencadeia a resposta de defesa dependente de metil jasmonato e suprime a resposta dependente de ácido salicílico, resultando na indução da doença (Cui *et al.*, 2005; Laurie-Berry *et al.*, 2006). Adicionalmente, tem sido demonstrado o efeito da coronatina na prevenção do fechamento estomático induzido por PAMPs, facilitando a entrada do patógeno na folha (Melotto *et al.*, 2006).

Análises utilizando mutantes indicaram que uma proteína sensível à coronatina (COI1 *coronatine insensitive 1* – proteína da família F-box) funciona como um substrato para o reconhecimento modulado pela multi-subunidade SCF (SKP1 – Culina1 – proteína F-box) e determina a especificidade do alvo da ubiquitina ligase E3 (Moon *et al.*, 2004; Xul *et al.*, 2002). O complexo SCF^{COI1} (Figura 8) está envolvido na degradação de proteínas pelo proteossomo 26S e é requerido na resposta a ácido jasmônico (Xie *et al.*, 1998). Em leveduras e células animais, o reconhecimento do alvo pela ubiquitina ligase E3 depende tipicamente da fosforilação e de mudanças pós-traducionais do substrato.



Adaptado de Spartz e Gray, 2009.

Figura 8 - Esquema ilustrativo da resposta ao ácido jasmônico, regulada negativamente por SCF^{COI1} (complexo multimérico SCF ubiquitina-ligase), mediante a repressão da atividade transcricional.

Ainda não está claro como a ação dependente de SCF^{COI1} interfere na inibição do fechamento estomático. Diversos estudos mostram a interação antagonista entre a sinalização de ácido jasmônico (JA) e a sinalização mediada por ácido salicílico (SA) ou ácido abscísico (ABA) (Laurie-Berry *et al.*, 2006; Brooks *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 2004). Porém, uma hipótese atrativa é que a coronatina usa a interação antagonista entre a sinalização de JA, AS e ABA da planta para afetar a resposta estomática. A sinalização estomática ainda não está totalmente clara, portanto, futuras pesquisas serão necessárias para entender a natureza dinâmica que caracteriza a sinalização das células-guarda.

2.12. Produção de hormônios por microorganismos

A primeira observação da síntese de fitormônios por microorganismos foi realizada em plântulas de arroz infectadas com o fungo *Gibberella fujikuroi* (Kurosawa, 1926). O composto identificado, que conferia o aumento do crescimento da planta, foi denominado giberelina. Posteriormente, técnicas

bioquímicas permitiram a identificação de outros hormônios, como auxina e citocinina de bactérias e fungos (Robert-Seilaniantz et al, 2007).

Crozier e colaboradores, em 1988, caracterizaram o hormônio auxina, por meio de espectrometria de massas acoplado a um cromatógrafo gasoso (GC-MS), em cultura de *Azospirillum brasilense*. Dez anos depois, a presença de IAA foi também observada em cultura de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, em meio quimicamente definido (Bastian et al., 1998).

Adicionalmente, diferentes giberelinas (GA₁, GA₃, GA₅, GA₉ e GA₂₀) foram caracterizadas em cultura de *Azospirillum lipoferum* (Piccoli et al., 1996; Bottini et al., 1989), confirmando mais uma vez a produção de hormônios por microorganismos.

As vias de sinalização, bem como a quantidade produzida desses hormônios, são diferentes e específicas para cada microorganismo. Entretanto, durante a interação, a síntese desses hormônios é requerida para o estabelecimento da doença ou colonização (Jamsson, 2000).

O sequenciamento de cepas de *Pseudomonas* revelou a presença de genes envolvidos na biossíntese de hormônios vegetais (Feil et al., 2005). Valls e colaboradores (2006) demonstraram que *Ralstonia solanacearum* pode produzir auxina e que mutantes dos genes, envolvidos na biossíntese, apresentam redução da virulência do patógeno. No caso do fungo *G. fujikuroi*, a giberelina produzida é quimicamente similar e apresenta o mesmo papel fisiológico da giberelina de origem vegetal.

Os estudos já realizados indicam que microorganismos produzem hormônios, principalmente, para modular o balanço hormonal do hospedeiro vegetal, induzindo a repressão da resposta de defesa (Robert-Seilaniantz et al., 2007).

3. TRABALHOS

3.1. EFEITO DA COLONIZAÇÃO POR *Gluconacetobacter diazotrophicus* SOBRE A RESPOSTA FOTOSSINTÉTICA E ENZIMÁTICA DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS AOS ESTRESSES SALINO E HÍDRICO

3.1.1. RESUMO

Bactérias endofíticas podem interferir na fisiologia vegetal resultando em alterações no crescimento, resistência a doenças e aumento de produtividade. Esses benefícios são considerados uma consequência indireta da produção de fitormônios, solubilização de nutrientes e fixação de nitrogênio pela bactéria. Embora esses fatores sejam favoráveis, um endofítico capaz de biossintetizar hormônios e alterar o metabolismo da planta poderia também melhorar ou comprometer a resposta vegetal a uma condição adversa. Neste trabalho, são apresentados resultados que demonstram que a bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 interfere na resposta aos estresses salino e hídrico. Os parâmetros fotossintéticos analisados – rendimento quântico (Fv/Fm), *quenching* fotoquímico (qP), *quenching* não-fotoquímico (qNP) e pigmentos fotossintéticos – indicam que plantas colonizadas por *G. diazotrophicus* apresentam maior susceptibilidade durante os estresses salino e hídrico. Adicionalmente, análises da atividade antioxidante corroboram os resultados

acima citados, nos quais foi possível observar alterações na resposta antioxidante de plantas inoculadas.

3.1.2. ABSTRACT

Endophytic bacteria can interfere with plant physiology resulting in changes in growth, disease resistance and increased productivity. These benefits are considered as an indirect consequence of the production of phytohormones, solubilization of nutrients and nitrogen fixation by bacteria. Although these factors are favorable, an endophytic able to biosynthesize hormones and alter the metabolism of the plant it could also improve or impair the plant response to adverse conditions. This work presents results that demonstrate that the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 interferes in response to salt and drought stresses. Photosynthetic parameters analyzed - quantum yield (F_v / F_m), photochemical *quenching* (qP), non-photochemical *quenching* (qNP) and photosynthetic pigments - indicate that plants colonized by *G. diazotrophicus* have a higher susceptibility during the salt and drought stresses. Additionally, analysis of the antioxidant activity corroborate the above results, it was possible to observe changes in antioxidant response of inoculated plants.

3.1.3. INTRODUÇÃO

Entre os vários estresses ambientais que afetam o metabolismo e a produção vegetal, a salinidade e a seca se destacam por estarem entre os principais fatores limitantes, desencadeando uma série de alterações bioquímicas e fisiológicas (Allakhverdiev *et al.*, 2000). A fotossíntese, juntamente com o crescimento celular, está entre os processos primários a serem afetados pela seca e salinidade (Chaves *et al.*, 2009; Munns *et al.*, 2006). Os efeitos podem ser diretos, como alterações no metabolismo fotossintético (Lawlor e Cornic, 2002), ou secundário, aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio e

atividade de enzimas antioxidantes (Apel e Hirt, 2004). Nesse sentido, mudanças nas condições ambientais, frequentemente, resultam em desequilíbrios entre a energia absorvida, durante a fase fotoquímica da fotossíntese, e a utilização da energia, durante o transporte de elétrons fotossintéticos (Huner *et al.*, 1998). Nessa condição, a taxa de transferência de energia de excitação da antena, para o centro de reação fotoquímica excede a taxa de transporte de elétrons (Herrmann *et al.*, 1997). Durante o estresse, as plantas respondem à condição adversa, por meio de alterações da composição dos pigmentos fotossintéticos e da atividade de processos bioquímicos que previnem o dano oxidativo aos fotossistemas.

Existem evidências que sustentam a hipótese de que bactérias promotoras do crescimento podem conferir resistência em plantas expostas a estresses (Mayak *et al.*, 2004). A pesquisa nessa área ainda é incipiente, pouco é sabido a respeito da resposta de plantas inoculadas submetidas a estresses abióticos.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito dos estresses salino e hídrico, sobre plantas de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria promotora de crescimento *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, por meio de medições da eficiência fotoquímica (F_v/F_m , qP e qN) e de teor de pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenóides). Adicionalmente, foram quantificados os níveis de peroxidação de lipídeos e a atividade de enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidase, catalase e guaiacol peroxidase).

3.1.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.4.1. Material biológico

3.1.4.1.1. Material vegetal e condições de cultivo

Durante os trabalhos, foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar da cultivar RB 758540, cultivadas a partir de minitoletes, cedidos pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Campus Leonel Miranda – Campos dos

Goytacazes/RJ). Os minitoletes foram previamente submersos em água a 52°C durante 2 horas, para possível desinfestação.

Após o tratamento, os minitoletes foram plantados em vasos plásticos de 700 mL, contendo substrato inerte, composto por uma mistura de areia autoclavada e vermiculita, numa proporção de 2:1. Em seguida, os vasos foram transferidos para casa-de-vegetação onde permaneceram por 20 dias. Após esse período, as plantas foram utilizadas nos experimentos de inoculação e submissão aos estresses salino e hídrico.

3.1.4.1.2. Microorganismo, manutenção e preparo do inóculo

Para as inoculações, foi utilizada a bactéria *G. diazotrophicus* PAL-5, cedida gentilmente pelo Professor Fábio Olivares do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF. A manutenção da bactéria em laboratório foi realizada por meio de culturas-estoque. Estas consistiam da mistura, em tubo de 1,5 mL, de 800 µL da cultura da bactéria crescida em meio DYGS (Rodrigues Neto *et al.*, 1986) líquido com densidade ótica de 1,3 a 1,5 Abs, em 600 nm, com 200 µL de glicerol a 50%. Após a mistura, as culturas-estoque foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C.

Para o preparo do inóculo, culturas-estoque foram descongeladas em gelo e inoculadas em meio DYGS líquido numa proporção de 5%. A cultura foi incubada em Erlenmeyer contendo chicanas, e vedada com mantas de algodão envoltas em gaze. O crescimento da bactéria se deu a 30°C durante 24 horas, utilizando-se agitador orbital com rotação de 120 min⁻¹.

No processo de inoculação, a quantidade de inóculo utilizada foi medida em câmara de Neubauer até que se obtivesse cerca de 10⁶ células por mL de solução.

3.1.4.2. Inoculação de plantas de cana-de-açúcar

Plantas de cana-de-açúcar foram inoculadas com a bactéria, por meio da imersão de suas raízes na cultura de *G. diazotrophicus*. As raízes das plantas

foram mantidas imersas na solução durante 3 horas. Para anular a possível interferência de componentes do meio de cultura nos resultados a serem obtidos, as plantas-controle foram imersas em meio DYGS (Rodrigues Neto *et al.*, 1986) isento de bactéria, por igual período de tempo.

Após a inoculação, as plântulas foram novamente transferidas para vasos plásticos de 700 mL, contendo o substrato inerte, e irrigadas com a cultura bacteriana utilizada no processo de inoculação. Posteriormente, as plantas foram acondicionadas em casa-de-vegetação onde permaneceram até o final dos experimentos.

3.1.4.3. Indução aos estresses salino e hídrico

Após duas semanas da inoculação, as plantas foram submetidas aos estresses salino (1,0% de NaCl, resultando em um potencial osmótico (ψ_s) de -0,5 MPa) e hídrico, durante 15 e 30 dias. Para o estresse salino, as plantas foram irrigadas com 400 mL de solução Yoshida salinizada (1 % NaCl). Com relação ao estresse hídrico, a irrigação foi cessada no primeiro dia de estresse. As plantas-controle receberam 400 mL de solução Yoshida sem o agente estressante.

Durante o tratamento, em intervalos de 2 dias, as plantas-controle e salinizadas foram irrigadas com 50 mL de água destilada. Quantidade suficiente para evitar a desidratação e não permitir a percolação, evitando, dessa forma, a lavagem do sal, presente no substrato das plantas submetidas ao estresse salino.

3.1.4.4. Análise da eficiência fotoquímica do PSII

A análise da eficiência fotoquímica foi feita por meio de um fluorímetro de luz modulada modelo FMS-2 – *Fluorescence Monitoring System* (Hansatech, King's Lynn, Norfolk, Inglaterra), utilizando-se de seis repetições. As medições foram efetuadas após 30 minutos de adaptação ao escuro, utilizando-se pinças apropriadas ao sensor do aparelho. As leituras foram realizadas na região mediana da primeira folha completamente expandida do cartucho foliar, das 8 às 10 horas da manhã.

O monitoramento do desempenho do fotossistema II, pela medida das variáveis de fluorescência, foi realizado aos 15 e 30 dias de estresse. A fluorescência inicial (F_0) foi obtida com luz modulada de baixa intensidade ($6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), e a fluorescência máxima (F_m) foi determinada com um pulso de luz saturante de $10000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram obtidos dados referentes ao rendimento quântico do PSII (F_v/F_m), *quenching* fotoquímico (q_P) e *quenching* não fotoquímico (q_N).

3.1.4.5. Extração de pigmentos fotossintéticos

Para a extração de pigmentos fotossintéticos, foram utilizados 10 cm^2 de área foliar, correspondente a 200 mg de tecido, aproximadamente. Este material foi retirado da região mediana da primeira folha totalmente aberta do cartucho foliar. Foram utilizadas cinco repetições.

Durante a extração, o tecido retirado de cada tratamento foi cortado em pequenas tiras e acondicionado em tubos de ensaio com tampa, contendo 4 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido). Estes foram mantidos no escuro por 4 dias em temperatura ambiente.

Após o 4º dia, foi realizada a leitura em espectrofotômetro do extrato obtido. Foram utilizados o comprimento de onda de 665 nm, 649 nm e 480 nm.

Utilizando-se as equações de Wellburn (1994), foram estimados os teores de pigmento da área foliar.

$$\text{Clorofila } a = 12,19 A_{665} - 3,45 A_{649}$$

$$\text{Clorofila } b = 21,99 A_{649} - 5,32 A_{665}$$

$$\text{Carotenóides}_{\text{xantofilas+ carotenos}} = (1000 A_{480} - 2,14 Ca - 70,16 Cb)/220$$

3.1.4.6. Determinação dos níveis de peroxidação de lipídeos

A peroxidação lipídica foi determinada, indiretamente, pelo conteúdo de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, subprodutos da peroxidação lipídica), baseado na metodologia proposta por Dhindsa e Matowe (1981), porém

com algumas modificações. Foram macerados em nitrogênio líquido 500 mg de amostra vegetal. O macerado foi então homogeneizado em 5 mL de 0,1 % de ácido tricloroacético (TCA) com 0,01 % de polivinil poli pirrolidona (PVPP). O homogenato foi centrifugado a 10000 g por 5 minutos. Para cada alíquota de 1 mL do sobrenadante, foram adicionados 4 mL da solução de 20% de TCA, contendo 0,5% de TBA. A mistura foi aquecida a 95°C por 30 minutos e, então, resfriada rapidamente em gelo. Após centrifugação de 10000 g por 10 minutos, a absorvância do sobrenadante foi lida a 535 nm e o seu valor subtraído do valor da absorvância inespecífica a 600 nm. A concentração de TBARS foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. As leituras foram realizadas em leitor de microplaca de 96 poços (μ Quant, BIO-TEK). Foram utilizadas cinco repetições.

3.1.4.7. Determinação da atividade de enzimas antioxidantes

3.1.4.7.1. Extração de proteínas

Foram utilizadas folhas de plantas de cana-de-açúcar com 15 dias de tratamento. Em um gral de porcelana mantido no gelo, aproximadamente 200 mg de tecido foliar foram macerados na presença de tampão de extração (100 mM tampão fosfato de potássio pH 7,5, 1 mM EDTA e 3 mM DTT), na proporção de 1:4 (p/v), acrescidos de PVPP, na proporção de 5% (p/v). O homogenato obtido foi distribuído em tubos de 1,5 mL e centrifugado a $15.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados, transferidos para novos tubos em alíquotas de 100 μ L e, posteriormente, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -70°C. Foram realizadas três repetições.

3.1.4.7.2. Estimativa da concentração protéica pelo método de Bradford

O conteúdo de proteínas em cada amostra foi determinado pelo método de Bradford (1976), para posteriores análises das atividades enzimáticas. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro em $\lambda = 595 \text{ nm}$, com 5 μ L

de amostra, 15 μL de água destilada e 1 mL de reagente de Bradford. Uma curva de 2 a 20 μg de ovalbumina foi utilizada para a análise dos resultados.

3.1.4.7.3. Determinação da atividade da enzima catalase (CAT)

Para determinar a atividade da CAT, foi utilizado o protocolo descrito por Azevedo *et al.* (1998), com algumas modificações. Em uma placa de Elisa para leitura de luz ultravioleta, foram adicionados 250 μL de extrato enzimático diluído (50 μL de extrato enzimático em 950 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5). A reação teve início com a adição de 50 μL de H_2O_2 diluído (1,5 μL de H_2O_2 30% em 48,5 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,5), e o monitoramento da decomposição de H_2O_2 foi feito em espectrofotômetro, por meio das leituras de absorvância a 240 nm durante 1 minuto. O meio de reação sem H_2O_2 foi utilizado como branco. Os resultados de atividade de CAT foram expressos em $\mu\text{M min}^{-1}$ mg de proteína.

3.1.4.7.4. Determinação da atividade da enzima guaiacol peroxidase (GPX)

A determinação da atividade da GPX foi baseada no método utilizado por Zhang e Kirkham (1994), com modificações. Em uma placa de Elisa, foram adicionados 125 μL de guaiacol diluído (0,1677 μL de guaiacol em 125 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0) e 125 μL de H_2O_2 diluído (0,03125 μL de H_2O_2 30% em 125 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0). A reação teve início com a adição de 50 μL de extrato enzimático diluído (20 μL de extrato enzimático em 980 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,0), e a atividade da GPX foi determinada por mensuração da taxa de oxidação de guaiacol a tetraguaiacol, por meio de monitoramento do acréscimo na taxa de absorvância a 470 nm. O meio de reação sem extrato enzimático foi utilizado como branco. Os resultados de atividade de GPX foram expressos em $\mu\text{M min}^{-1}$ mg de proteína.

3.1.4.7.5. Determinação da atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX foi determinada de acordo com o método descrito por Barka (2001). Em uma placa de Elisa para leitura de luz ultravioleta, foram adicionados 200 μL de solução-estoque de ácido ascórbico (0,008132 g de ácido ascórbico em 40 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 acrescido de 0,1 mM de EDTA) e 50 μL de H_2O_2 diluído (0,025 μL de H_2O_2 30% em 50 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 acrescido de 0,1 mM de EDTA). A reação teve início com a adição de 50 μL de extrato enzimático diluído (50 μL de extrato enzimático diluído em 950 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 acrescido de 0,1 mM de EDTA), e o monitoramento da oxidação do ascorbato foi feito mediante leituras de decréscimo de absorvância a 290 nm em espectrofotômetro. O meio de reação sem extrato enzimático foi utilizado como branco. Os resultados de atividade de APX foram expressos em $\mu\text{M min}^{-1} \text{ mg}$ de proteína.

3.1.5. RESULTADOS

3.1.5.1. Efeito dos estresses salino e hídrico sobre a eficiência fotoquímica e teores de pigmentos fotossintéticos em plantas colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*

No intuito de avaliar os efeitos da salinidade e seca sobre a eficiência fotoquímica e teores de pigmentos fotossintéticos, plantas de cana-de-açúcar foram submetidas a 1% de NaCl e ausência de irrigação, durante 15 e 30 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros: rendimento quântico do PSII (F_v/F_m), *quenching* fotoquímico (qP), *quenching* não-fotoquímico (qN), clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides.

3.1.5.1.1. Rendimento quântico do PSII (Fv/Fm)

Em 15 dias de tratamento, a salinidade ocasionou a diminuição da eficiência fotoquímica (Fv/Fm), caracterizada pelo rendimento quântico (figura 9A), em plantas de cana-de-açúcar. Verifica-se que plantas inoculadas e salinizadas apresentaram uma maior redução, quando comparadas com a das plantas submetidas ao sal e não-inoculadas. Aos 30 dias, plantas inoculadas e expostas à salinidade (figura 9B) apresentaram significativa redução, se comparada com as plantas submetidas à salinidade e não-inoculadas.

Com relação ao estresse hídrico, aos 15 dias (figura 9C), somente as plantas inoculadas apresentaram decréscimo, sendo observada uma considerável redução nos valores de Fv/Fm. No entanto, a continuação do estresse hídrico mostrou-se mais drástica para as plantas de cana-de-açúcar. Plantas submetidas à seca e inoculadas não resistiram ao estresse imposto. Todas as plantas colonizadas e impostas a esse estresse estavam mortas com 20 dias de tratamento (figura 9D).

3.1.5.1.2. Quenching fotoquímico (qP)

Como pode ser visualizado na figura 10 (10A e 10C), aos 15 dias, houve acréscimo dos valores de qP em todos os tratamentos, quando tais valores foram comparados aos das plantas-controle. As plantas submetidas à salinidade e seca apresentaram os maiores valores de qP, sendo que as plantas inoculadas e estressadas foram as que apresentaram o maior acréscimo. Cabe ressaltar que plantas inoculadas também apresentaram aumento nos valores de qP, quando comparados com os valores da planta-controle. No entanto, com relação aos 30 dias de tratamento (figuras 10B e 10D), nenhuma alteração foi observada com relação ao estresse salino. No entanto, houve redução de qP nas plantas submetidas à seca.

3.1.5.1.3. *Quenching* não-fotoquímico (qN)

Aos 15 dias de tratamento, verificou-se que o estresse salino acarretou uma redução dos valores de qNP (figura 11A). Tal resultado não foi observado em plantas inoculadas e salinizadas. Os valores de qNP dos demais tratamentos foram similares aos da planta-controle. Entretanto, no 30º dia, observou-se que plantas inoculadas e expostas à salinidade (figura 11B) apresentaram significativo aumento da variável analisada.

Para o estresse hídrico (15 dias), a mesma observação pode ser verificada na figura 11C, na qual somente plantas não-inoculadas e na ausência de água apresentaram decréscimo. No 30º dia de tratamento, plantas não-inoculadas e submetidas à seca (figura 11D) apresentaram considerável acréscimo nos valores de qNP, sendo esses superiores aos das plantas não-inoculadas e salinizadas. Resposta similar foi observada em plantas colonizadas pela bactéria e expostas ao sal.

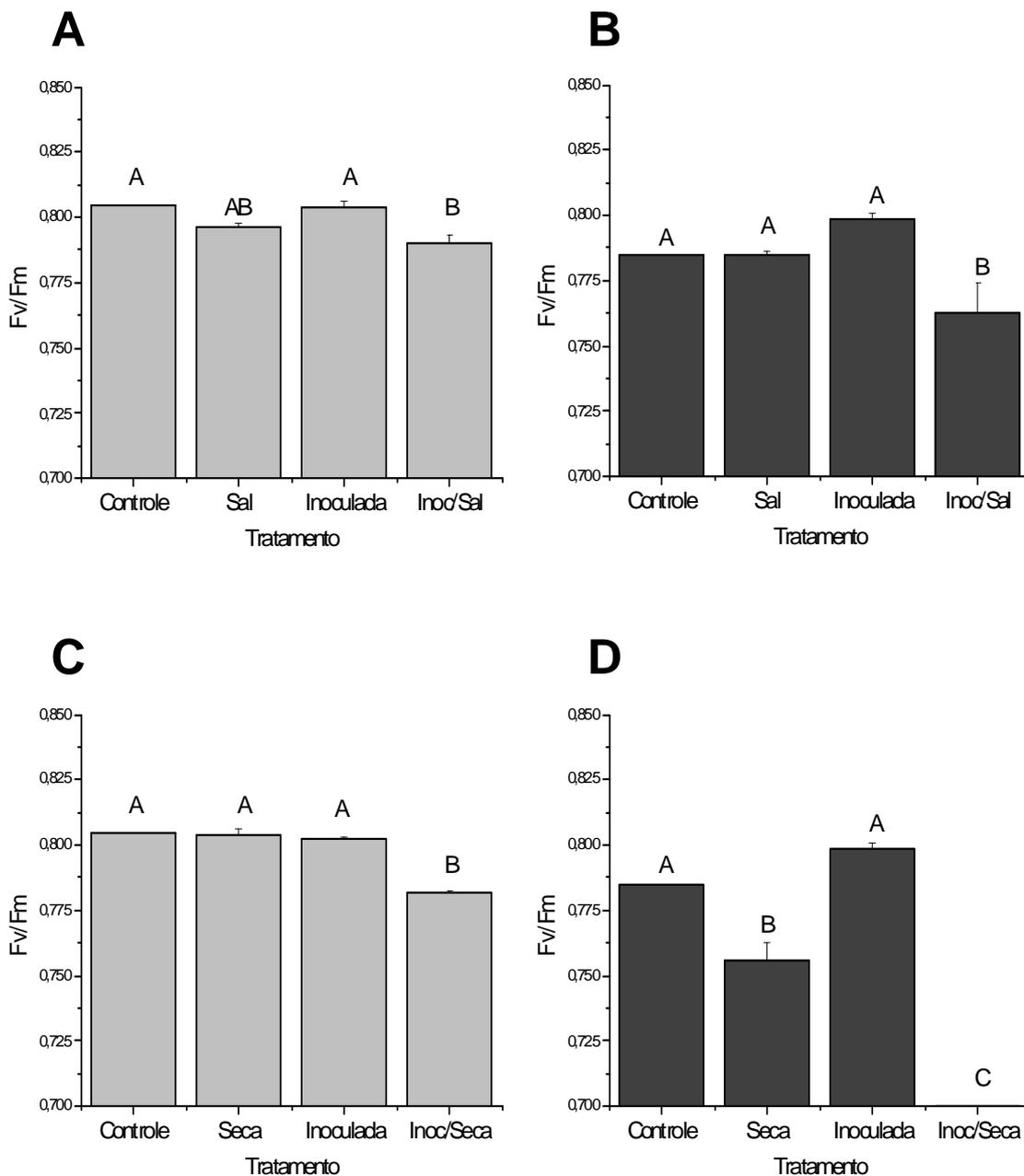


Figura 9 - Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o rendimento quântico (Fv/Fm) de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. As plantas foram submetidas aos diferentes estresses, durante 15 (figuras A e C) e 30 dias (figuras B e D). As barras representam o erro-padrão da média. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (n=10).

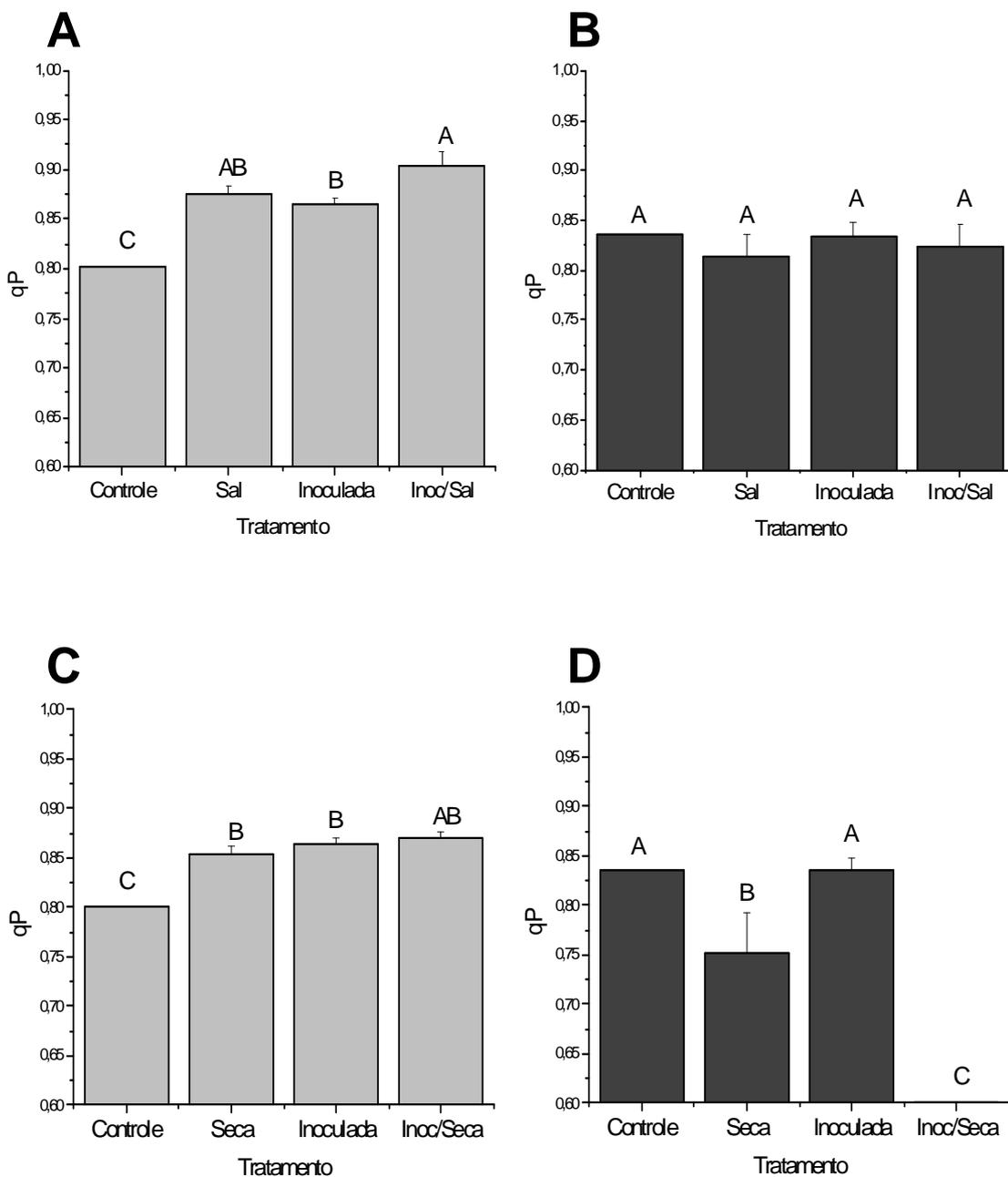


Figura 10 - Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o *quenching* fotoquímico (qP) de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. As plantas foram submetidas aos diferentes estresses, durante 15 (figuras A e C) e 30 dias (figuras B e D). As barras representam o erro-padrão da média. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (n=10).

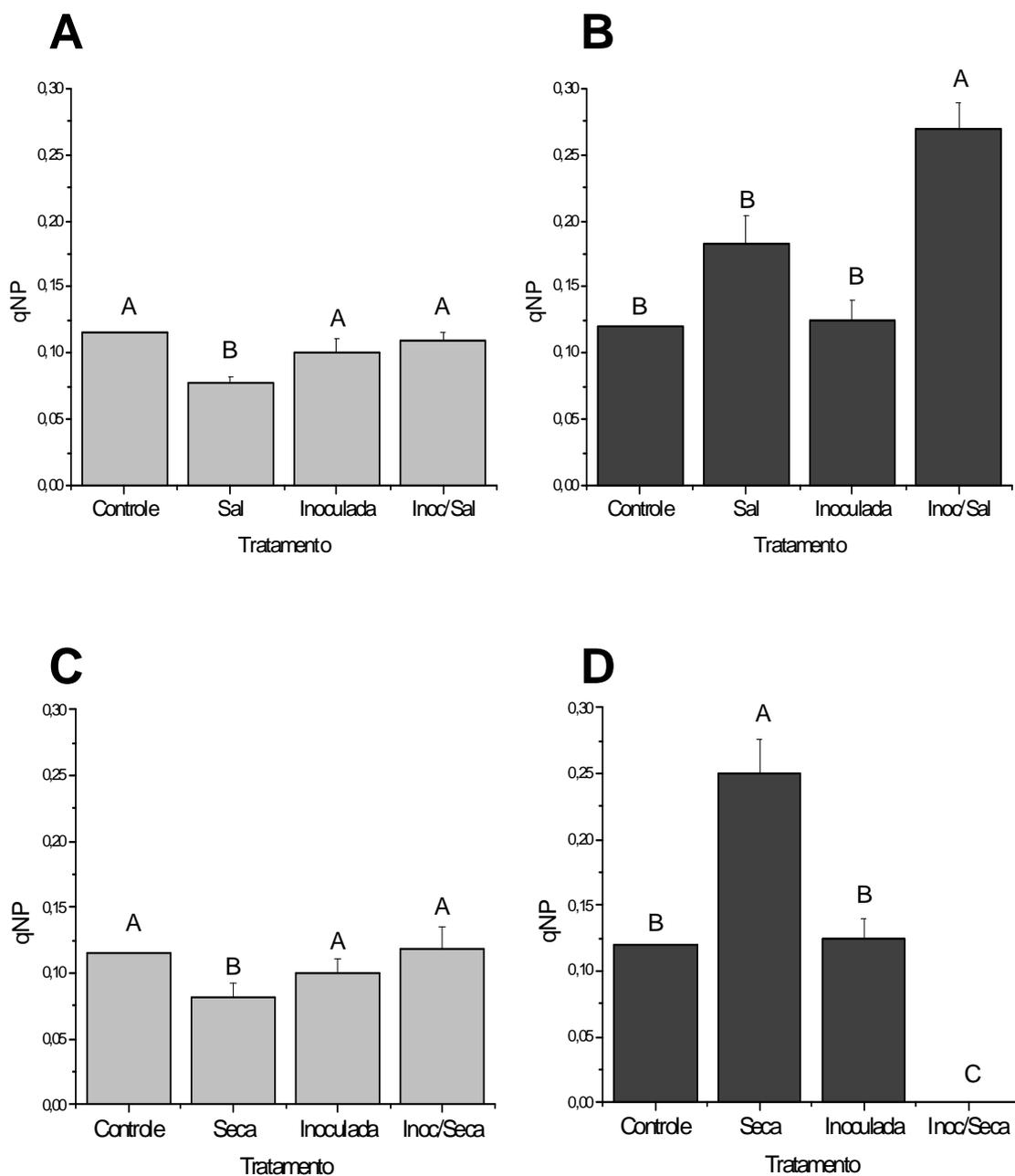


Figura 11 - Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o *quenching* não-fotoquímico (qNP) de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. As plantas foram submetidas aos diferentes estresses, durante 15 (figuras A e C) e 30 dias (figuras B e D). As barras representam o erro-padrão da média. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (n=10).

3.1.5.1.4. Pigmentos fotossintéticos

Foram avaliados os teores de clorofila total, clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides. Adicionalmente, esses valores foram utilizados para calcular as razões clorofila *a/b* e carotenoide/clorofila.

De acordo com a figura 12A, todos os tratamentos (sal, inoculada e inoc/sal) não apresentaram alteração nos teores de clorofila, aos 15 dias, quando comparados aos teores das plantas-controle. Aos 30 dias de tratamento, verificou-se, em plantas expostas à salinidade pequena, a redução dos teores de pigmento, sendo essa diminuição acentuada na presença da bactéria (figura 12B).

Para o estresse hídrico (15 dias), nas plantas expostas à seca (figura 12C), não foi verificado decréscimo no teor de clorofila. Porém, a colonização pela bactéria ocasionou às plantas submetidas à seca um significativo decréscimo nos teores de clorofila. Aos 30 dias, as plantas na ausência de água e bactéria também apresentaram uma grande redução dos teores de clorofila (figura 12D).

Os resultados obtidos para clorofila *a* evidenciam que, aos 15 e 30 dias, não há nenhuma alteração nos teores desse pigmento, em plantas salinizadas, tanto na presença quanto na ausência da bactéria (figura 13A e 13B).

Foi possível verificar que o estresse hídrico, aos 15 dias, também não ocasionou nenhuma redução nos níveis de clorofila *a* de plantas de cana-de-açúcar, principalmente em plantas inoculadas. Porém, no 30º dia de tratamento, a diminuição dos teores de clorofila *a*, em plantas submetidas à seca, foi bastante significativa.

Os dados de clorofila *b* mostram que, aos 15 dias, o estresse salino ocasionou pequeno decréscimo nos teores desse pigmento, sendo essa redução maior na presença da bactéria endofítica (figura 14A). Aos 30 dias de tratamento, somente as plantas inoculadas e submetidas à salinidade apresentaram redução nos teores de clorofila *b* (figura 14B).

Com relação ao estresse hídrico aos 15 dias, resultados semelhantes podem ser observados na figura 14C, em que plantas inoculadas e submetidas à seca apresentaram diminuição no teor de clorofila *b*. Observa-se, aos 30 dias (figura 14D), que plantas desidratadas também mostraram uma significativa redução do pigmento.

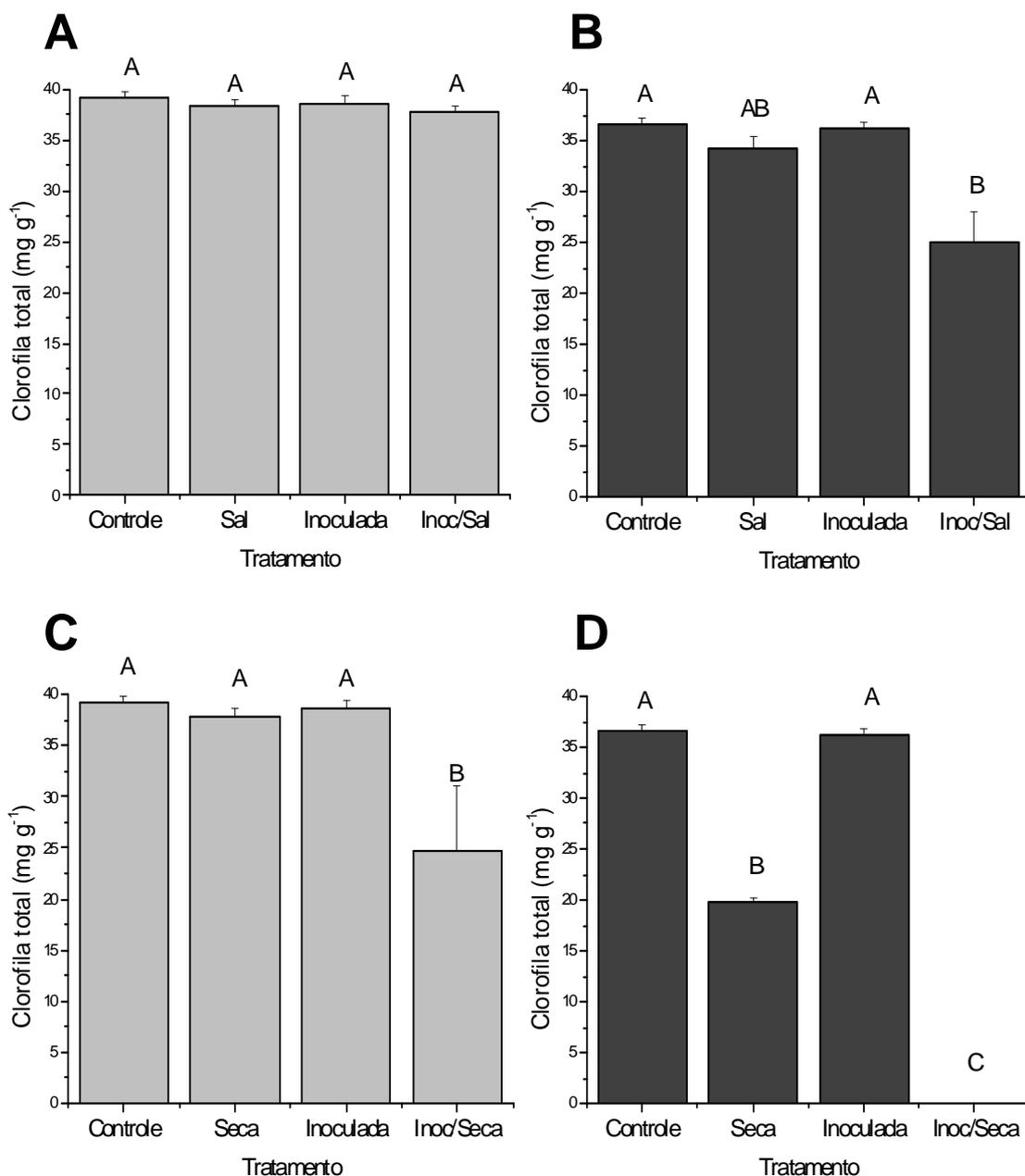


Figura 12 - Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o teor de clorofila total de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. As plantas foram submetidas aos diferentes estresses, durante 15 (figuras A e C) e 30 dias (figuras B e D). As barras representam o erro-padrão da média. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (n=5).

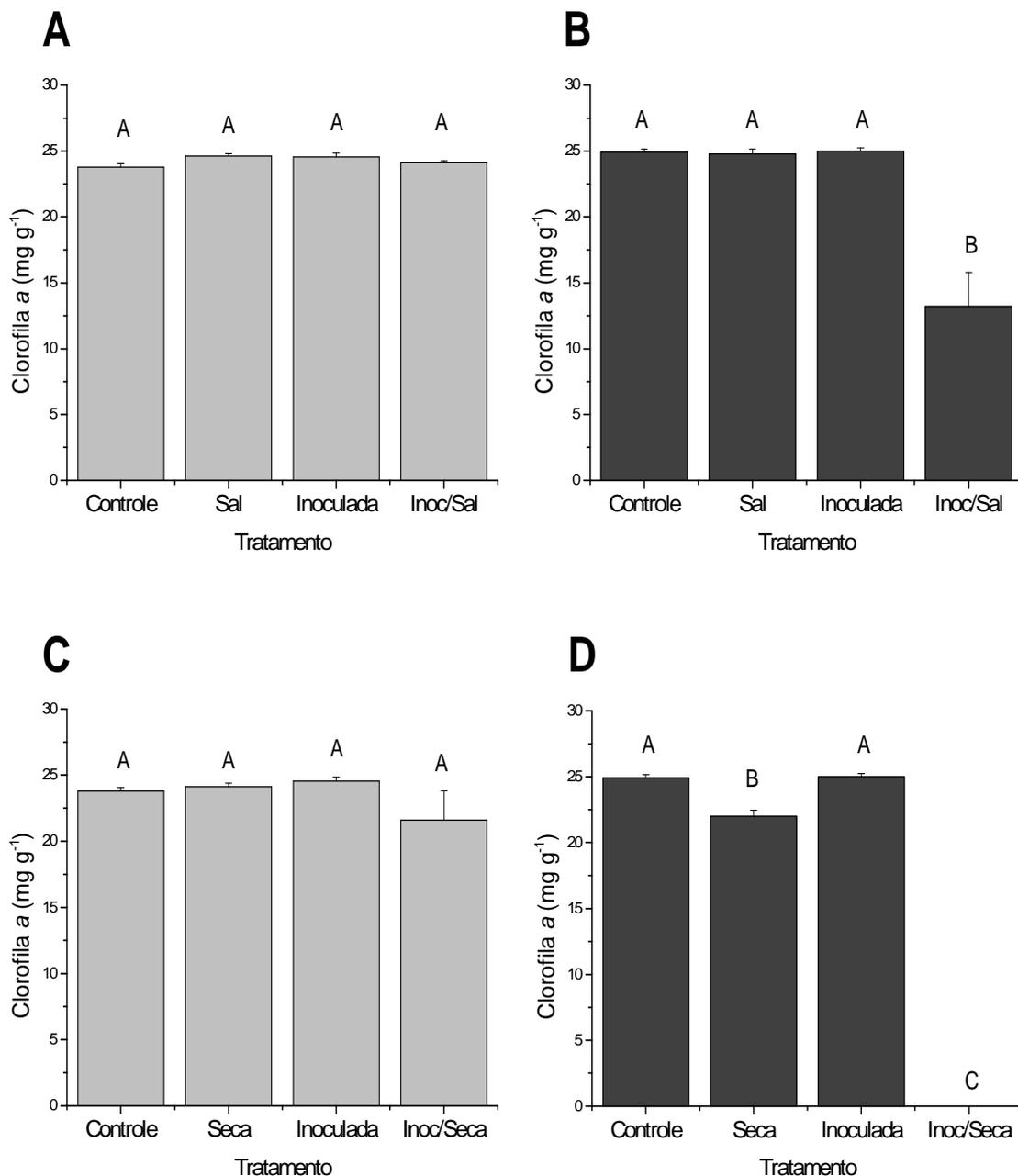


Figura 13 - Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o teor de clorofila *a* de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. As plantas foram submetidas aos diferentes estresses, durante 15 (figuras A e C) e 30 dias (figuras B e D). As barras representam o erro-padrão da média. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (n=5).

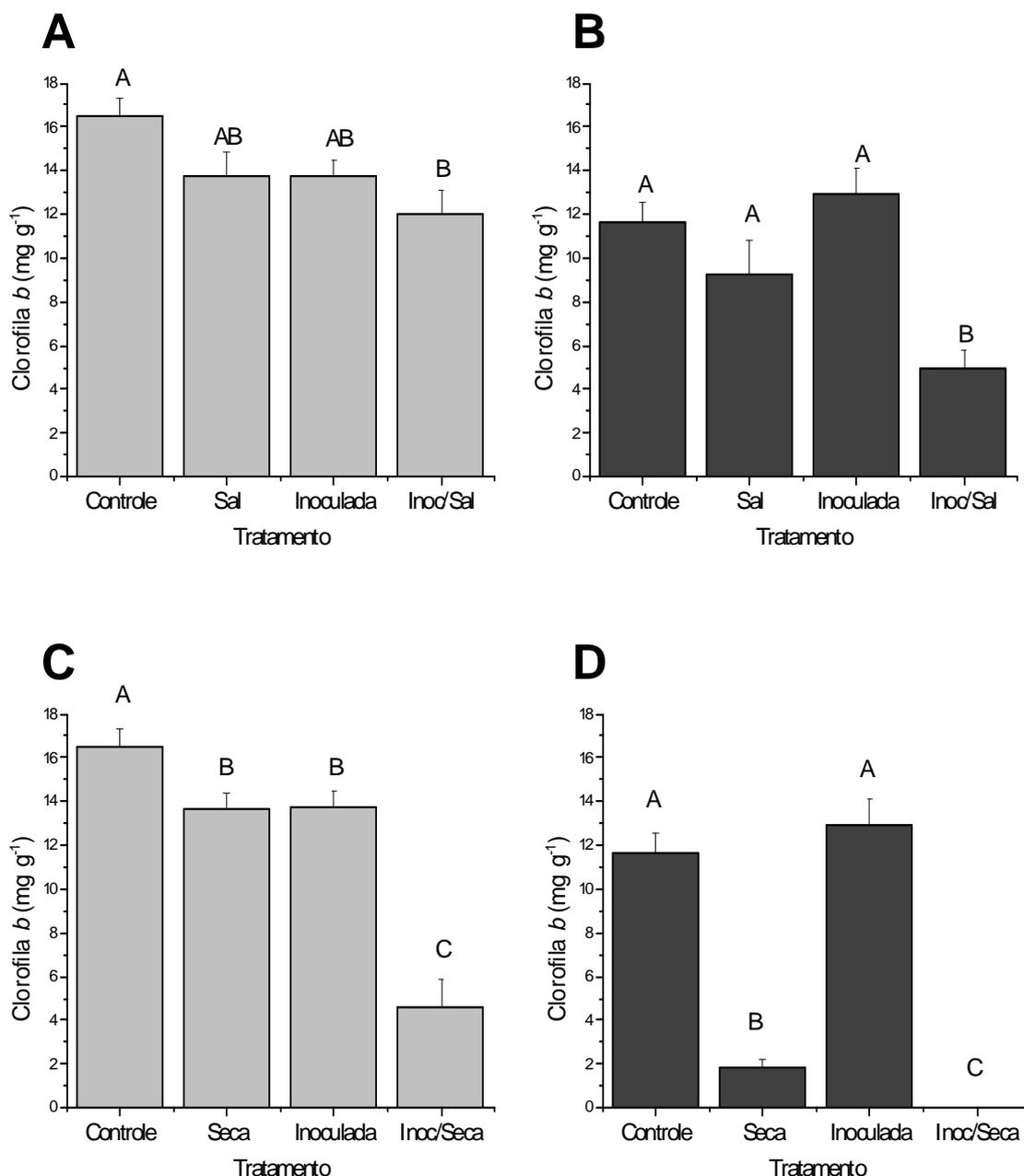


Figura 14 - Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o teor de clorofila *b* de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. As plantas foram submetidas aos diferentes estresses, durante 15 (figuras A e C) e 30 dias (figuras B e D). As barras representam o erro-padrão da média. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (n=5).

Na análise de carotenoides, aos 15 dias, observou-se que a inoculação proporcionou um aumento no teor do pigmento analisado (figura 15A). Adicionalmente, verifica-se que plantas submetidas à salinidade apresentaram

acrécimo nos níveis de carotenoides, tanto na presença quanto na ausência da bactéria. Aos 30 dias (figura 15B), nenhuma alteração foi observada entre os tratamentos.

Para o estresse hídrico (15 dias), resultados similares foram encontrados em plantas na ausência de água e do endófito, e em plantas colonizadas (figura 15C). Porém, quando as plantas eram colonizadas e submetidas à seca, os teores de carotenoides apresentavam significativo acréscimo. No 30º dia de tratamento, observa-se, na figura 15D, que plantas expostas ao estresse hídrico, na ausência da bactéria, apresentaram decréscimo do pigmento.

As razões clorofila *a/b* e carotenoide/clorofila também foram avaliadas. Para clorofila *a/b*, aos 15 dias (figura 16A), as plantas salinizadas, plantas inoculadas, e plantas inoculadas e expostas ao sal apresentaram significativo aumento da razão clorofila *a/b*, sendo esse acréscimo mais evidente nas plantas salinizadas na presença da bactéria. Resultados similares foram observados aos 30 dias (figura 16B), em que plantas submetidas ao estresse salino e inoculadas apresentaram forte acréscimo da razão.

Os dados obtidos para estresse hídrico evidenciam que, aos 15 dias, plantas não colonizadas e expostas à seca, e plantas inoculadas apresentaram um pequeno aumento da razão analisada (figura 16C). No 30º dia, valores semelhantes puderam ser observados em plantas na ausência de água, quando foi verificado forte aumento da razão clorofila *a/b*.

Com relação à razão carotenoide/clorofila, aos 15 dias (figura 17A), todos os tratamentos apresentaram aumento na razão quando comparado ao aumento na razão das plantas-controle. Aos 30 dias (figura 17B), porém, verificou-se que plantas inoculadas apresentaram valores similares aos das plantas-controle. Em plantas salinizadas, um pequeno aumento da razão pôde ser observado, sendo esse valor ainda mais acentuado na presença do endófito. Para o estresse hídrico, aos 15 dias (figura 17C), foi possível observar acréscimos na razão de plantas não colonizadas e expostas à seca, e em plantas inoculadas. Adicionalmente, plantas estressadas (seca) e colonizadas pela bactéria apresentaram forte aumento da razão carotenoide/clorofila. Como pode ser observado na figura 17D, aos 30 dias, o estresse hídrico também ocasionou aumento considerável na razão analisada.

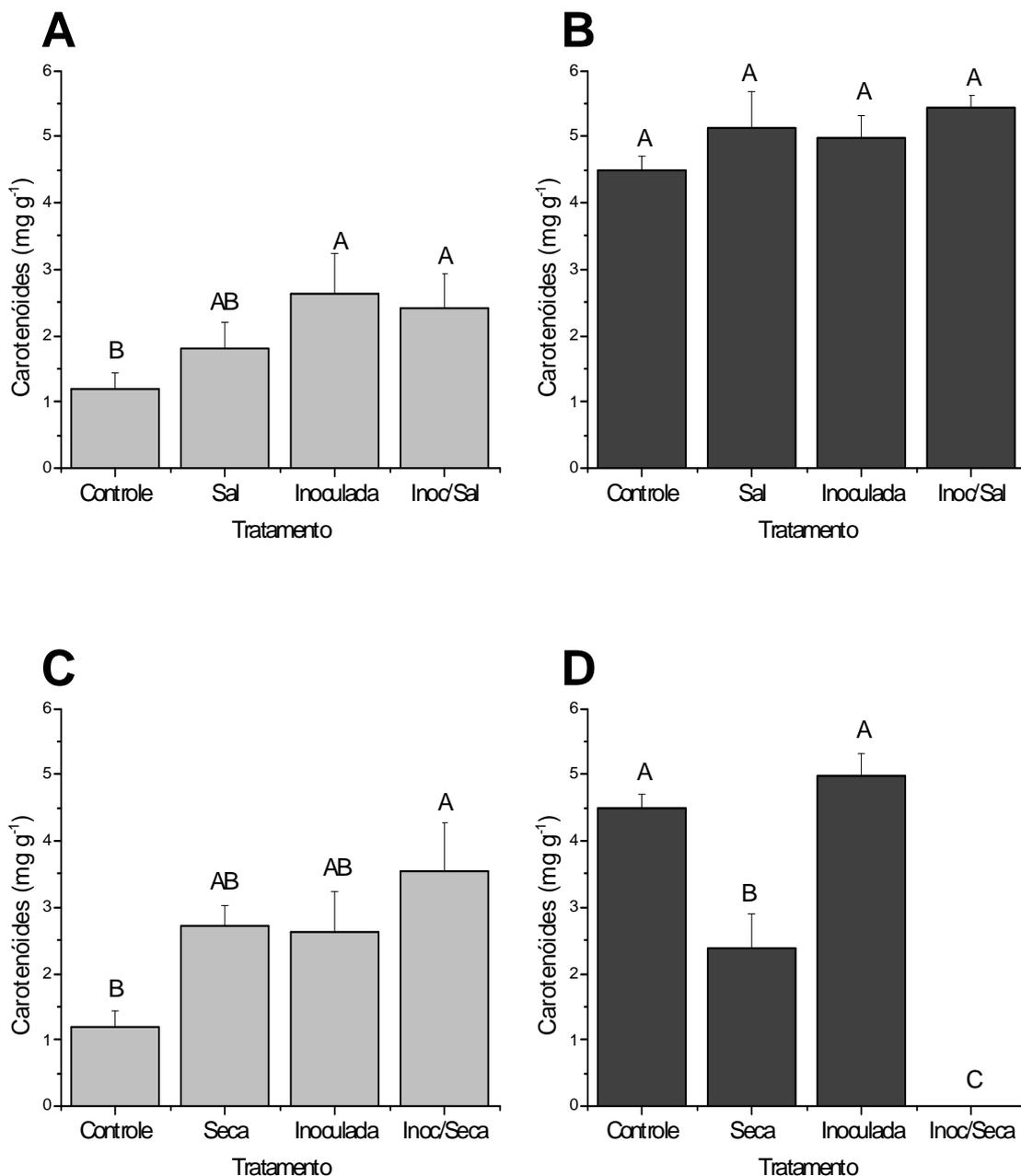


Figura 15 - Efeito dos estresses salino e hídrico sobre o teor de carotenoides de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. As plantas foram submetidas aos diferentes estresses, durante 15 (figuras A e C) e 30 dias (figuras B e D). As barras representam o erro-padrão da média. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (n=5).

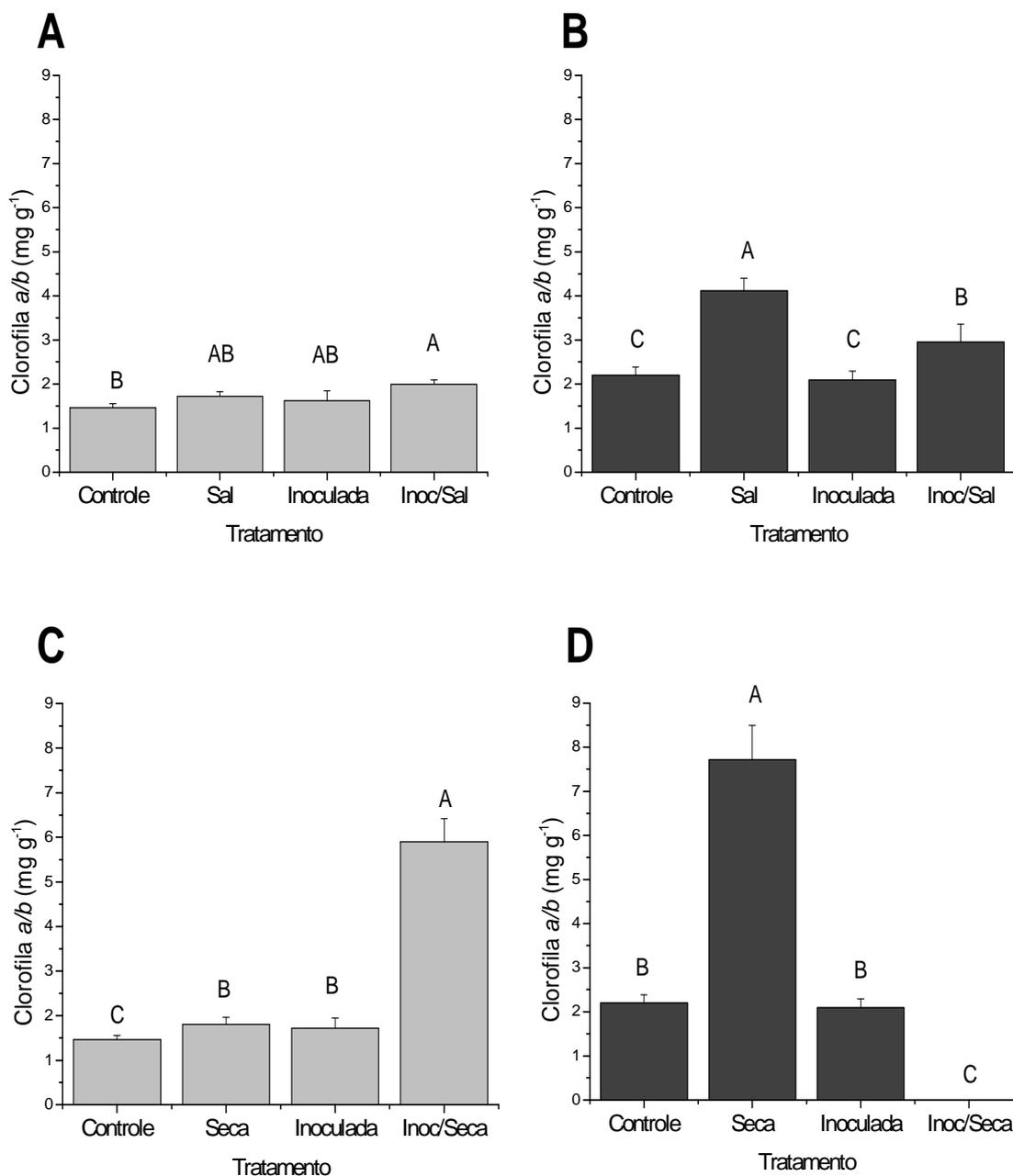


Figura 16 - Efeito dos estresses salino e hídrico sobre a razão clorofila *a/b* de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. As plantas foram submetidas aos diferentes estresses, durante 15 (figuras A e C) e 30 dias (figuras B e D). As barras representam o erro-padrão da média. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (n=5).

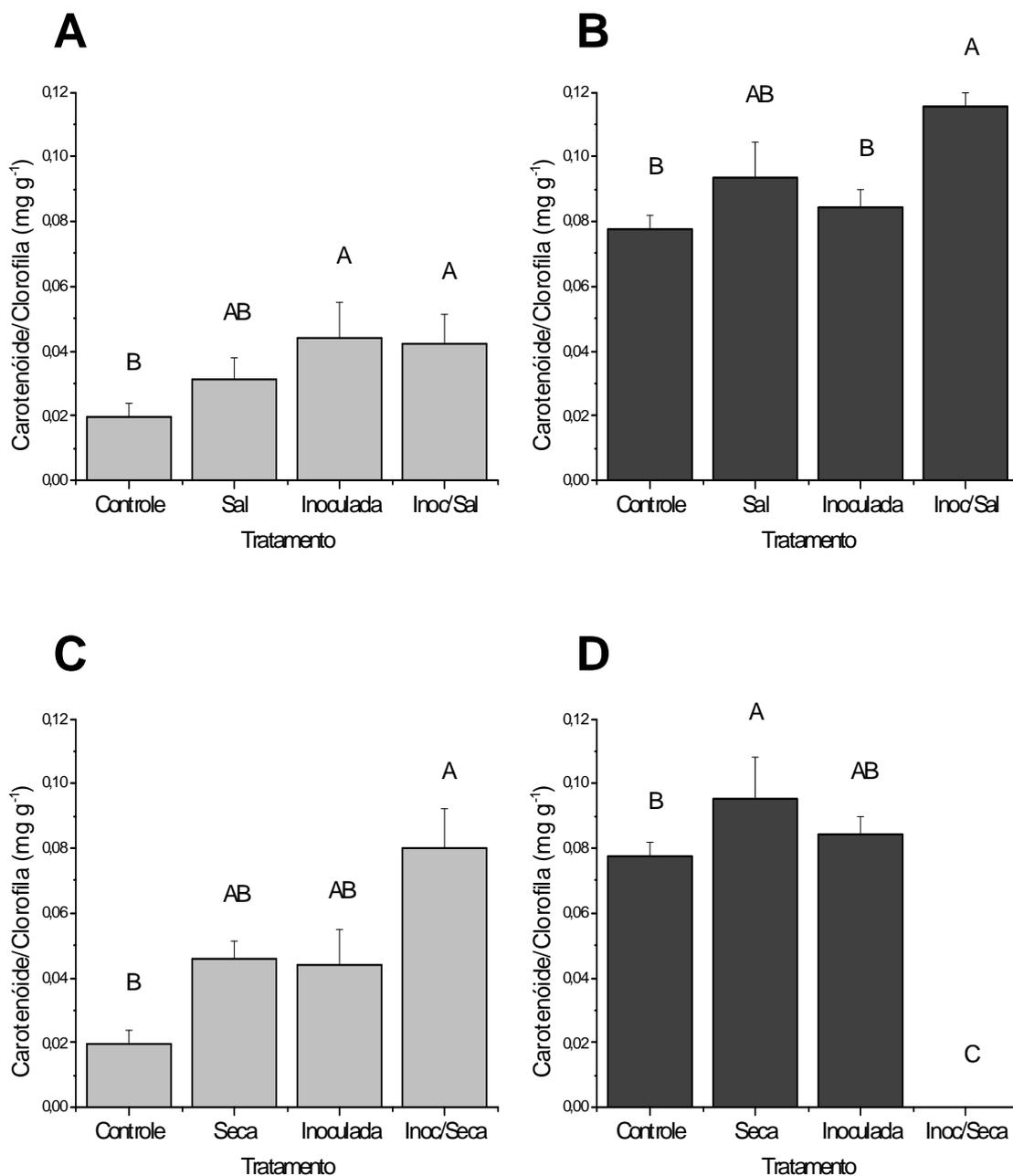


Figura 17 - Efeito dos estresses salino e hídrico sobre a razão carotenoide/clorofila de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. As plantas foram submetidas aos diferentes estresses, durante 15 (figuras A e C) e 30 dias (figuras B e D). As barras representam o erro-padrão da média. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (n=5).

3.1.5.6. Alterações nos níveis de peroxidação lipídica em plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *G. diazotrophicus* e submetidas à salinidade e desidratação

De acordo com a figura 18A, em folhas, todos os tratamentos apresentaram níveis similares aos das plantas-controle, com 15 e 30 dias. Resultados similares foram observados em raízes (figura 18B).

Com relação ao estresse hídrico, em folhas, a mesma observação foi verificada, aos 15 e 30 dias (figura 18C), com exceção somente das plantas inoculadas e expostas à seca (30 dias). Entretanto, resultados distintos foram verificados em raízes (figura 18D). Aos 15 dias, plantas inoculadas apresentaram uma maior concentração de espécies reativas a TBARS, quando expostas à desidratação. Tal observação não foi verificada nos demais tratamentos, em que plantas não-inoculadas, submetidas ao estresse hídrico, e plantas inoculadas não expostas à desidratação apresentaram níveis equivalentes à condição das plantas-controle. Aos 30 dias, as plantas submetidas ao estresse hídrico apresentaram aumento dos níveis de peroxidação lipídica.

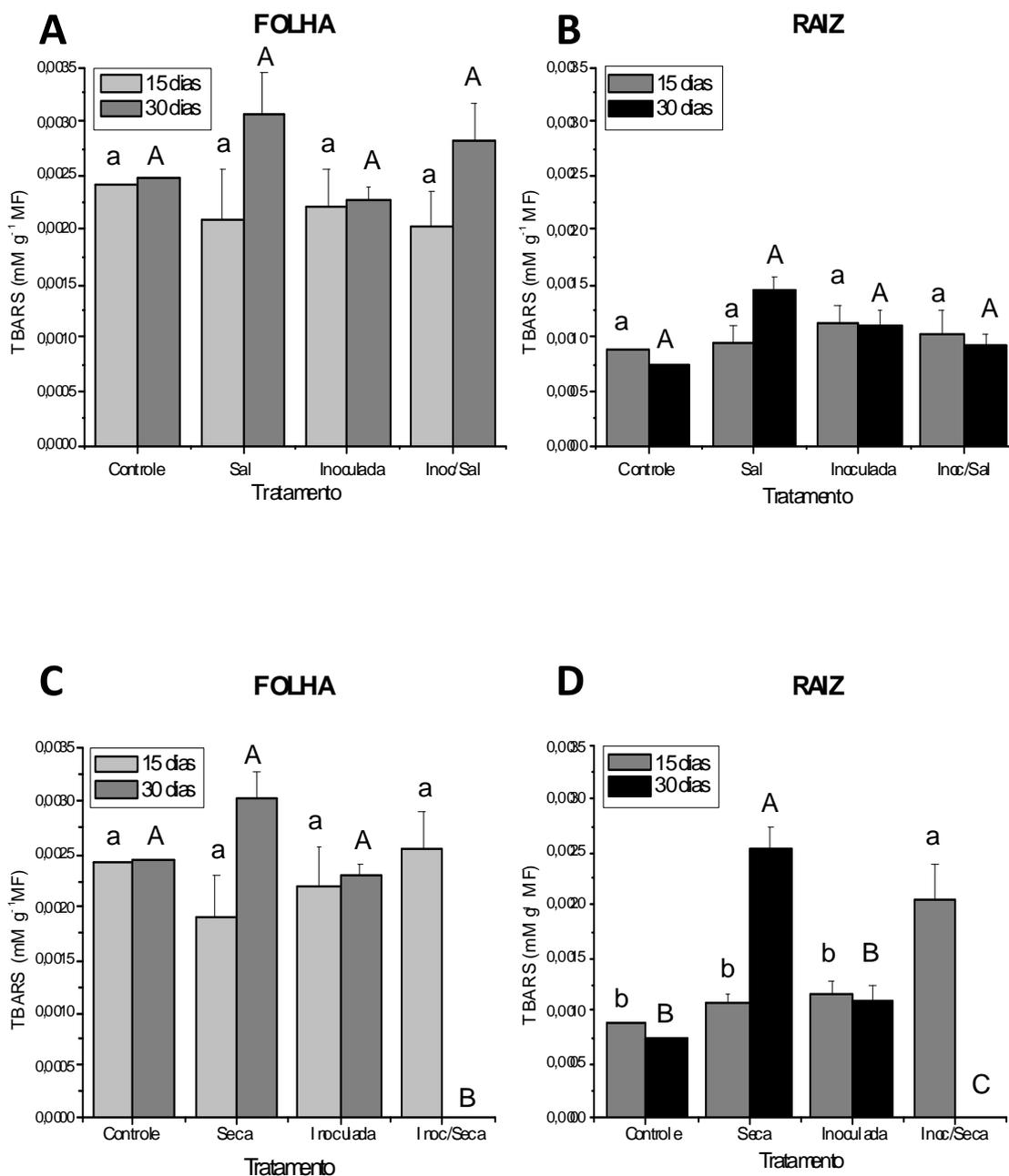


Figura 18 - Alterações nos níveis de peroxidação lipídica de folhas (figuras A e C) e raízes (figuras B e D) de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. As plantas foram submetidas aos diferentes estresses, durante 15 e 30 dias. As barras representam o erro-padrão da média. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (n=5).

3.1.5.7. Resposta antioxidante em plantas de cana-de-açúcar inoculadas e expostas aos estresses salino e hídrico

Observa-se, na figura 19A, que a enzima ascorbato peroxidase apresentou uma maior atividade em resposta à inoculação. Tal observação também pode ser visualizada em plantas inoculadas e submetidas à salinidade e seca, sendo esse acréscimo mais evidente em plantas salinizadas. Com relação à atividade enzimática em plantas não-inoculadas, resultados similares podem ser constatados em plantas expostas ao estresse hídrico e em plantas-controle. No entanto, a atividade da ascorbato é praticamente dobrada em plantas expostas ao sal.

Na análise de catalase, observa-se, na figura 19B, que os tratamentos impostos não alteraram a atividade da enzima. Todas as plantas apresentaram atividades similares.

Para guaiacol peroxidase (figura 19C), foi possível verificar que a inoculação possibilitou um pequeno incremento de sua atividade. Porém, plantas inoculadas e estressadas apresentaram valores ainda maiores que os de plantas estressadas, na ausência da bactéria. A maior atividade enzimática foi observada em plantas colonizadas e expostas à seca.

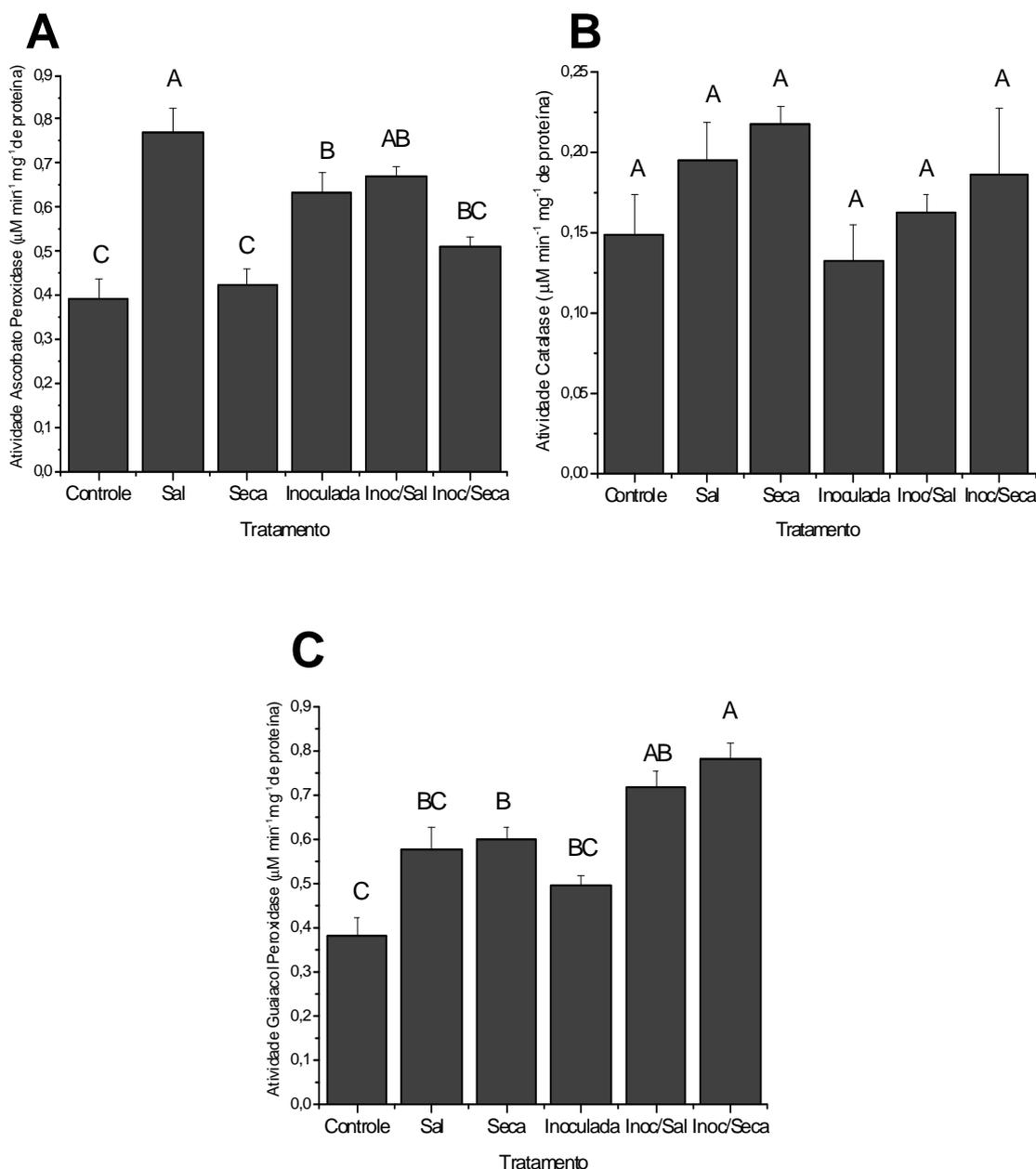


Figura 19 - Efeito dos estresses salino e hídrico sobre a atividade de enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidase – figura A, catalase – figura B e guaiacol peroxidase – figura C), em folhas de cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*. As plantas foram submetidas aos diferentes estresses, durante 15 dias. As barras representam o erro-padrão da média. Médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade (n=3).

3.1.6. DISCUSSÃO

Levando-se em consideração que *Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria endofítica de cana-de-açúcar, produtora de hormônios análogos aos de vegetais, decidiu-se testar a hipótese de que a presença de tal bactéria poderia ou não interferir na resposta aos estresses salino e hídrico, em plantas de cana-de-açúcar.

A salinidade e a desidratação induzem uma série de respostas fisiológicas, como forma de estabelecer a adaptação do vegetal à condição adversa. Dentre os parâmetros fisiológicos afetados, a atividade fotossintética apresenta alterações na eficiência das reações fotoquímicas, dos centros de reação, durante o estresse. Esses estresses ambientais que limitam a fotossíntese ocasionam também o aumento de espécies reativas de oxigênio, capazes de ocasionar danos oxidativos em uma grande quantidade de biomoléculas. Em resposta, as plantas ativam um sistema antioxidativo de defesa, a fim de minimizar o estresse oxidativo causado pelos estresses hídrico e salino. Nesse contexto, plantas de cana-de-açúcar, inoculadas com o endófito, foram submetidas à salinidade e à desidratação por um período de 15 e 30 dias. Após esse período, foram realizadas análises quanto à eficiência fotoquímica (F_v/F_m , qP e qNP), teor de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides), níveis de peroxidação de lipídeos e atividade de enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidase, catalase e guaiacol peroxidase).

Tipicamente, a perda ou diminuição no rendimento quântico da fotoquímica do PSII (F_v/F_m) é um indicador confiável do estresse abiótico, bem como da fotoinibição (Schreiber *et al.*, 1998; Bolhàr-Nordenkampf e Öquist, 1993). A razão entre a fluorescência variável e a máxima (F_v/F_m) é amplamente empregada na interpretação dos sinais da emissão de fluorescência (Krause e Weiss, 1991), como uma medida da eficácia dos centros de reação na absorção de fótons. Como já mencionado, em condições normais, as plantas apresentam o valor da razão entre 0,75 e 0,85 (Butler e Kitajima, 1975).

Para a característica F_v/F_m (figura 9), plantas submetidas ao sal e à seca, na presença do endófito, apresentaram decréscimo da razão, indicando uma menor eficiência fotoquímica como consequência do estresse+inoculação. Os resultados obtidos mostraram que os estresses salino e hídrico foram mais

prejudiciais em plantas inoculadas, sendo o estresse hídrico ainda mais severo em plantas colonizadas. Isso indica que a presença da bactéria, possivelmente, reduziu a eficiência fotoquímica do PSII. Apesar da verificação do decréscimo de F_v/F_m , todos os valores de razão observados ainda permaneceram dentro do valor desejado para essa característica (0,75 – 0,85).

Embora a razão F_v/F_m seja o parâmetro de fluorescência mais utilizado, outras variáveis são também empregadas na avaliação de efeitos ambientais. Uma dessas opções é a análise do *quenching*. Quando uma molécula de pigmento absorve energia luminosa e torna-se excitada, existem várias formas de essa molécula retornar ao seu estado basal. A transferência de elétrons é uma delas (Takahashi *et al.*, 2009). Essa dissipação de energia é conhecida como *quenching* fotoquímico (qP). Porém, quando a energia luminosa incidente excede a capacidade de absorção, esse estado excitado pode dissipar essa energia por rotas não desejáveis. O mecanismo de proteção contra esse iminente dano ao sistema é denominado *quenching* não-fotoquímico (qNP) (Merchant e Sawaya, 2005). Nesse contexto, foram feitas análises de qP (figura 10) e qNP (figura 11).

Para a variável qP, foi possível verificar, aos 15 dias, que a inoculação proporcionou um aumento em plantas de cana-de-açúcar inoculadas, sendo esse aumento ainda maior na presença dos estresses hídrico e salino. No entanto, com relação aos 30 dias de tratamento, somente plantas submetidas à seca apresentaram decréscimo. Tal resultado sugere que o aumento de qP ocorre nos primeiros dias de colonização, sendo estabilizado com o passar do tempo. Valores de qP, quanto mais próximos a 1,00, indicam um estado de baixa energia, onde Q_A se mantém oxidada. Os valores de qP, aos 15 dias, foram transientes, não sendo mantidos ao longo do tratamento (30 dias). Isso indica que essa variação inicial se deve a um possível processo de aclimação, devido ao estresse e à inoculação.

Com relação à variável qNP, seu aumento durante a interação planta-patógeno já é bem caracterizado (Berger *et al.*, 2007; Chaerle *et al.*, 2004; Meyer *et al.*, 2001). Porém, tais estudos em planta-endófito ainda não foram elucidados. De acordo com os resultados para *quenching* não-fotoquímico (figura 11), aos 15 dias de tratamento, verificou-se que os estresses salino e hídrico acarretaram redução dos valores de qNP, o que não foi observado em plantas inoculadas e estressadas. O resultado obtido sugere que a colonização por *G. diazotrophicus*

interferiu na resposta de qNP , impedindo seu decréscimo. No entanto, no 30º dia, observou-se que, em plantas inoculadas, o estresse salino acarretou um forte aumento da variável analisada. Tal resultado indica que a presença da bactéria endofítica possibilitou um possível aumento da dissipação termal no aparelho fotossintético. Adicionalmente, o alto valor de qNP , encontrado nas plantas inoculadas e salinizadas, sugere também uma alteração da atividade dos transportadores de elétrons ou uma diminuição do consumo de NADPH (Maxwell and Jonhson, 2000). Todas essas consequências, caracterizadas por aumentos e reduções das variáveis de fluorescência, sugerem uma maior susceptibilidade das plantas colonizadas e expostas aos estresses hídrico e salino.

Em estudos de patogênese, é verificado o desenvolvimento de áreas cloróticas nas folhas infectadas. Essa observação não é visualizada na interação planta-endófito, porém, a literatura é incipiente para caracterização dessa variável em plantas inoculadas e submetidas a estresses. Nesse sentido, visando estudar o efeito da colonização por *G. diazotrophicus*, sobre teores de pigmentos de plantas estressadas e para um melhor entendimento dos resultados das variáveis de fluorescência (Fv/Fm , qP e qNP), avaliou-se o teor de pigmentos fotossintéticos. Foram analisados os teores de clorofila total, clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, bem como as razões clorofila *a/b* e carotenoides/clorofila.

As análises acerca do teor de pigmento são indicadores potenciais de estresses abióticos, servindo como diagnóstico. Segundo Gabrielsen (1948), os teores de pigmento influenciam as taxas fotossintéticas se estiverem abaixo da concentração ótima para este processo.

Com relação aos teores de clorofila *a* (figura 13), a colonização pelo endófito não foi capaz de alterar a concentração do pigmento.

Os resultados obtidos para clorofila *b* (figura 14) sugerem que a colonização acarreta redução no teor desse pigmento em plantas colonizadas e salinizadas. Adicionalmente, observou-se que plantas não-inoculadas expostas ao estresse hídrico também apresentaram forte decréscimo. Tais dados sugerem que a presença da bactéria endofítica aumenta a degradação de clorofila *b* durante o estresse.

A função dos carotenoides também é relatada em resposta a estresses ambientais. Os carotenoides são componentes essenciais do aparelho fotossintético, estando envolvidos na captação da energia luminosa, estabilização

da membrana tilacoide (Havaux, 1998) e na proteção do aparelho fotossintético contra o dano causado pelo oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Dessa forma, os carotenoides podem reduzir indiretamente a ação de espécies reativas de $^1\text{O}_2$ (Foyer e Harbinson, 1994), servindo, assim, como substrato e impedindo a peroxidação de lipídios.

A análise dos teores de carotenoides (figura 15) revelou que, aos 15 dias, a inoculação proporcionou um aumento no teor do pigmento analisado. Os dados obtidos, para carotenoides, indicam que a presença da bactéria *G. diazotrophicus* influencia a síntese de carotenoides, nos primeiros 15 dias de interação, aumentando sua produção. Adicionalmente, plantas inoculadas e expostas à salinidade e seca apresentaram o maior teor de carotenoides entre os tratamentos, sugerindo um possível aumento na concentração do pigmento acarretado pela bactéria endofítica.

Špundová e colaboradores, em 2003, sugeriram que a razão clorofila *a/b* indica a degradação relativa de pigmentos, bem como a estabilidade relativa dos centros de reação e do complexo pigmento-proteína coletor de luz (LHC). Sendo assim, a análise da razão clorofila *a/b* permitiu verificar que plantas inoculadas e desidratadas, aos 15 dias, e plantas inoculadas e expostas à salinidade, aos 30 dias, apresentaram maior acréscimo da razão clorofila *a/b*, indicando que a bactéria, indiretamente, influencia a degradação relativa de pigmentos, corroborando os resultados observados para clorofila *b*, e evidenciando a maior susceptibilidade de plantas inoculadas aos estresses impostos. De acordo com Walters (2005), mudanças na razão clorofila *a/b* podem ser consideradas como uma adaptação ao estresse. Um aumento da razão favorece um incremento de unidades do PSII como uma forma de aumentar a eficiência na conversão de energia.

Visando verificar a proporção de carotenoides em relação aos teores de clorofila, foi analisada a razão carotenoides/clorofila (figura 17). Aos 15 dias, todos os tratamentos apresentaram aumento na razão se comparado ao das plantas-controle, sendo que plantas submetidas à seca e colonizadas pela bactéria apresentaram forte aumento da razão. Resultados similares foram obtidos em plantas inoculadas e expostas à salinidade, aos 30 dias, quando foi observado o maior valor entre os tratamentos. Porém, plantas inoculadas (30 dias) apresentaram valor da razão equivalente ao das plantas-controle.

De acordo com Hendry *et al.* (1987), a perda de pigmentos é um indicador significativamente visível em plantas submetidas a estresses ambientais. As mudanças nos teores de clorofilas e carotenoides são indicadores potenciais dos estresses oxidativos. Além disso, a razão entre clorofila *a* e *b*, bem como a razão entre carotenoides e clorofilas pode ser utilizada como um indicador de resposta ao estresse, servindo como diagnóstico.

Uma outra alteração bioquímica que ocorre em plantas sujeitas a estresses é a peroxidação de lipídeos. Essa decomposição dos ácidos graxos poli-insaturados de biomembranas é resultante da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Mittler, 2002). Pela quantificação dos teores de TBARS (figura 18), verificou-se que folhas de plantas inoculadas apresentaram níveis similares aos das plantas-controle, com 15 e 30 dias de tratamento. Resultados semelhantes foram verificados em raízes.

Os dados obtidos para peroxidação lipídica sugerem que, nas condições utilizadas neste ensaio, a presença da bactéria não modifica a resposta oxidante em folhas e raízes de plantas submetidas à salinidade e à desidratação.

A geração de ROS também tem sido relatada como mecanismo de defesa inicial, durante o estresse biótico induzido por patógenos (Apel e Hirt, 2004).

Levando-se em consideração que a bactéria *G. diazotrophicus* é um endófito que realiza a interação com a cana-de-açúcar sem causar sintoma de doença (James *et al.*, 1994), é possível supor que a não alteração de espécies reativas em plantas inoculadas seja parte de um mecanismo da bactéria envolvido no estabelecimento da interação e, portanto, a não ativação do sistema de defesa da planta colonizada acarreta uma melhor interação planta-endófito. Porém, em raízes, é interessante ressaltar que plantas submetidas ao estresse hídrico, na presença da bactéria, sofreram um efeito aditivo, apresentando um maior nível de peroxidação e conseqüentemente, uma maior concentração de ROS.

Para prevenir ou aliviar os danos causados por ROS, as plantas desenvolveram um complexo sistema antioxidante que inclui a enzimas, como a catalase (CAT), a ascorbato peroxidase (APX) e a guaiacol peroxidase (GPX) (Netto, 2001; Mittler, 2002; Cavalcanti *et al.*, 2004).

Nesse sentido, decidiu-se analisar a resposta antioxidante em folhas de plantas de cana-de-açúcar, colonizadas por *G. diazotrophicus* e submetidas à salinidade e à desidratação (15 dias). As atividades dessas três enzimas, que

compõem o sistema de defesa ao estresse oxidativo, foram avaliadas (figura 19): CAT (catalase), APX (ascorbato peroxidase) e GPX (guaiacol peroxidase).

A enzima ascorbato peroxidase apresentou uma maior atividade em resposta à inoculação. Tal observação pode ser visualizada em folhas de plantas inoculadas e submetidas à salinidade e desidratação, sendo esse acréscimo mais evidente em resposta ao sal. Com relação à atividade enzimática em plantas não-inoculadas, e plantas expostas à seca, essas apresentaram resultados similares. No entanto, a atividade da ascorbato é, praticamente, o dobro em plantas não-inoculadas e expostas ao sal.

Ascorbato peroxidases são enzimas com função geral similar a das catalases. No entanto, elas realizam a remoção do H_2O_2 , usando o ascorbato como agente redutor (Shigeoka *et al.*, 2002; Van Breusegem *et al.*, 2001). A APX, por ser predominantemente citosólica e organelar (Foyer e Noctor, 2000), tem maior participação na eliminação do H_2O_2 produzido pela enzima superóxido dismutase. A presença de H_2O_2 é um sinal sistêmico para a indução de APX (Karpinski *et al.* 1999). Como verificado, a ativação de peroxidases é descrita em resposta a estresses (Lee *et al.*, 2001; Quiroga *et al.*, 2000), demonstrando seu importante papel em plantas sob condições adversas. Inversamente à CAT, as peroxidases são significativamente induzidas nessas condições (Mhadhbi *et al.*, 2004). Tal informação corrobora os dados observados, em que a atividade de CAT não apresentou alterações em resposta aos tratamentos.

A CAT é encontrada no citoplasma, mitocôndrias e peroxissomos de células animais, vegetais e microorganismos aeróbicos (Scandalios, 1990). Catalases vegetais estão envolvidas em funções fotorrespiratórias (Canvin, 1990), retirada de H_2O_2 durante a β -oxidação de ácidos graxos e germinação de sementes (Willekens *et al.*, 1995).

Para guaiacol peroxidase, foi possível verificar que a inoculação também possibilitou o incremento de sua atividade, similar à da APX. Porém, plantas inoculadas e estressadas apresentaram valores ainda maiores que em plantas estressadas, na ausência da bactéria. A maior atividade enzimática foi observada em plantas colonizadas e expostas à seca.

A GPX está associada com os processos bioquímicos e fisiológicos de crescimento, formação celular, desenvolvimento de frutos, biossíntese de etileno e com a resposta a vários estresses (Matamoros *et al.*, 2003; Jebara *et al.*, 2005).

A GPX atua, eficientemente, na remoção do H₂O₂ acumulado na célula pela atividade da SOD.

Os dados obtidos, neste trabalho, demonstraram que a colonização pela bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* interferiu na resposta aos estresses salino e hídrico. Os parâmetros avaliados sugerem que plantas inoculadas são mais susceptíveis à desidratação. De acordo com Barbosa (2008), plantas de cana-de-açúcar, na presença da bactéria *G. diazotrophicus*, apresentam alterações nos parâmetros de trocas gasosas durante o estresse salino. Foi observado que a condutância estomática não foi afetada pela salinidade, em plantas inoculadas. Tal resultado sugere uma inibição do fechamento estomático em plantas expostas à salinidade, promovida pelo endófito. Os resultados encontrados por Barbosa (2008) corroboram a maior susceptibilidade à seca observada em plantas inoculadas. Uma hipótese para explicar tal observação, seria a de que a bactéria *G. diazotrophicus* seria capaz de interferir no fechamento estomático, afetando os mecanismos de controle de perda de água e, conseqüentemente, elevando os danos provocados por seca e salinidade.

3.1.7. CONCLUSÕES

- De acordo com as condições em que foi realizado este trabalho, confirmou-se que plantas colonizadas por *G. diazotrophicus* apresentam maior susceptibilidade aos estresses salino e hídrico. Essa sensibilidade foi mais proeminente em resposta ao estresse hídrico, em que foi verificada a morte de todas as plantas aos 20 dias de tratamento.

3.1.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allakhverdiev S.I., Sakamoto A., Nichiyama Y., Inaba M., Murata N. (2000) Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiology* 123:1047-1056.
- Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 55, 373-399.
- Azevedo R.A., Alas R.M., Smith R.J., Lea P.J. (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104: 280-292.
- Barbosa R.R. (2008) Efeito da colonização por *Gluconacetobacter diazotrophicus* na resposta de plantas de cana-de-açúcar ao estresse salino. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) Campos dos Goytacazes/RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 68p.
- Barka E.A. (2001) Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. *Australian Journal Plant Physiology* 28: 785-791.
- Berger S., Benediktyova Z., Matous K., Bonfig K.B., Mueller M.J., Nedbal L., Roitsch T. (2007) Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 58: 797-806.
- Bolhàr-Nordenkamp H.R., Öquist G. (1993) Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Hall, D., Scurlock, J.M.O.; Bolhàr-Nordenkamp, H.R.; Leegood, C. R. C.; Long, S.P. (eds), Photosynthesis and production in a changing environment, Chapman and Hall, London, p. 193-206.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72: 255-260.
- Butler W.L., Kitajima M. (1975) A tripartite model for chloroplast fluorescence. In: Proceedings of the 3rd International congress on Photosynthesis. Editora M. Avron, Elsevier Amsterdam. p.13-24.

- Canvin D.T. (1990) Photorespiration and CO₂ concentrating mechanisms. *In* DT Dennis, DH Turpin, eds, *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK, p. 253-273.
- Cavalcanti F.R., Oliveira J.T.A., Martins-Miranda A.S., Viégas R.A., Silveira J.A.G. (2004) Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytologist* 163: 563-671.
- Chaerle L., Hagenbeek D., De Bruyne E., Valcke R., van der Straten D. (2004) Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant–pathogen interactions at an early stage. *Plant Cell Physiology* 45: 887-896.
- Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. 103: 551-560.
- Dhindsa R.S., Matowe W. (1981) Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 32:79-91.
- Foyer C.H., Harbinson J. (1994) Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. *In*: C. Foyer, P. Mullineaux, eds, *Causes of Photooxidative Stresses and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1-42.
- Foyer C.H., Noctor G. (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist* 146: 359-388.
- Gabrielsen E.K. (1948) Effects of different chlorophyll concentrations on photosynthesis in foliage leaves. *Physiologia Plantarum* 1:5-37.
- Havaux M., Ernez M., Lannoye R. (1988) Sélection de variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) adaptées à la sécheresse par la mesure de l'extinction de la fluorescence de la chlorophylle in vivo. *Agronomie* 8:193-199.
- Hendry G.A.F., Houghton J.D., Brown S.B. (1987) The degradation of chlorophyll – a biological enigma. *New Phytology* 107: 255-302.

- Herrmann H., Häder D.P., Ghetti F. (1997) Inhibition of photosynthesis by solar radiation in *Dunaliella salina*: relative efficiencies of UV-B, UV-A and PAR. *Plant, Cell and Environment* 20:359-365.
- Huner N.P.A., Öquist G., Sarhan F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* 3: 224-230.
- James E.K., Reis V.M., Olivares F.L., Baldani J.I., Döbereiner J. (1994) Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany* 45:757-766.
- Jebara S., Jebara M., Limam F., Aouani M.E. (2005) Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 162: 929-936.
- Karpinski S., Reynolds H., Karpinska B., Wingsle G., Creissen G., Mullineaux P. (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284:654-657.
- Krause G.H., Weis E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
- Lawlor D.W., Cornic G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 275-294.
- Lee S.P., Hwang Y.S., Kim Y.J., Kwon K.S., Kim H.J. (2001) Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *Journal Biological Chemistry* 276: 29826-29832.
- Matamoros M.A., Dalton D.A., Ramos J., Clemente M.R., Rubio M.C., Becana M. (2003) Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiology* 133: 499-509.
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51:659-668.

- Mayak S., Tirosh T., Glick B.R. (2004) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:565-572.
- Merchant S., Sawaya M.R. (2005) The light reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery. *Plant Cell* 17:648-663.
- Meyer S., Saccardy-Adji K., Rizza F., Genty B. (2001) Inhibition of photosynthesis by *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging. *Plant, Cell and Environment* 24: 947-955.
- Mhadhbi H., Jebara M., Limam F., Aouani M.E. (2004) Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 717-722
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:9 405-410.
- Netto A.T., Campostrini E., Oliveira J.G., Yamanishi O.K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14: 203-210.
- Quiroga M., Guerrero C., Botella M.A., Barcelo A., Amaya I., Medina M.I., Alonso F.J., de Forchetti S.M., Tigier H., Valpuesta V. (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* 122: 1119-1127.
- Rodrigues Neto J., Malavolta Jr. V.A., Victor O. (1986) Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, 12(1-2):16.
- Scandalios J.G. (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in Genetics* 28: 1-41.
- Schreiber U., Bilger W., Hormann H., Neubauer C. (1998) Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: *Photosynthesis - a Comprehensive Treatise*, editora Raghavendra AS, Cambridge University Press, Cambridge, p.320-336

- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Youshimura K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal Experimental Botany* 53: 1305-1319.
- Takahashi S., Milward S.E., Fan D-Y., Chow W.S., Badger M.R. (2009) How Does Cyclic Electron Flow Alleviate Photoinhibition in Arabidopsis? *Plant Physiology* 149:1560-1567.
- Van Breusegem F.V., Vranova E., Dat J.F., Inzé D. (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161: 405-414.
- Walters R.G. (2005) Towards and understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany* 56: 435-447.
- Wellburn A.R. (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144:307-313.
- Willekens H., Van Camp W., Van Montagu M., Inzé D., Langebartels C., Sandermann H. (1995) Ozone, sulfur dioxide and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiology* 106:1007-1014.
- Zhang J.X., Kirkham M.B. (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiology*. 35:785-791.

3.2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS GENES SnRK E COI1, ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO ESTOMÁTICA EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR COLONIZADAS POR *Gluconacetobacter diazotrophicus*

3.2.1. RESUMO

Com base em estudos já realizados, pode-se verificar que plantas possuem um sistema de percepção e resposta a microorganismos. Esse mecanismo de defesa acarreta alterações fisiológicas iniciadas por sinais externos, resultando em uma cascata de sinalização, que irão modular a ativação ou repressão de genes. De acordo com os resultados obtidos no capítulo anterior, plantas de cana-de-açúcar respondem à interação com a bactéria endofítica *G. diazotrophicus*, resultando numa possível alteração dos mecanismos de controle de perda de água. Essa alteração pode ser proveniente da interferência da bactéria nas vias de sinalização do hormônio ácido abscísico, que controla o fechamento estomático. Os resultados encontrados, neste trabalho, indicaram a participação da quinase SnRK2.4 (SAPK6) e da proteína COI1, sugerindo, respectivamente, o envolvimento dessas proteínas nos mecanismos de sinalização de ABA e de defesa vegetal, desencadeados pela colonização por *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

3.2.2. ABSTRACT

Based on previous studies, we verified that plants have a system of perception and response to microorganisms. This defense mechanism causes physiological changes initiated by external signals, resulting in a signaling cascade that will modulate the activation or repression of genes. According to the results obtained in the previous chapter, sugarcane plants respond to interaction with the endophytic bacterium *G. diazotrophicus*, resulting in a possible alteration of the mechanisms of control of water loss. This change may be coming from the interference of bacteria in the signaling pathways of the hormone abscisic acid, which controls stomatal closure. The results found in this work indicated the involvement of SnRK2.4 (SAPK6) kinase and COI1 protein, suggesting, respectively, the involvement of these proteins in the mechanisms of ABA signaling and plant defense, triggered by colonization by *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

3.2.3. INTRODUÇÃO

Embora a associação planta-endófito seja vantajosa para ambos os organismos, acredita-se que as plantas de cana-de-açúcar reconhecem a bactéria endofítica e ativam uma resposta de defesa (Vinagre *et al.*, 2006). Essa percepção e resposta são pertencentes a uma via de sinalização celular, que envolve a ativação de proteínas, quinases, fosfatases, mensageiros secundários como o Ca^{2+} , resultando, conseqüentemente, na regulação gênica (Kobayashi *et al.*, 2004).

Os resultados encontrados no primeiro trabalho permitiram a especulação de que a bactéria endofítica *G. diazotrophicus* poderia estar interferindo nas vias de sinalização de ABA, ocasionando, dessa forma, alterações nos mecanismos de regulação estomática. Como consequência, um efeito mais drástico, durante o estresse hídrico, pôde ser observado.

Melotto *et al.* (2008) verificaram que os estômatos participam de forma ativa na resposta de defesa, pela ativação de sinais intermediários, como a quinase específica de células-guarda OST1 *open stomata 1* (SnRK2.6), e de alterações e oscilações nos níveis de Ca^{2+} citosólico (Fan *et al.*, 2004; Mustilli *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2001). Adicionalmente, Melotto *et al.* (2006) demonstraram também a participação da proteína COI1 no movimento estomático, durante a infecção. COI1 é uma proteína insensível ao efeito de coronatina, um composto análogo ao metil-jasmonato, de bactérias.

Atualmente, uma forma fácil e rápida de entender a ativação do sistema de resposta vegetal, bem como as vias de sinalização, é pelo uso de análise de expressão gênica *in silico*. A disponibilidade dos bancos de dados e a utilização de ferramentas para análise *in silico* possibilitaram a caracterização funcional de diversos genes. Assim, com base no banco SUCEST e pelo uso de análises via bioinformática, genes de proteínas poderiam ser identificados e sua função sugerida, baseando-se em sua expressão nas bibliotecas, e de acordo com a função em diferentes espécies.

Em 2000, o projeto genoma da cana-de-açúcar (SUCEST), financiado pela FAPESP, foi iniciado por pesquisadores do Estado de São Paulo, o que proporcionou um grande impulso nas pesquisas com cana-de-açúcar. O SUCEST gerou 37 bibliotecas de cDNA, sendo sequenciados 237.954 ESTs. Dentre as bibliotecas, encontra-se a biblioteca AD1, obtida de plantas inoculadas com a bactéria endofítica *G. diazotrophicus*.

Como citado anteriormente, os estômatos participam ativamente da resposta de defesa, durante a infecção por microorganismos (Melotto *et al.*, 2008). Genes de proteínas que participam dessa resposta poderiam ser analisados, visando a um melhor entendimento das vias de sinalização vegetal, durante a interação planta-endófito. Nesse contexto, este trabalho visou contribuir para identificação e caracterização, pelo uso de análises *in silico*, dos transcritos SnRK e COI1, de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *G. diazotrophicus*.

3.2.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.4.1. Identificação, alinhamento e análise filogenética das sequências gênicas CDPK-SnRK e COI1

Sequências de proteínas CDPK-SnRK e COI1 foram identificadas nos bancos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Phytozome (<http://phytozome.net>), e utilizadas para posterior busca no banco SUCEST (<http://sucest.lad.ic.unicamp.br/en/>). Os *clusters* encontrados no SUCEST foram alinhados no banco NCBI, utilizando-se as ferramentas blastx e tblastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Após a confirmação, as sequências de nucleotídeos foram convertidas em aminoácidos (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>) e alinhadas no programa CLC Protein Workbench 5.1 (<http://www.clcbio.com>), para visualizar a conservação das mesmas.

Para a realização da análise filogenética, os alinhamentos foram obtidos pela utilização do programa ClustalW2 (<http://ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>). O resultado do alinhamento no ClustalW2, em formato PHYLIP, foi submetido ao *software* PHYLM (<http://www.atgc-montpellier.fr/phylm>). Esse *software* gera árvores filogenéticas pelo método *maximum likelihood* (Guindon *et al.*, 2003). O resultado obtido, no PHYLM em formato Newick, foi utilizado no programa TreeView 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>) para a construção e visualização da árvore filogenética.

3.2.4.2. Northern eletrônico dos genes SnRK e COI1 via banco SUCEST

As frequências dos *reads* de cada *cluster*, referentes à classe SnRK e às proteínas COI1, foram analisadas no programa Proteínas *on line*, desenvolvido pela Doutoranda Verônica Aguiar. O *cluster* analisado, contendo seus *reads*, foi obtido do banco SUCEST e salvo em arquivos txt (bloco de notas). O programa Proteínas *on line* faz a leitura do arquivo txt, avaliando a frequência da biblioteca (tabela 4) presente em cada *read*. Posteriormente, foi gerado um gráfico correspondente à frequência desses transcritos.

Tabela 4 - Bibliotecas de cDNA de cana-de-açúcar do banco SUCEST, indicando o tecido/condição das mesmas

CÓDIGO DAS BIBLIOTECAS DO SUCEST	DESCRIÇÃO DA BIBLIOTECA	NÚMERO DE 'READS'
AD1	Plantas <i>in vitro</i> inoculadas com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> (var. SP701143)	18137
AM1	Meristema apical de folhas jovens e caules de canas maduras (var. SP803280)	12480
AM2	Meristema apical de folhas jovens e caules e canas maduras (var. SP803280)	15648
CL6	Calos submetidos a estresse luz (escuro) e estresse por temperatura 4°C e 37°C	7392
FL1	Flor de cana com base medindo 1 cm de comprimento (var. SP8087432)	18523
FL3	Flor de cana com base medindo 5 cm de comprimento (var. PB5211, PB57150-4)	13056
FL4	Pedúnculo floral com 50 cm de comprimento (var. PB5211, PB57150-4)	16885
FL5	Pedúnculo floral com 20 cm de comprimento (var. PB5211, PB57150-4)	10080
FL8	Pedúnculo floral com 10 cm de comprimento (var. PB5211, PB57150-4)	5167
HR1	Plantas <i>in vitro</i> inoculadas com <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> (var. SP701143)	12000
LB1	Broto lateral de plantas de cana (var. SP803280)	7488
LB2	Broto lateral de plantas de cana adultas	10559
LR1	Cartucho foliar de plantas de cana-de-açúcar (var. SP803280)	14036
LV1	Folhas estioladas de plântulas (SP83-5077, SP80-185, SP87-396, SP80-3280 e SP803280 X SP81-5441)	6432
RT1	Raízes de cana-de-açúcar crescidas no solo (var. SP803280)	8640
RT2	Raízes de cana-de-açúcar crescidas no solo (var. SP803280)	12288
RT3	Raízes de plantas adultas de cana-de-açúcar crescidas no solo	10559
RZ2	Zona de transição entre raiz/folha de plantas de cana (var. SP803280)	5760
RZ3	Zona de transição entre raiz/folha de plantas de cana imaturas (var. SP803280)	15168
SB1	Cascas de plantas de cana crescidas em casa de vegetação (var. SP803280)	16318
SD1	Sementes de cana-de-açúcar em diferentes estágios de desenvolvimento (var. RB805028)	11040
SD2	Sementes de cana-de-açúcar em diferentes estágios de desenvolvimento (var. RB805028)	10366
ST1	Primeiro interno de plantas de cana-de-açúcar (var. SP803280)	8448
ST3	Quarto interno de plantas de cana-de-açúcar (var. SP803280)	11930

Para comparar a frequência da biblioteca no *cluster*, o programa faz a normalização dos números de *reads*, da seguinte forma:

- Calcula o fator tecido-específico

Fator tecido-específico = [Número de *reads* da maior biblioteca / número total de *reads* da biblioteca analisada]

- Calcula o fator da biblioteca

Fator da biblioteca = [Fator tecido-específico X número total de *reads* da biblioteca analisada].

- Calcula o número de clones

Número de clones = Soma dos fatores das bibliotecas que sejam similares (Ex: FL = soma do fator de FL1 a FL8).

Após a normalização, foi gerado um gráfico nos planos (x, y; x-expressão relativa, y-bibliotecas) que indica a expressão gênica relativa do *cluster* analisado.

3.2.4.3. Fotografia fluorescente eletrônica dos genes SnRK2.4 (SAPK6) e COI1

Os códigos de acesso (IDs) dos genes SnRK2.4 (SAPK6 em arroz) e COI1 de *Arabidopsis thaliana* foram obtidos no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), e utilizados para a geração da fotografia fluorescente eletrônica no site <http://www.bar.utoronto.ca>. O método solicita a ID do gene a ser analisado para gerar a fotografia. Posteriormente, é necessário indicar se a análise deve ser realizada na planta inteira (órgãos), em regiões de tecido-específico ou em resposta a algum estímulo, patógeno ou estresse. Os níveis de expressão indicados pela figura representam a expressão relativa dos genes analisados.

3.2.5. RESULTADOS

3.2.5.1. Identificação de sequências gênicas de proteínas quinase da superfamília CDPK-SnRK de cana-de-açúcar e filogenia das proteínas identificadas

Proteínas ortólogas CDPK-SnRK, em *Arabidopsis*, foram selecionadas no banco de dados NCBI. As sequências de aminoácidos das proteínas de *Arabidopsis* foram utilizadas para a realização do tblastn no banco SUCEST.

Ao todo, foram identificados 48 *clusters* de cana-de-açúcar, candidatos a quinases CDPK-SnRK. Após a identificação, a sequência *consensus* de cada *cluster* foi utilizada na realização de um tblastn no banco NCBI, para confirmação da ortologia. As similaridades encontradas, entre proteínas caracterizadas em

diferentes espécies, foram anotadas na tabela 5. Foram identificados 3 *clusters* da subclasse SnRK1, 15 *clusters* da subclasse SnRK2, 16 *clusters* da subclasse SnRK3, 12 *clusters* da classe CDPK e 2 *clusters* não caracterizados de serina-treonina quinase. Como pôde ser observado na tabela 5, alguns transcritos apresentam similaridade à da mesma proteína de referência em outra espécie, por exemplo, os *clusters* SCACLR2007G02.g, SCQGSB1083A03.g, SCRLSB1040B12.g, SCJFLR1074F04.g, SCCCLR1068F10.g e SCSGFL4031C01.g.

Adicionalmente, a análise filogenética das sequências de aminoácidos dos *clusters* identificados foi realizada (figura 20). Tal análise permitiu a visualização de quatro grupamentos, indicando a identificação da família SnRK, contendo suas três subclasses (SnRK1, SnRK2 e SnRK3), e da família CDPK.

Tabela 5 - Transcritos identificados em cana-de-açúcar que codificam proteínas quinase, indicando sua possível similaridade com outra espécie

Nº	Cluster (ID)	Proteína hipotética	e-value
14	SCFRZ2032G01.g	gb ACG33875.1 SNF1-related protein kinase catalytic alpha subunit KIN10 (<i>Zea mays</i>)	0.0
16	SOOCLR1070D11.g	dbj BAA36298.1 OSK1 / SnRK1a (<i>Oryza sativa</i>)	0.0
17	SOOCLR1040B05.g	gb ABQ18267.1 sucrose non-fermenting related protein kinase 1b / SnRK1b (<i>Sorghum bicolor</i>)	0.0
1	SOVCR12088D10.g	gb ACG32779.1 serine/threonine-protein kinase SAPK10 (<i>Zea mays</i>)	1E-74
2	SOEZR1013F09.g	ref NP_001149657.1 serine/threonine-protein kinase SAPK8 (<i>Zea mays</i>)	0.0
3	SOQGR1011E10.g	ref NP_001067155.1 serine/threonine-protein kinase SAPK9 (<i>Oryza sativa</i>)	4E-179
4	SOFLR2034A09.g	ref NP_001147649.1 serine/threonine-protein kinase SAPK1 (<i>Zea mays</i>)	0.0
5	SOFLR1034G06.g	ref NP_001149243.1 serine/threonine-protein kinase SAPK2 (<i>Zea mays</i>)	0.0
6	SOOCLB1003E11.g	gb AAP55046.1 serine/threonine-protein kinase SAPK3 (<i>Oryza sativa</i>)	3E-179
7	SOFRZ3044B07.g	ref NP_001149107.1 serine/threonine-protein kinase SAPK7 (<i>Zea mays</i>)	3E-175
8	SOOCSR1006B11.g	gb ACG33803.1 serine/threonine-protein kinase SAPK6 (<i>Zea mays</i>)	1E-63
9	SOOCSR1004A07.g	ref NP_001044930.1 serine/threonine-protein kinase SAPK4 (<i>Oryza sativa</i>)	3E-180
10	SOOCLR1068F10.g	gb ACG33803.1 serine/threonine-protein kinase SAPK6 (<i>Zea mays</i>)	9E-142
11	SOFLR1074F04.g	gb ACG42286.1 serine/threonine-protein kinase SAPK5 (<i>Zea mays</i>)	3E-133
12	SOCSFL4031C01.g	ref NP_001149107.1 serine/threonine-protein kinase SAPK7 (<i>Zea mays</i>)	3E-89
13	SOACLR2007G02.g	ref NP_001149243.1 serine/threonine-protein kinase SAPK2 (<i>Zea mays</i>)	5E-36
32	SOQGSB1083A03.g	gb ACG46236.1 serine/threonine-protein kinase SAPK4 (<i>Zea mays</i>)	4E-35
21	SOFLSB1040B12.g	ref NP_001044930.1 serine/threonine-protein kinase SAPK4 (<i>Oryza sativa</i>)	1E-61
15	SOOCLR1065B07.g	ref NP_001147857.1 CBL-interacting protein kinase / CIPK-like protein 1 (<i>Zea mays</i>)	0.0
18	SOJLR1023H04.g	gb ACQ83498.1 CBL-interacting protein kinase 21 (<i>Sorghum bicolor</i>)	0.0
19	SOEQRT2027H03.g	gb ACQ83489.1 CBL-interacting protein kinase 23 (<i>Sorghum bicolor</i>)	0.0
20	SOOCSR1001C10.g	gb ACQ83515.1 CBL-interacting protein kinase 08 (<i>Sorghum bicolor</i>)	0.0
22	SOEZLB1012C07.g	gb ACQ83491.1 CBL-interacting protein kinase 14 (<i>Sorghum bicolor</i>)	1E-174
23	SOOCLR1076F09.g	gb ACQ83494.1 CBL-interacting protein kinase 25 (<i>Sorghum bicolor</i>)	0.0
24	SOJTLR1037E04.g	gb ACQ83503.1 CBL-interacting protein kinase 03 (<i>Sorghum bicolor</i>)	0.0
25	SOACLR1036B06.g	gb ACQ83504.1 CBL-interacting protein kinase 22 (<i>Sorghum bicolor</i>)	0.0
26	SOFRZ2032C08.g	gb ACQ83506.1 CBL-interacting protein kinase 02 (<i>Sorghum bicolor</i>)	0.0
28	SOBFSB1046D04.g	gb ACQ83501.1 CBL-interacting protein kinase 31 (<i>Sorghum bicolor</i>)	2E-100
29	SOOCLR2001G07.g	gb ACQ83485.1 CBL-interacting protein kinase 04 (<i>Sorghum bicolor</i>)	0.0
30	SOJLRT1023G09.g	gb ACQ83493.1 CBL-interacting protein kinase 05 (<i>Sorghum bicolor</i>)	4E-120
31	SOCSFL4017G11.g	ref NP_001147716.1 CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (<i>Zea mays</i>)	9E-129
34	SOEPAM2012F04.g	gb ACQ83488.1 CBL-interacting protein kinase 09 (<i>Sorghum bicolor</i>)	8E-111
35	SOQGSB1065G03.g	gb ACQ83514.1 CBL-interacting protein kinase 24 (<i>Sorghum bicolor</i>)	9E-79
48	SOEQRT2094G10.g	gb ACQ83508.1 CBL-interacting protein kinase 01 (<i>Sorghum bicolor</i>)	5E-71
27	SOOCLR2003E06.g	gb ACG24528.1 serine/threonine-protein kinase 12 (<i>Zea mays</i>)	5E-158
38	SOVCLR1053D03.g	ref NP_001147964.1 serine/threonine-protein kinase AtPK19 (<i>Zea mays</i>)	0.0
33	SOEQRT2099H01.g	ref NP_001147084.1 calcium-dependent protein kinase, isoform AK1 (<i>Zea mays</i>)	0.0
36	SOEQRT1027E02.g	gb AAT75244.1 calcium-dependent protein kinase putative (<i>Oryza sativa</i>)	0.0
37	SOOCLR1004E07.g	ref NP_001105306.1 calcium-dependent protein kinase (<i>Zea mays</i>)	0.0
39	SOOCLB1003G07.g	ref NP_001149916.1 calcium-dependent protein kinase, isoform AK1 (<i>Zea mays</i>)	0.0
40	SOJLLR1011H04.g	ref NP_001105752.1 calcium-dependent protein kinase ZmCPK11 (<i>Zea mays</i>)	0.0
41	SOOQFZ1002A06.g	dbj BAD17519.1 calcium-dependent protein kinase - putative (<i>Oryza sativa</i>)	0.0
42	SOFRZ1009A12.g	ref NP_001152509.1 calcium-dependent protein kinase, isoform 2 (<i>Zea mays</i>)	0.0
43	SOJLLR1020G01.g	dbj BAC16472.1 calcium/calmodulin-dependent protein kinase CaMK putative (<i>Oryza sativa</i>)	0.0
44	SOCSGAM2075E08.g	ref NP_001151970.1 calcium-dependent protein kinase (<i>Zea mays</i>)	2E-163
45	SOOCLR1024H03.g	gb AAF23901.2 AF194414_1 calcium-dependent protein kinase (<i>Oryza sativa</i>)	0.0
46	SOOCLR1004F08.g	ref NP_001105307.1 calcium-dependent protein kinase (<i>Zea mays</i>)	0.0
47	SOFRZ1008C06.g	gb AAA33443.1 calcium-dependent protein kinase (<i>Zea mays</i>)	0.0

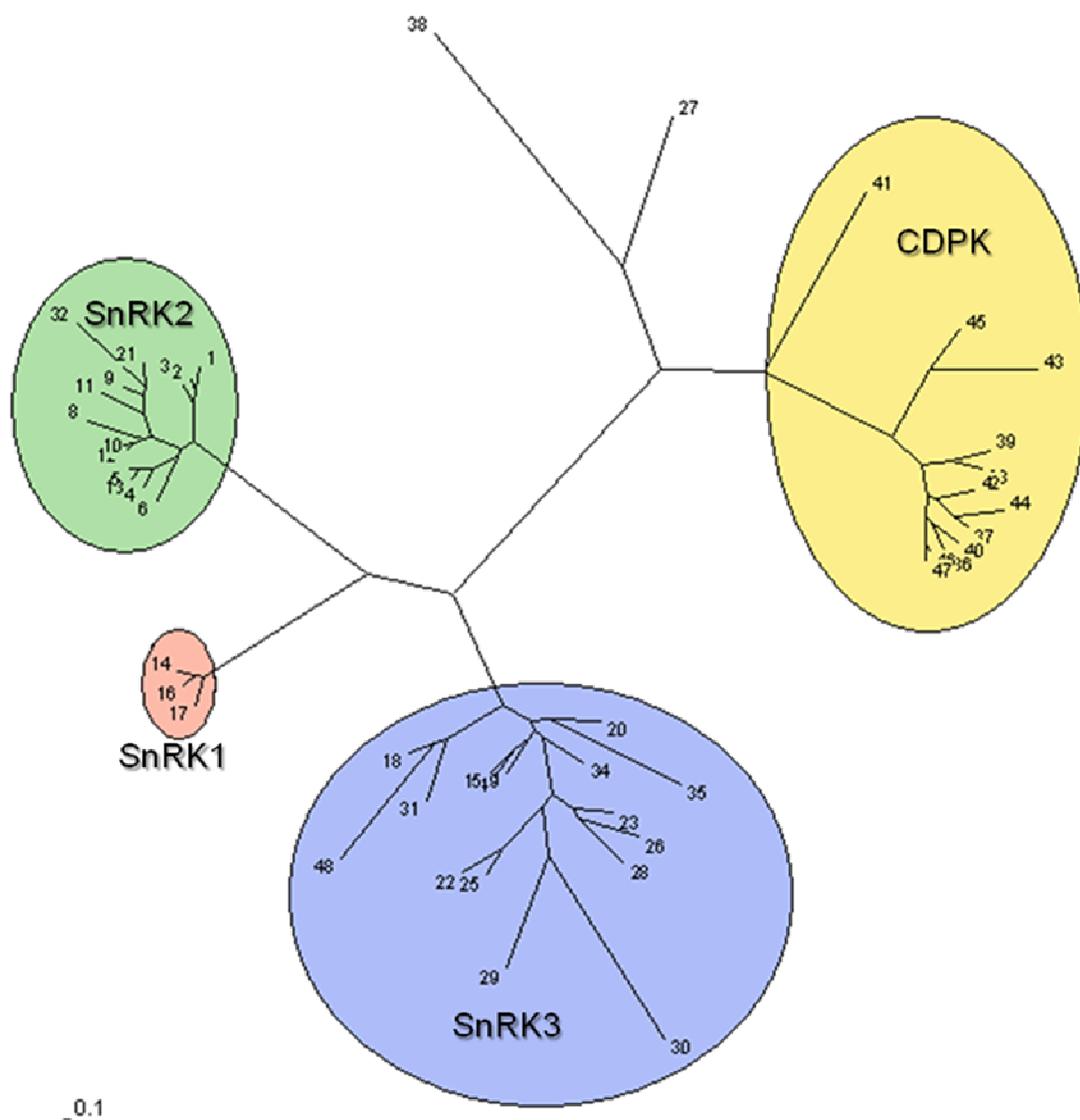


Figura 20 - Árvore filogenética da CDPK-SnRK, identificadas em cana-de-açúcar, pelo banco de dados do SUCEST. As seqüências dos *clusters* foram alinhadas no programa ClustalW. Os resultados do alinhamento, no formato "Phylip", foram submetidos ao programa "PHYML" para gerar a árvore. A escala é a distância de similaridade do agrupamento em questão.

3.2.5.2. Genes de quinases da classe SnRK2 são regulados na biblioteca de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus* (AD1)

Tem sido demonstrado que proteínas quinase da subclasse SnRK2 são ativadas por ácido abscísico e estão envolvidas na regulação estomática (Mustilli *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002). Nesse sentido, genes SnRK2 identificados em cana-de-açúcar tiveram sua expressão relativa analisada, em uma biblioteca de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *G. diazotrophicus*.

Conforme apresentado na tabela 5, foi realizada a análise *in silico* de 13 transcritos (*cluster*) de cana-de-açúcar que codificam quinases da classe SnRK2, visando à identificação de *clusters* regulados pela inoculação com a bactéria.

O *northern* eletrônico mostra que sete *clusters* se expressam na biblioteca AD1 (figura 21). Pode-se observar que o *cluster* SCCST1006B11.g apresentou a maior expressão entre os membros da subfamília SnRK2.

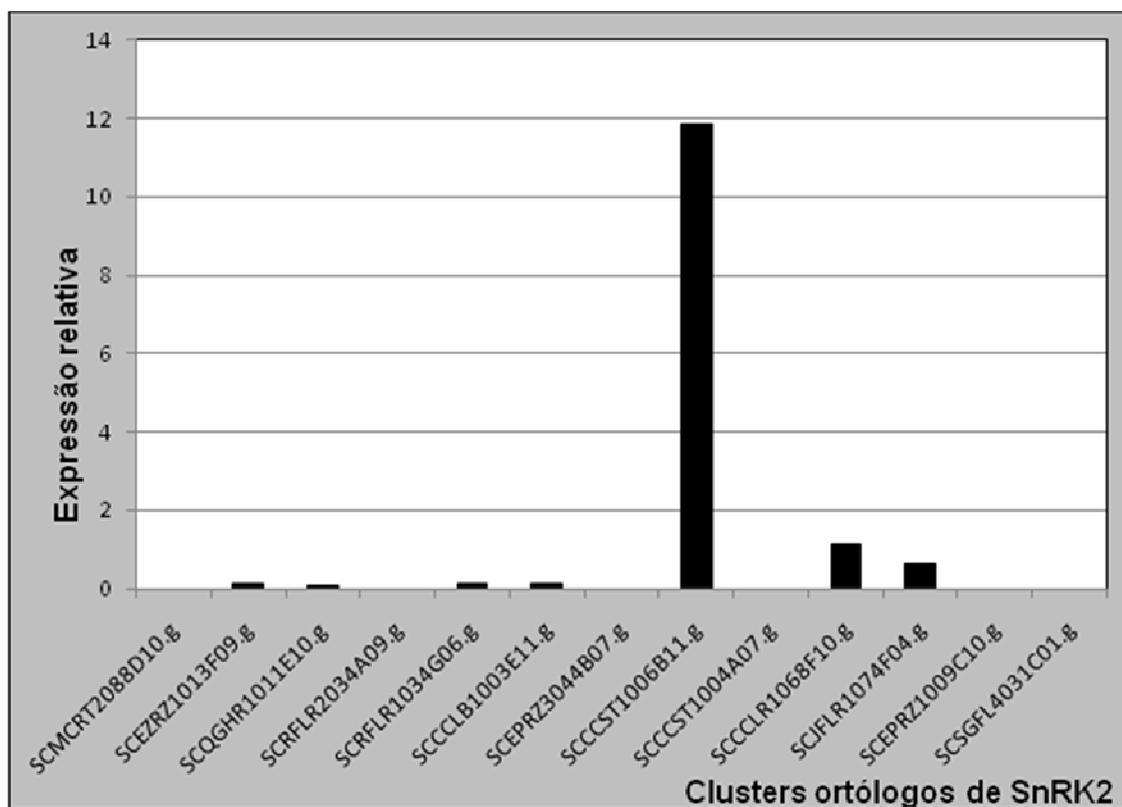


Figura 21 - *Northern* eletrônico dos *clusters*, que codificam proteínas da família SnRK2, em uma biblioteca de cDNA de plantas inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. O eixo Y indica a expressão relativa dos genes, o eixo X indica os nomes de cada *cluster*. A análise foi realizada por meio da utilização do banco de dados SUCEST.

Como as sequências de cana-de-açúcar foram selecionadas de um banco EST (cDNA), provenientes do sequenciamento de transcritos, as sequências de aminoácidos utilizadas são apenas parciais. Dessa forma, as sequências *consensus* dos *clusters* SnRK2 foram traduzidas para aminoácidos e utilizadas em um alinhamento, para verificar o nível de similaridade e conservação entre os diferentes *clusters*. O resultado parcial do alinhamento pode ser observado na figura 22, onde se verifica um alto grau de conservação dos aminoácidos entre os membros da família SnRK2.

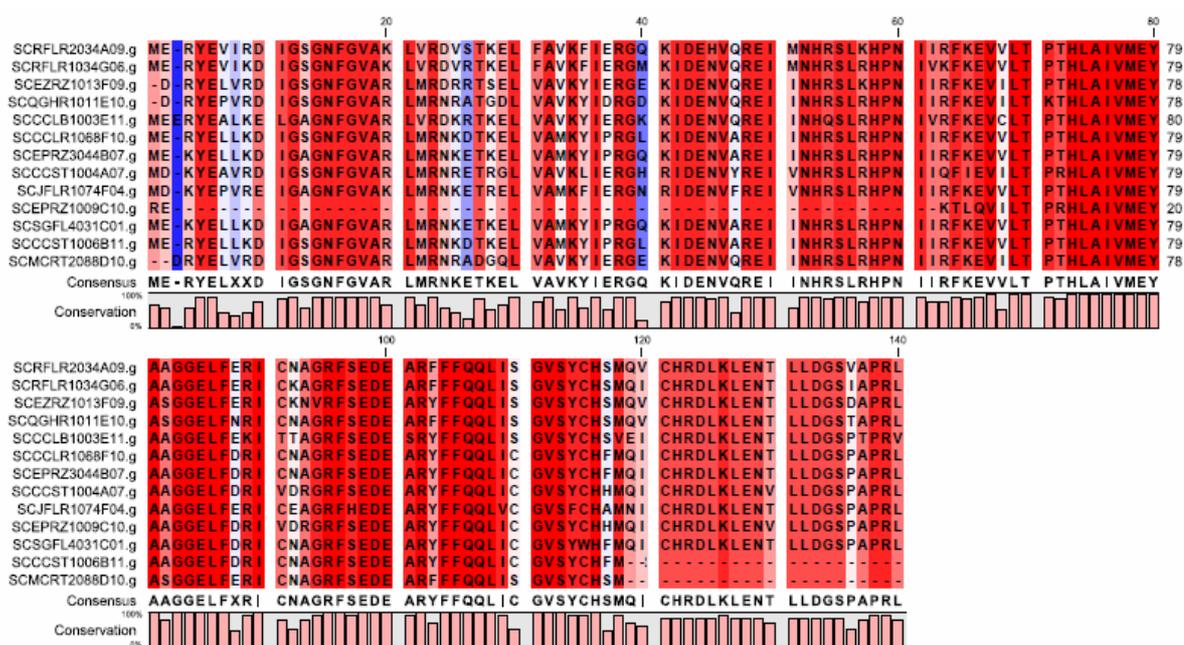


Figura 22 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos dos *clusters* correspondentes à subclasse SnRK2. Regiões conservadas são marcadas em vermelho e regiões não conservadas, em azul. O gráfico de barras indica o nível de conservação do aminoácido entre os diferentes *clusters*. As linhas pontilhadas indicam *gaps* na sequência e permitem a visualização de um melhor alinhamento.

Devido ao fato de o *cluster* SCCST1006B11.g apresentar alta frequência na biblioteca AD1, o mesmo foi selecionado para a realização da análise *in silico* nas diferentes bibliotecas do SUCEST. Conforme apresentado na figura 23, o transcrito analisado apresenta alta expressão, em resposta à colonização por *G. diazotrophicus*, sendo também expresso em interno (biblioteca ST).

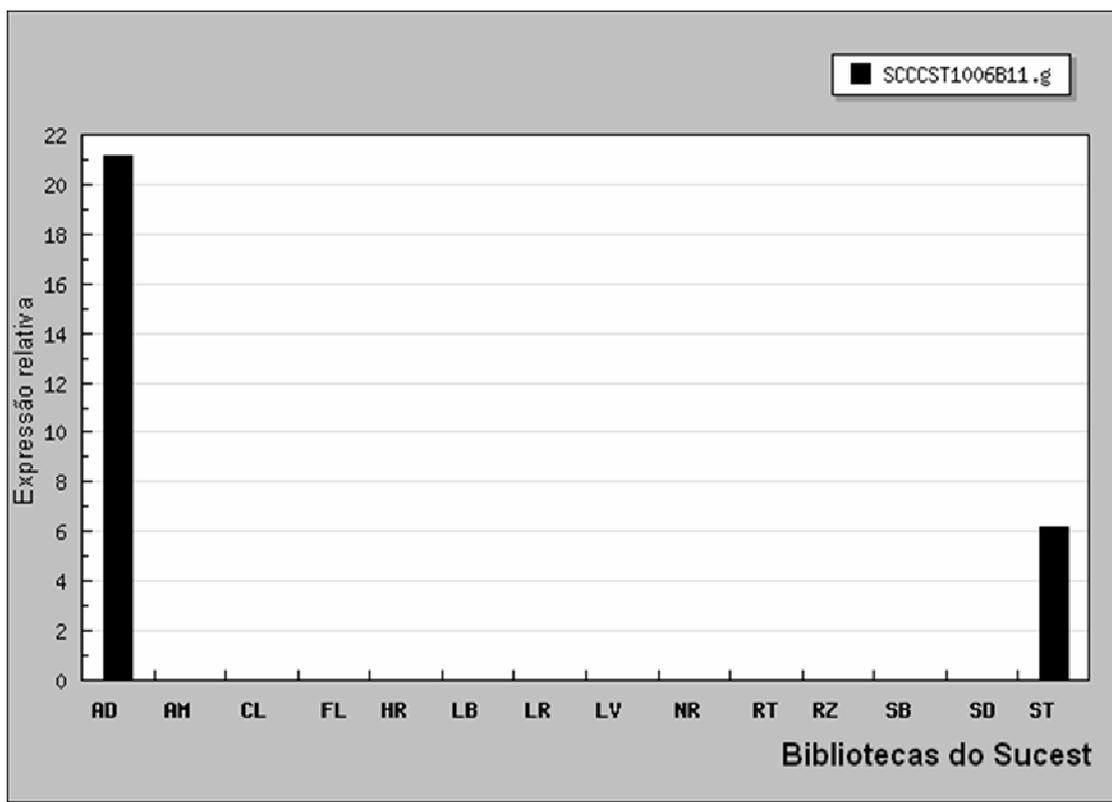


Figura 23 - Northern eletrônico, demonstrando a expressão relativa do *cluster* SCCST1006B11.g, que corresponde à proteína SAPK6 (subclasse SnRK2), nas diferentes bibliotecas do SUCEST. O eixo Y indica a expressão relativa do gene, o eixo X indica os códigos das bibliotecas analisadas.

No intuito de verificar a expressão dos *clusters* nas demais bibliotecas do SUCEST, os transcritos que se apresentaram regulados na biblioteca AD1 tiveram sua expressão relativa analisada (figura 24). Como pode ser verificado na figura 24D, o transcrito SCCCLR1068F10.g apresentou maior expressão relativa na biblioteca de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus*. Com exceção dos *clusters* SCCST1006B11.g e SCCCLR1068F10.g, os outros transcritos apresentaram uma menor expressão em AD1, quando comparada com as das demais bibliotecas do SUCEST.

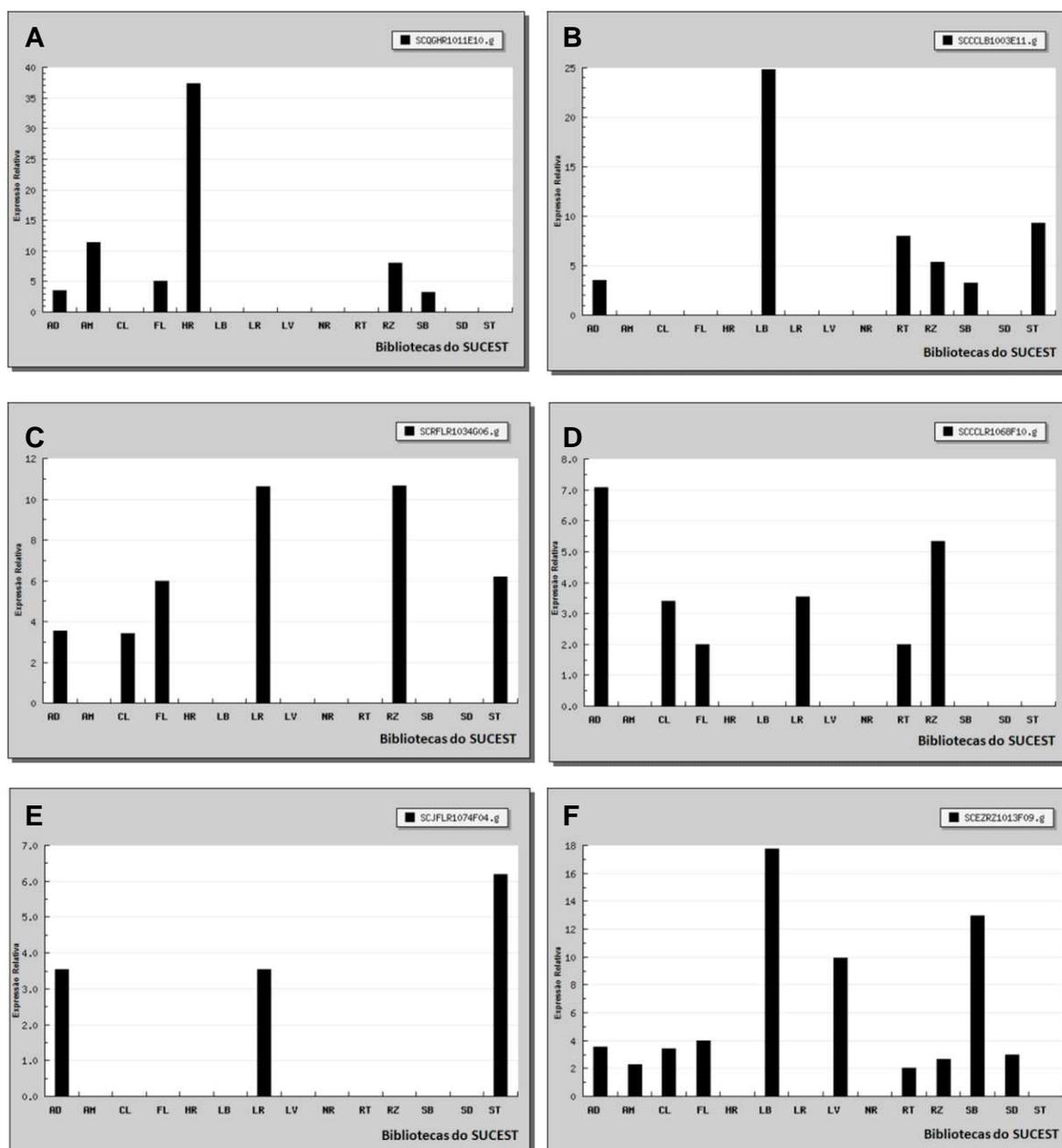


Figura 24 - Northern eletrônico, demonstrando a expressão relativa dos *clusters* SCQGHR1011E10.g (A), SCCCLB1003E11.g (B), SCRFLR1034G06.g (C), SCCCLR1068F10.g (D), SCJFLR1074F04.g (E) e SCEZRZ1013F09.g (F), que correspondem às proteínas SAPKs (subclasse SnRK2), nas diferentes bibliotecas do SUCEST. O eixo Y indica a expressão relativa do gene, o eixo X indica os códigos das bibliotecas analisadas.

Devido ao fato de o *cluster* SCCST1006B11.g apresentar-se regulado na biblioteca AD1, este foi selecionado para a realização do alinhamento com diferentes espécies e filogenia. Para a realização do alinhamento, sequências proteicas de dez espécies foram utilizadas e alinhadas no programa CLC Protein Workbench. Observa-se, na figura 25, que o alinhamento permitiu verificar o alto

nível de similaridade dos aminoácidos, entre as diferentes espécies. A sequência de cana-de-açúcar é apenas parcial, como pode ser visualizada.

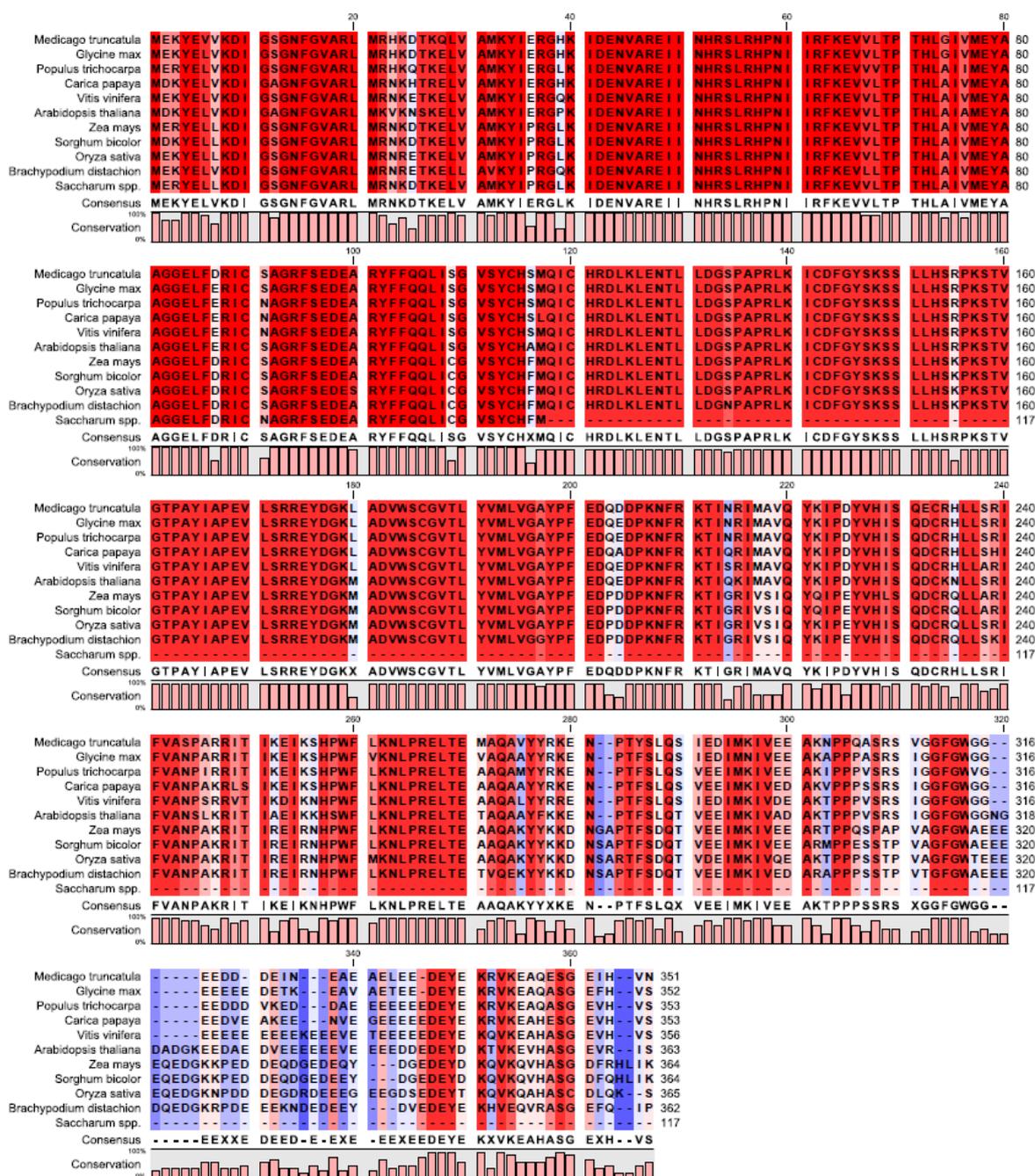


Figura 25 - Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos da proteína quinase SAPK6 (SnRK2) de 11 espécies. Regiões conservadas são marcadas em vermelho, e regiões não conservadas, em azul. O gráfico de barras indica o nível de conservação do aminoácido entre as diferentes espécies. As linhas pontilhadas indicam *gaps* na sequência e permitem a visualização de um melhor alinhamento.

Com relação à análise filogenética, foram utilizadas as sequências de aminoácidos das 11 espécies. O resultado apresentado na figura 26 mostra a formação de dois grandes grupos, um formado pelas dicotiledôneas e outro

formado pelas monocotiledôneas. De acordo com a filogenia, a proteína SAPK6, proveniente do *cluster* SCCCST1006B11.g, apresenta maior similaridade com uma SAPK de arroz (*Oryza sativa*).

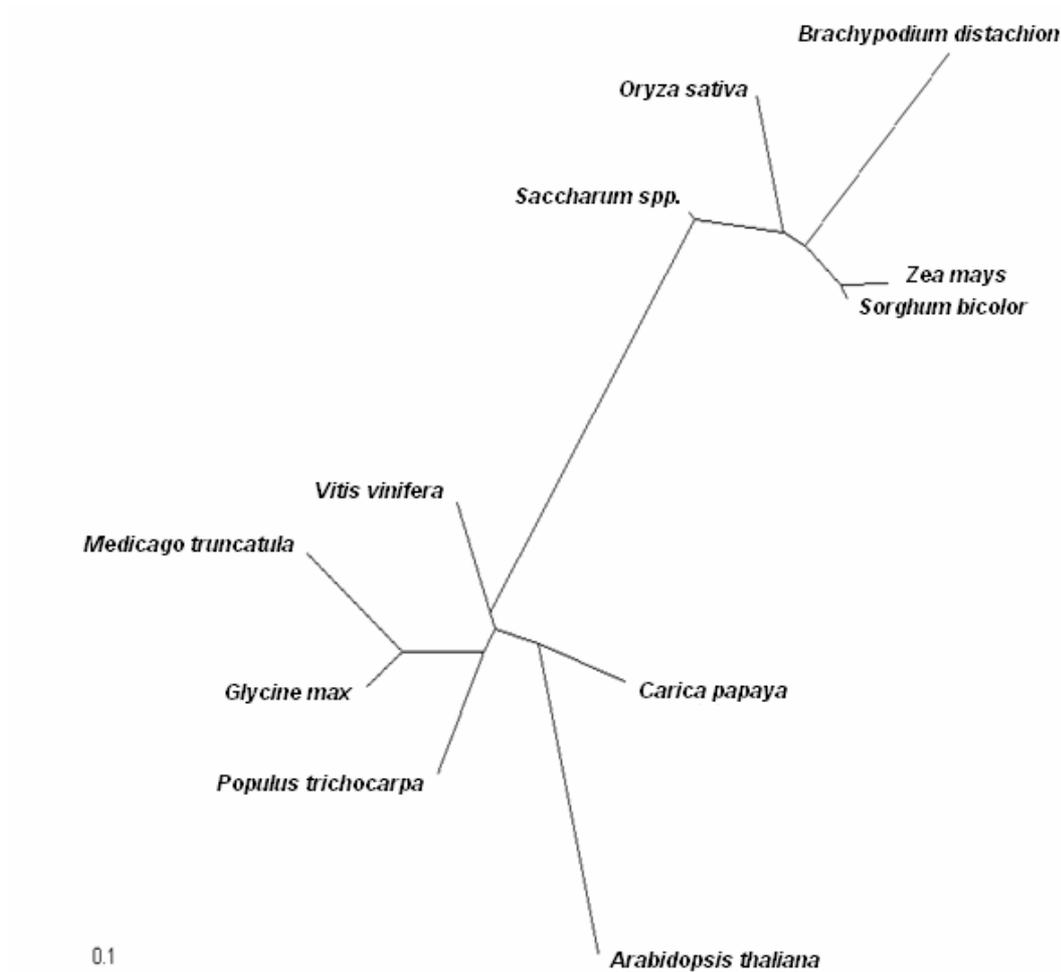


Figura 26 - Árvore filogenética da proteína quinase SAPK6 (SnRK2) de 11 espécies. As seqüências de aminoácidos foram alinhadas no programa ClustalW. Os resultados do alinhamento, no formato “Phylip”, foram submetidos ao programa “PHYML” para gerar a árvore. A escala é a distância de similaridade do agrupamento em questão.

3.2.5.3. Visualização dos níveis de expressão relativa do gene *AtSnRK2.4/ASK1* (SAPK6) de *Arabidopsis thaliana*, em diferentes tecidos e órgãos vegetais

Para obter uma possível informação funcional do *cluster* SCCCST1006B11.g (SAPK6), seu ortólogo em *Arabidopsis* foi identificado e sua

ID utilizada para a geração da fotografia fluorescente eletrônica (EFP Browser). Os níveis de expressão relativa são indicados por meio da coloração dos tecidos, em que baixos níveis de expressão são coloridos em amarelo, e altos níveis, em vermelho. A cor azul indica a repressão do gene.

Observa-se, na figura 27, que o gene analisado apresenta maior expressão em folhas senescentes e internó, sendo altamente expresso em grãos de pólen.

Sendo a classe SnRK2 responsiva a ABA e a estresse osmótico, adicionalmente, decidiu-se analisar tal gene em células-guarda. Conforme apresentado na figura 28, verifica-se uma considerável expressão do gene SnRK2.4/ASK1 em células do mesófilo e células-guarda, sendo essa expressão aumentada quando as plantas são submetidas ao tratamento com ABA.

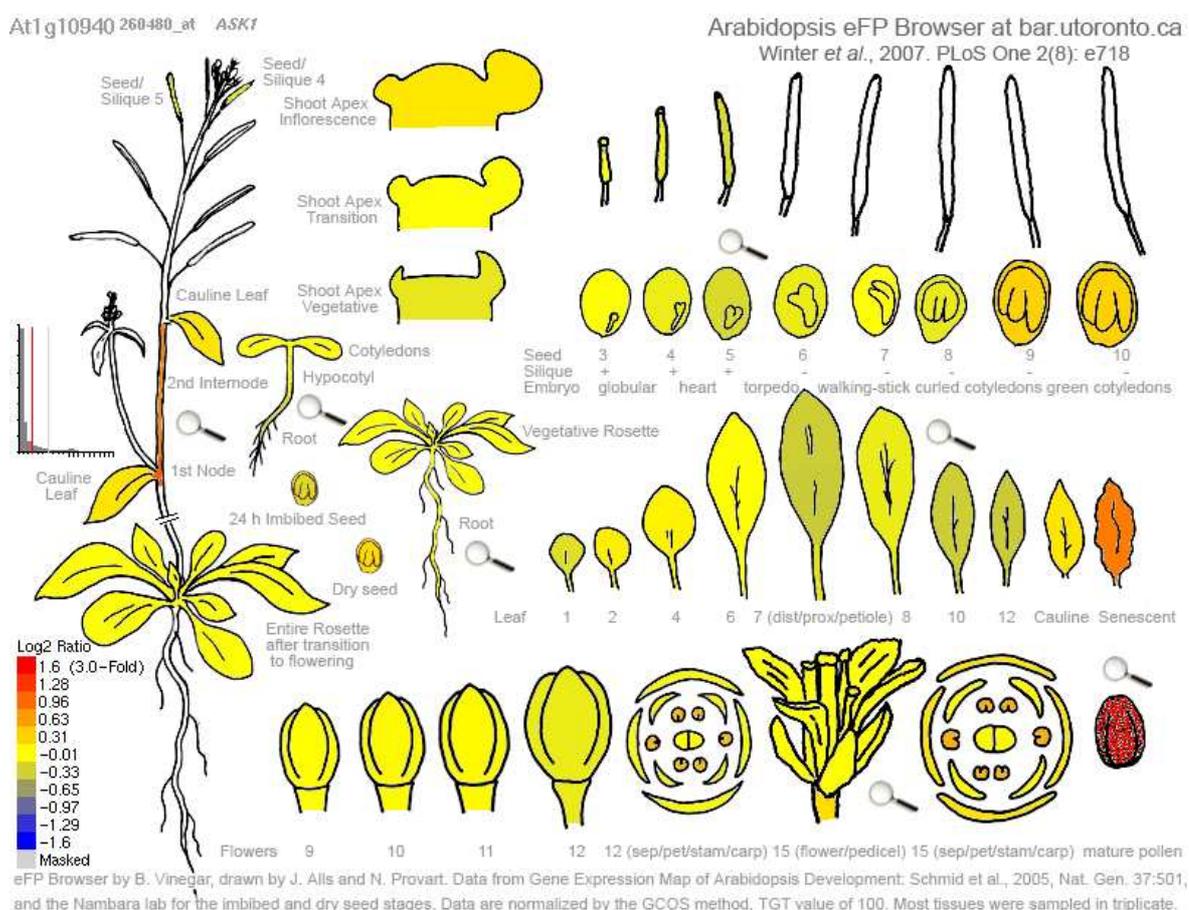


Figura 27 - Fotografia eletrônica fluorescente representando os níveis de expressão relativa do gene SnRK2.4/ASK1 (SAPK6), em diferentes tecidos e órgãos de *Arabidopsis thaliana*.

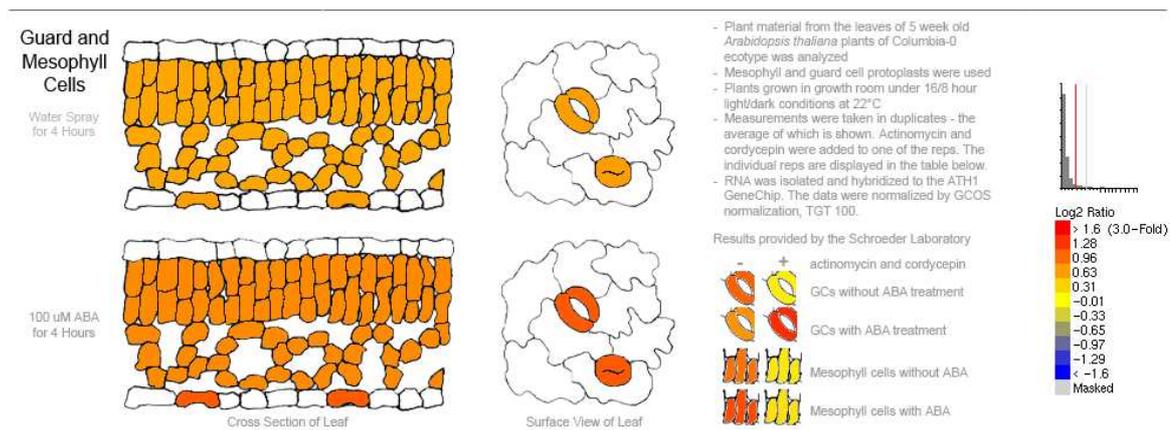


Figura 28 - Fotografia eletrônica fluorescente do padrão de expressão tecido-específica do gene SnRK2.4/ASK1 (SAPK6), em estômatos e células do mesofilo de *Arabidopsis thaliana*.

3.2.5.4. COI1 é induzido por plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus* (biblioteca AD1)

A proteína F-box COI1 é um fator-chave da resposta de defesa via ácido jasmônico e está envolvida em diversos mecanismos, como crescimento radicular, fertilidade do pólen e defesa contra insetos e patógenos (Xu *et al.*, 2002). Como já foi mencionado, COI1 responde à coronatina, um composto bacteriano análogo ao metil-jasmonato. Adicionalmente, seu papel também tem sido enfatizado devido a sua possível interferência nos mecanismos de fechamento estomático (Melotto *et al.*, 2006).

Nesse contexto, decidiu-se realizar a análise *in silico* de COI1. Ao todo, foram identificados seis ortólogos putativos de COI1. Conforme apresentado na figura 29, o *northern* eletrônica mostra que todos os *clusters* identificados são expressos na biblioteca AD1. Entre estes, observa-se que o transcrito SCQSRT1034B12.g apresentou a maior expressão entre os *clusters* analisados.

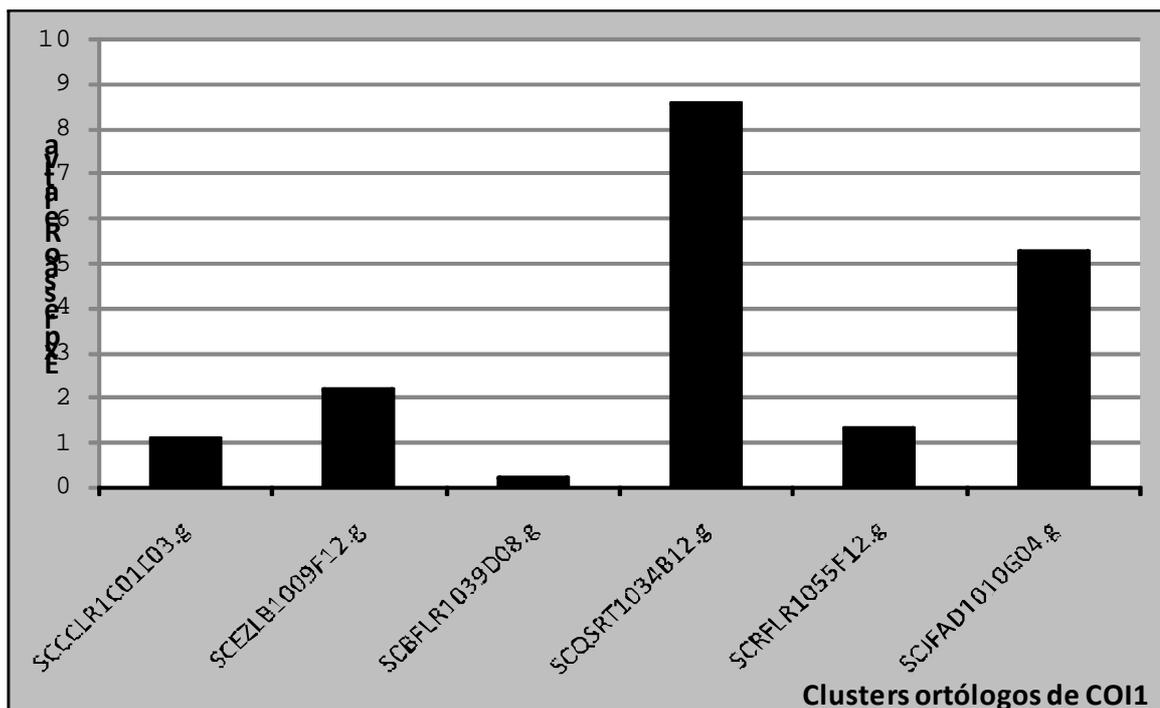


Figura 29 - Northern eletrônico dos *clusters*, que codificam proteínas da COI1, em uma biblioteca de cDNA de plantas inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus*. O eixo Y indica a expressão relativa dos genes, o eixo X indica os nomes de cada *clusters*. A análise foi realizada com a utilização do banco de dados SUCEST.

Devido ao fato de o *cluster* SCQSRT1034B12.g apresentar maior expressão relativa na biblioteca AD1, este foi selecionado para a realização da análise *in silico* nas diferentes bibliotecas do SUCEST. Observa-se, na figura 30, que o transcrito analisado apresenta expressão nas bibliotecas de meristema apical (AM), calo (CL), pedúnculo floral (FL), broto lateral (LB), raiz (RT), cascas (SB) e internó (ST). Porém, a maior indução ocorre na biblioteca de plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* (AD). Nas demais bibliotecas, nenhuma expressão foi observada.

Com o objetivo de verificar a expressão dos demais *clusters* nas bibliotecas do SUCEST, os outros transcritos, que também se apresentaram regulados na biblioteca AD1, tiveram sua expressão relativa analisada (figura 31). Como pode ser verificado na próxima figura, os transcritos SCRFLR1055F12.g (figura 31D) e SCJFAD1010G04.g (figura 31F) também apresentaram uma maior expressão relativa na biblioteca de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus*. Todos os demais *clusters* apresentaram expressão em AD1,

porém, quando comparados às demais bibliotecas, os mesmos não apresentaram expressão superior.

Uma observação interessante pode ser verificada na figura 31F, onde o transcrito SCJFAD1010G04.g é expresso somente na biblioteca AD1.

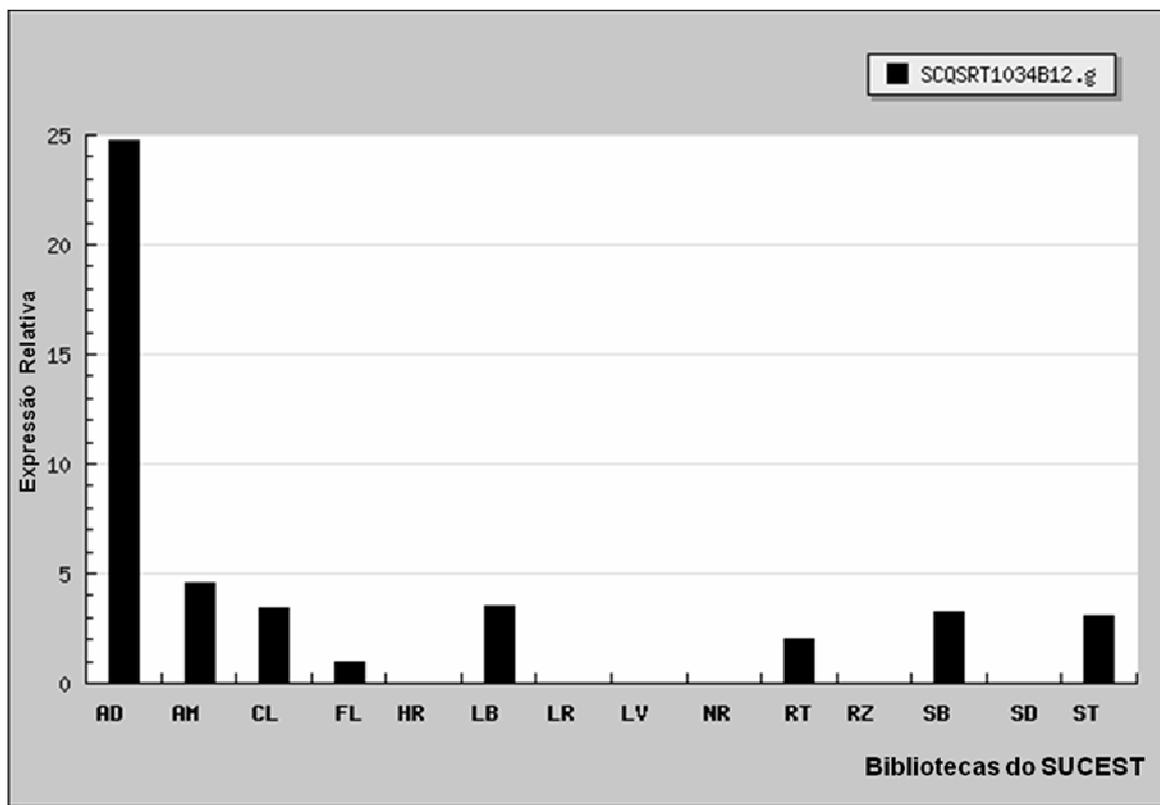


Figura 30 - Northern eletrônico, demonstrando a expressão relativa do *cluster* SCQSRT1034B12.g, que corresponde à proteína CO11, nas diferentes bibliotecas do SUCEST. O eixo Y indica a expressão relativa do gene, o eixo X indica os códigos das bibliotecas analisadas.

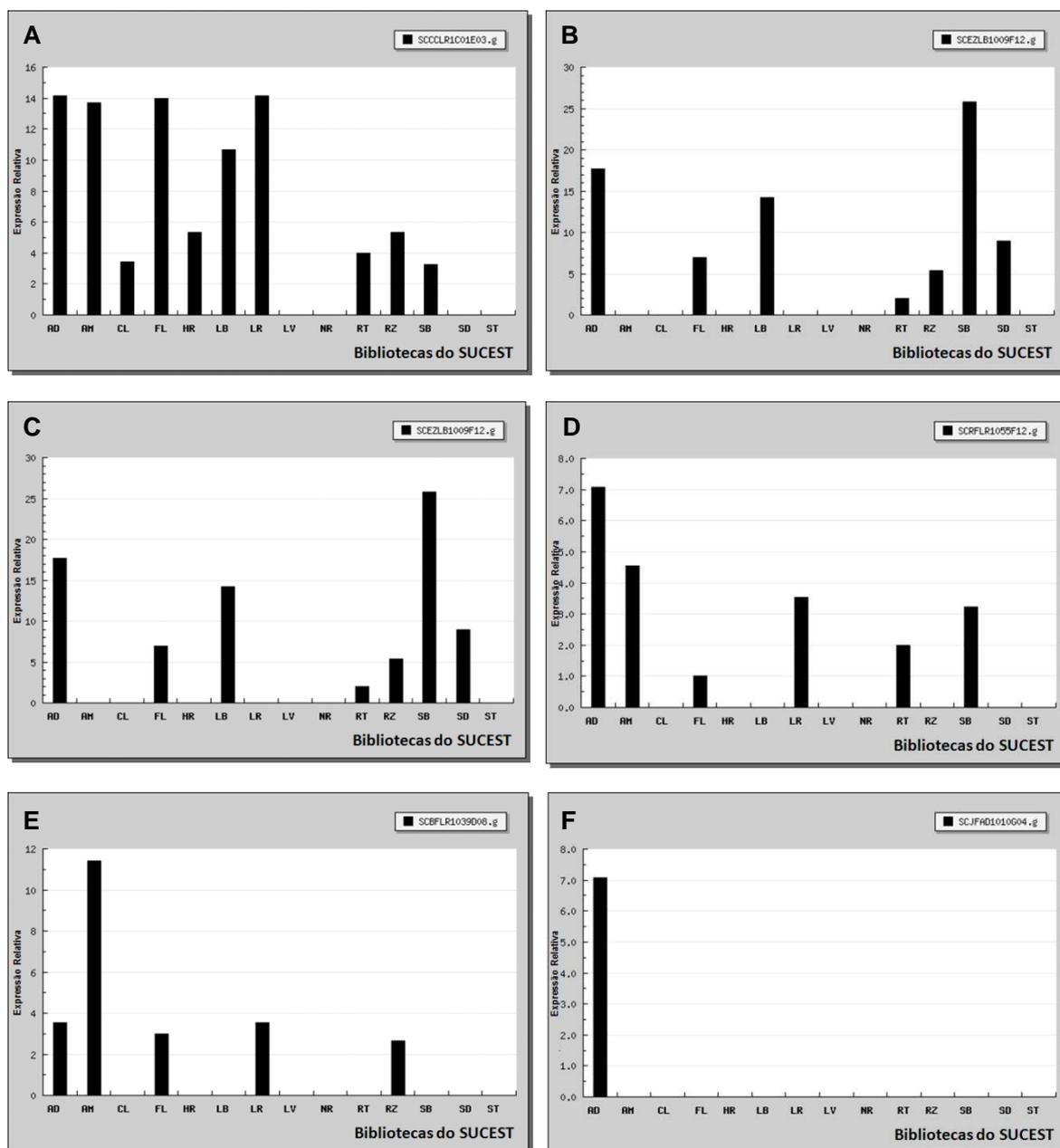


Figura 31 - Northern eletrônico, demonstrando a expressão relativa dos *clusters*, SCCCLR1C01E03.g (A), SCEZLB1009F12.g (B), SCBFLR1039D08.g (C), SCQSRT1034B12.g (D) e SCRFLR1055F12.g (E) e SCJFAD1010G04.g (F), correspondentes à proteína COI1, nas diferentes bibliotecas do SUCEST. O eixo Y indica a expressão relativa do gene, o eixo X indica os códigos das bibliotecas analisadas.

Adicionalmente, sequências da proteína COI1 de 13 espécies, incluindo a cana-de-açúcar, foram utilizadas na realização de um alinhamento, para verificar o nível de similaridade e conservação entre as diferentes espécies. O resultado do alinhamento pode ser observado na figura 32, onde se verificam o grau de similaridade e a conservação dos aminoácidos entre as proteínas COI1 das espécies utilizadas.

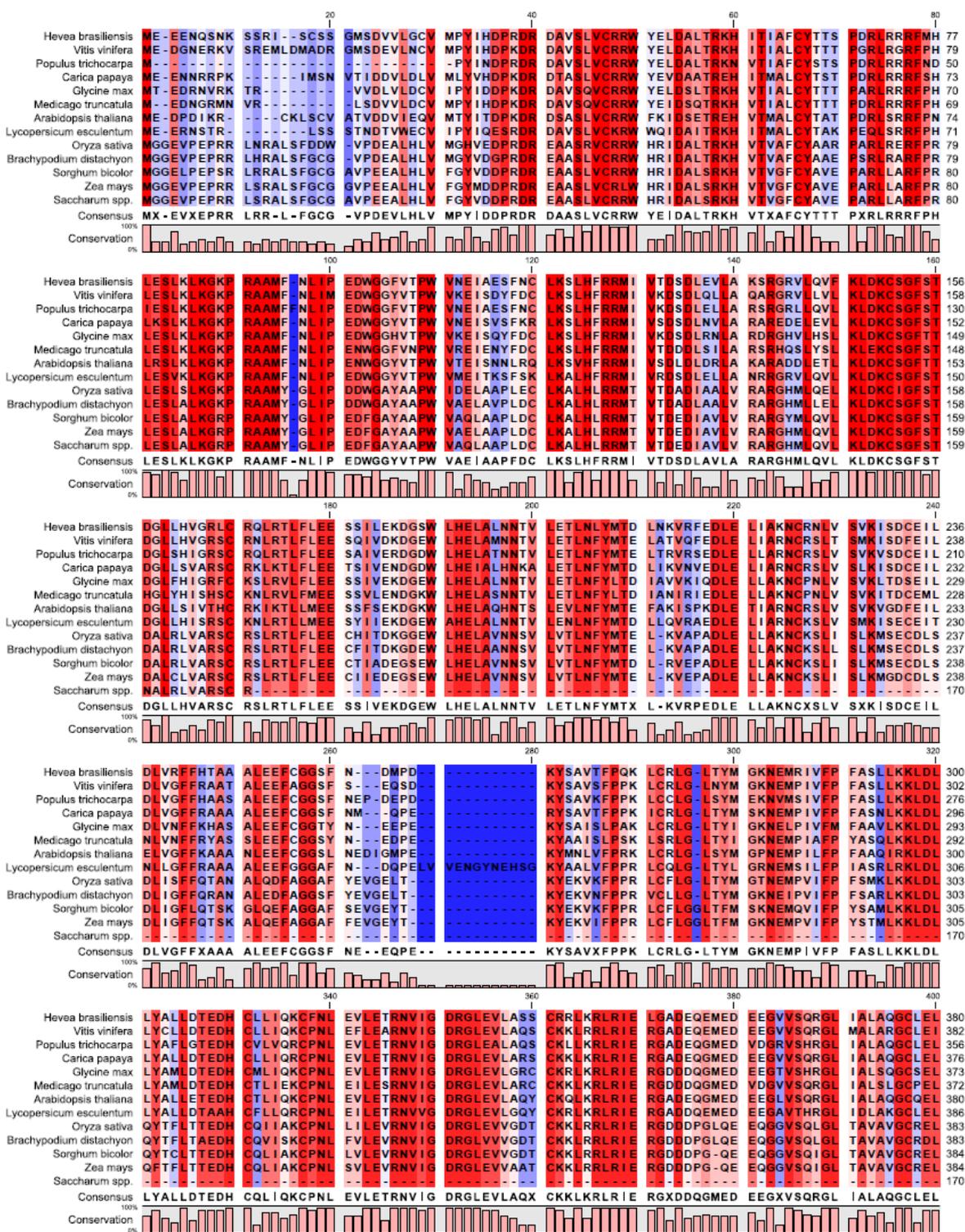


Figura 32 - Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos da proteína COI1 de 13 espécies. Regiões conservadas são marcadas em vermelho e regiões não conservadas, em azul. O gráfico de barras indica o nível de conservação do aminoácido entre as diferentes espécies. As linhas pontilhadas indicam *gaps* na seqüência e permitem a visualização de um melhor alinhamento.

Com relação à análise filogenética, foram utilizadas as sequências proteicas de COI1 de 13 espécies. O resultado apresentado, na figura 33, mostra a formação de dois grandes grupos, um formado por dicotiledôneas e outro formado por monocotiledôneas. Como se observa, a proteína COI1 de cana-de-açúcar é mais próxima à COI1 de sorgo.

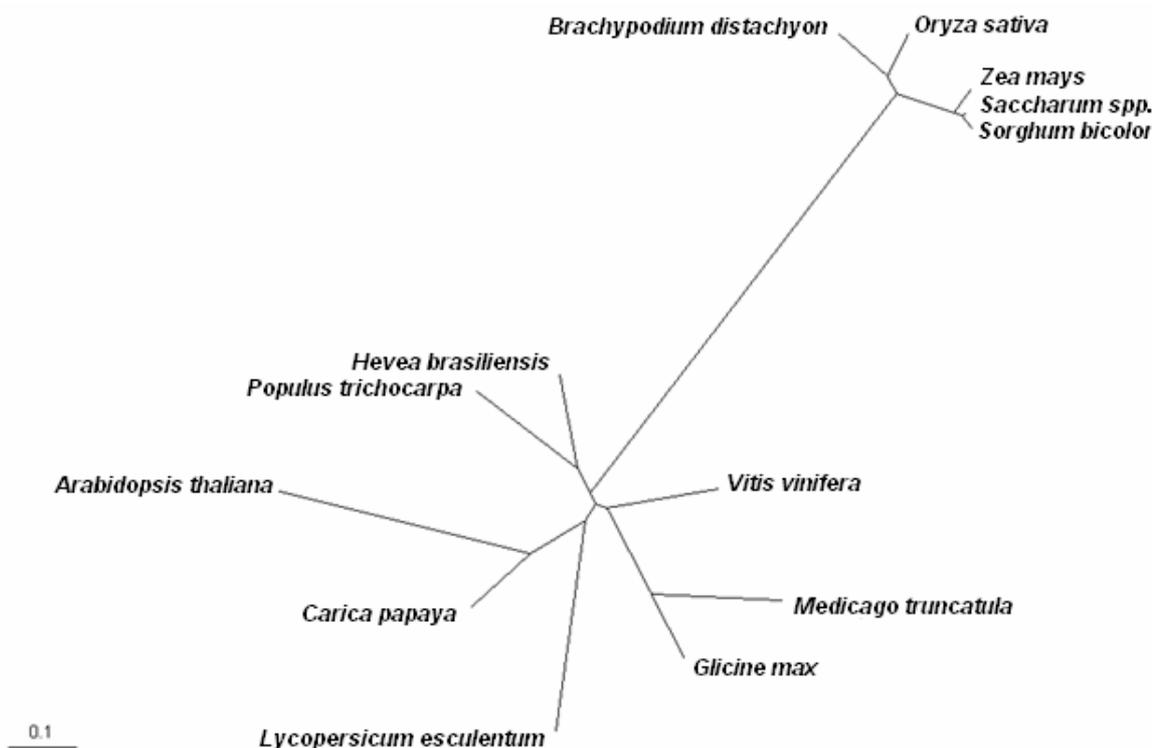


Figura 33 - Árvore filogenética da proteína COI1 de 13 espécies. As sequências de aminoácidos foram alinhadas no programa ClustalW. Os resultados do alinhamento, no formato “Phylip”, foram submetidos ao programa “PHYML” para gerar a árvore. A escala é a distância de similaridade do agrupamento em questão.

3.2.5.5. Visualização dos níveis de expressão relativa do gene COI1 de *Arabidopsis thaliana*, em diferentes tecidos e órgãos vegetais

Para obter uma possível informação funcional do gene COI1, seu ortólogo em *Arabidopsis* foi identificado, e sua ID utilizada para a geração da fotografia fluorescente eletrônica (EFP Browser). Os níveis de expressão relativa são indicados por meio da coloração dos tecidos, em que baixos níveis de expressão são coloridos em amarelo, e altos níveis, em vermelho. A cor azul indica a repressão do gene.

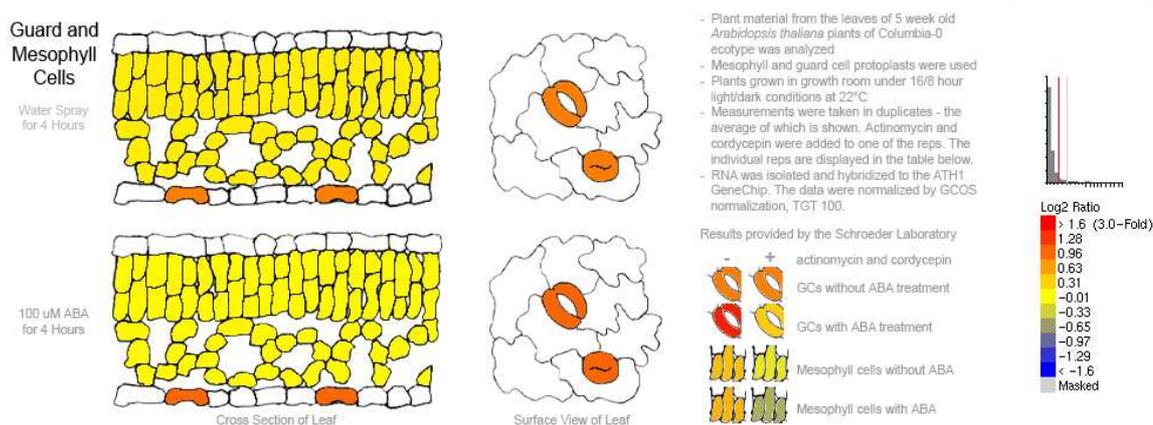


Figura 35 - Fotografia eletrônica fluorescente do padrão de expressão tecido-específica do gene *COI1*, em estômatos e células do mesofilo de *Arabidopsis thaliana*.

3.2.6. DISCUSSÃO

Conforme verificado no capítulo I, plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *G. diazotrophicus* apresentaram maior susceptibilidade aos estresses salino e hídrico, sendo essa sensibilidade mais proeminente em resposta ao estresse hídrico. Uma explicação plausível seria que a bactéria *G. diazotrophicus* poderia estar interferindo na via de sinalização para o controle da abertura estomática, acarretando, dessa forma, a maior perda de água através dos estômatos. Nesse contexto, o capítulo II teve como objetivo avaliar a possível participação de proteínas SnRKs e *COI1*, durante a colonização pela bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Segundo alguns autores (Ding *et al.*, 2009; Huai *et al.*, 2008; Hrabak *et al.*, 2003), proteínas CDPK-SnRK estão envolvidas na resposta vegetal ao ABA e a estresses abióticos. Análises filogenéticas, realizadas por Hardie (1999, 2000), demonstraram que quinases pertencentes à superfamília CDPK-SnRK contêm domínios Ser-Thr, típicos de eucariotos, utilizados na classificação dessas proteínas. Os dados obtidos, no presente trabalho, possibilitaram a identificação de 48 *clusters* de cana-de-açúcar, correspondentes à superfamília CDPK-SnRK. Foram identificados 3 *clusters* da subclasse SnRK1, 15 *clusters* da subclasse SnRK2, 16 *clusters* da subclasse SnRK3, 12 *clusters* da classe CDPK e 2 *clusters*

de serina-treonina quinase, sem função exata. Essas proteínas foram alinhadas e agrupadas filogeneticamente de acordo com suas regiões e domínios conservados (figura 20). Muitos membros dessa superfamília possuem uma região C-terminal cuja função é regular a atividade quinase ou mediar a interação com outras proteínas (Harper *et al.*, 1991). De acordo com os estudos filogenéticos de Hardie (2000), os domínios de todas as Ser-Thr quinases de *Arabidopsis* indicam que as subfamílias CDPK e SnRK são filogeneticamente próximas umas das outras, e distintas de outras quinases, formando dessa forma a superfamília CDPK-SnRK. Essas análises indicam que o padrão evolutivo da superfamília CDPK-SnRK possui uma origem comum. O resultado observado, na figura 20, e o alinhamento entre os membros de SnRK2 (figura 22) corroboram os dados de Hardie (2000), nos quais foram verificados o agrupamento das quinases na árvore filogenética e a alta conservação das sequências proteicas.

Levando em consideração que as quinases da classe SnRK2 estão envolvidas na sinalização em resposta ao ABA e ao estresse osmótico (Shukla e Mattoo, 2008), os mesmos tiveram sua expressão *in silico* analisada em uma biblioteca de cDNA de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus*. Entre os 13 *clusters* analisados, 7 apresentaram-se expressos na biblioteca AD1, sendo os *clusters* SCCCST1006B11.g altamente expressos em plantas de cana-de-açúcar colonizadas pelo endófito (figura 21).

O *cluster* SCCCST1006B11.g foi também analisado, nas diferentes bibliotecas do SUCEST (figura 23), e mostrou-se induzido na biblioteca AD1, quando comparado ao das demais bibliotecas. Tal *cluster*, quando submetido a um blast no NCBI, apresentou alta similaridade com a proteína ASK1/SnRK2.4 de *Arabidopsis* e com a proteína SAPK6 de milho. Em estudos realizados por Kobayashi *et al.* (2004), foi verificado que a desidratação, estresse osmótico e ABA induziram o gene OSRK1, idêntico a SAPK6, uma proteína quinase da classe SnRK2 de arroz.

Adicionalmente, entre os transcritos de SnRK2, analisados nas diferentes bibliotecas do SUCEST (figura 24), somente SCCCLR1068F10.g apresentou indução em AD1, sendo este também um ortólogo de SAPK6.

As quinases SnRK2 são também conhecidas como SAPKs (proteínas quinases ativadas por estresse osmótico e ABA – *osmotic stress/ABAactivated protein kinases*) (Kobayashi *et al.*, 2004). Segundo Ding *et al.* (2009), SAPK6

interage com OREB1, uma proteína relacionada a fatores bZIP, sendo um fator de ligação de elementos responsivos ao ABA.

A primeira SnRK2 (PKABA1) foi isolada de uma biblioteca de embriões de trigo tratados com ABA (Anderberg *et al.*, 1992). Subsequentemente, um outro membro da subfamília SnRK2 foi identificado como um regulador central de AAPK (proteína quinase ativada por ABA – *ABA activated protein kinase*) envolvido no fechamento estomático dependente de ABA em feijão de fava (Li *et al.*, 1996; 2000). Uma outra proteína quinase ativada por estresse hiperosmótico foi purificada de células de tabaco. O sequenciamento N-terminal permitiu identificar sua ortologia com a proteína ASK1 de *Arabidopsis* (Mikolajczyk *et al.*, 2000), também pertencente à família SnRK.

Mustilli *et al.* (2002) e Yoshida *et al.* (2002) também identificaram uma quinase SnRK2 em *Arabidopsis*, denominada OST1/SnRK2.6. OST1 é expressa em células-guarda e no sistema vascular, sendo ativada durante o fechamento estomático. Sua atividade é estimulada por ABA, mas sua expressão gênica não é regulada pelo hormônio (Mustilli *et al.*, 2002; Yoshida *et al.*, 2002). A análise *in silico*, observada na figura 21, mostra que o ortólogo putativo de OST1 em cana-de-açúcar (SCMCRT2088D10.g) também não apresentou aumento de sua expressão na biblioteca AD1. Porém, cabe ressaltar que a análise *in silico* de ESTs apresenta limitações, somente genes expressos são identificados e têm sua expressão relativa calculada, entretanto, genes reprimidos não são identificados.

Com relação ao alinhamento de SCCCST1006B11.g, a figura 25 permitiu verificar o alto nível de similaridade entre o gene ASK1/SnRK2.4/SAPK6 de diferentes espécies. A filogenia do *cluster*, diferencialmente expresso em AD1 (figura 26) (SCCCST1006B11.g), mostrou a formação de dois grandes grupos: o de dicotiledôneas e o de monocotiledôneas.

Visando obter uma possível informação funcional do *cluster* SCCCST1006B11.g, seu ortólogo putativo em *Arabidopsis* foi identificado e sua ID utilizada para a geração da fotografia fluorescente eletrônica (EFP Browser). Dessa forma, o gene ASK1/SnRK2.4 foi analisado, apresentado maior expressão em folhas senescentes, internós e grãos de pólen (figura 27). A expressão em folhas senescentes permite novamente a especulação de que o gene, nesse tecido e condição, pode estar respondendo ao hormônio ácido abscísico,

envolvido na abscisão foliar. O ABA estimula a síntese de etileno, que é responsável pela abscisão da folha.

Nesse contexto, decidiu-se analisar tal gene em células-guarda. Conforme apresentado na figura 28, verificou-se uma considerável expressão do gene SnRK2.4/ASK1 em células do mesófilo e células-guarda, sendo essa expressão aumentada quando as plantas eram submetidas ao tratamento com ABA.

Considerando o aumento da expressão de ASK1 em células-guarda de *Arabidopsis* tratadas com ABA (figura 28), os dados obtidos permitem especular que, durante a colonização por *G. diazotrophicus*, a proteína SAPK6 de cana-de-açúcar, que estaria envolvida em uma possível resposta ao ABA ou ao estresse osmótico, teria sua atuação alterada, afetando os mecanismos de resposta da planta a estresses.

Uma outra proteína também envolvida no movimento estomático é COI1 (*coronatine insensitive1*). Segundo Xie *et al.* (1998), o complexo SCF^{COI1} está envolvido na degradação de proteínas pelo proteossomo 26S e é requerido na resposta a ácido jasmônico (MeJA). Adicionalmente, MeJA desencadeia o fechamento estomático similar ao ABA (Wang e Song, 2008), porém, se os dois hormônios usam mecanismos de sinalização similares ou distintos ainda não foi esclarecido (Munemasa *et al.*, 2007).

Nesse contexto, foi realizado o *northern* eletrônico de seis transcritos (*clusters*) de cana-de-açúcar que codificam a proteína COI1 (figura 29). A análise *in silico* mostra que todos os *clusters* foram expressos na biblioteca AD1, sendo o *cluster* SCQSRT1034B12.g o que apresentou a maior expressão.

Devido ao fato de o *cluster* SCQSRT1034B12.g apresentar alta frequência na biblioteca AD1, sugerindo sua regulação em resposta à colonização por *G. diazotrophicus*, este foi selecionado para a realização da análise *in silico* nas diferentes bibliotecas do SUCEST, alinhamento da proteína COI1 com diferentes espécies e análise filogenética.

O *cluster* SCQSRT1034B12.g apresentou expressão nas bibliotecas de meristema apical (AM), calo (CL), pedúnculo floral (FL), broto lateral (LB), raiz (RT), cascas (SB) e internó (ST). Porém, a maior indução ocorre na biblioteca de plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* (AD) (figura 30).

Adicionalmente, entre os demais transcritos de COI1 (figura 31), foi identificado um *cluster* exclusivamente expresso em AD1 (SCJFAD1010G04.g).

O resultado do alinhamento de SCQSRT1034B12.g, observado na figura 32, possibilitou a observação de um alto grau de similaridade e a conservação dos aminoácidos entre as proteínas COI1 das espécies analisadas. Com relação à análise filogenética, o resultado apresentado, na figura 33, a formação de dois grandes grupos, um formado pelas dicotiledôneas e/ou outro formado pelas monocotiledôneas. Como pôde ser observado, COI1 de cana-de-açúcar é mais próxima a COI1 de sorgo. Segundo Paterson *et al.* (2004), sorgo e cana-de-açúcar são muito próximos, se comparados às outras espécies cultivadas. Estima-se que sua divergência evolucionária ocorreu há 5 milhões de anos atrás, ao contrário do milho, cuja separação foi estimada há 15-20 milhões de anos atrás.

Com o objetivo de verificar uma possível informação funcional do *cluster* SCQSRT1034B12.g, seu ortólogo putativo em *Arabidopsis* foi identificado e sua ID utilizada para a geração da fotografia fluorescente eletrônica (EFP Browser). Dessa forma, o gene COI1 foi analisado, apresentando maior expressão em folhas caulinares, folhas senescentes, raízes e internó, sendo altamente reprimido em grãos de pólen (figura 34). Tais resultados corroboram o *northern* eletrônico nas diferentes bibliotecas do SUCEST, em que foi verificado que COI1 apresenta-se regulado nas bibliotecas de raiz (RT) e internó (ST) (figura 30).

Como já foi descrito, COI1 é responsivo ao MeJA, estando esse hormônio também envolvido com a abertura e fechamento estomático. Adicionalmente, de forma similar ao ABA, o MeJA também é acumulado em plantas sob estresse hídrico (Creelman e Mullet, 1995).

Devido ao fato de a ação dependente de SCF^{COI1} interferir na inibição do fechamento estomático, decidiu-se analisar tal gene em células-guarda. Conforme apresentado na figura 35, verificou-se um aumento da expressão do gene COI1 nessas células. Porém, ao contrário de SAPK6, COI1 não apresentou um maior aumento de sua expressão durante o tratamento com ABA.

Tal observação sugere que o aumento da expressão de COI1, verificado na biblioteca de plantas inoculadas, pode ser proveniente de uma resposta independente de ABA, porém envolvida no sistema de defesa do vegetal (Melotto *et al.*, 2006).

Em resumo, os resultados encontrados para COI1 e SAPK6, e suas similaridades com proteínas envolvidas com a abertura estomática e em resposta

a ABA, sugerem que seus respectivos transcritos de cana-de-açúcar podem estar envolvidos na resposta de defesa e hormonal, desencadeada pela colonização por *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5.

G. diazotrophicus é conhecida por seus vários efeitos promotores do crescimento vegetal. Dentre estes, destaca-se a produção de fitormônios pela bactéria. Atualmente, não se sabe ao certo o papel desses hormônios durante a interação cana-endófito; acredita-se que estejam envolvidos na promoção do crescimento. Porém, sabe-se que alterações na concentração ou qualquer desequilíbrio hormonal pode acarretar mudanças fisiológicas.

Nesse sentido, estudos posteriores poderiam ser realizados, visando a um melhor entendimento dos mecanismos de defesa e de sinalização de hormônios durante a interação cana-de-açúcar X *G. diazotrophicus*, bem como verificar se ocorre alguma interação com as vias de produção e resposta ABA e MeJA.

3.2.7. CONCLUSÕES

- SAPK6 de cana-de-açúcar é induzida na biblioteca de plantas colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e pode estar envolvida na via de sinalização do hormônio ácido abscísico.
- Todos os transcritos de COI1 identificados em cana-de-açúcar apresentaram expressão durante a colonização por *G. diazotrophicus*. Adicionalmente, o *cluster* SCJFAD1010G04.g foi expresso unicamente em AD1.
- Os resultados para COI1 de cana-de-açúcar sugerem o envolvimento dessa proteína nos mecanismos de defesa vegetal, desencadeado pela inoculação de *G. diazotrophicus*.

3.2.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderberg R.J., Walker-Simmons M.K. (1992) Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89:10183-10187.
- Creelman R.A., Mullet J.E., 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 4114-4119.
- Ding X., Richter T., Chen M., Fuji H., Seo Y.S., Xie M., Zheng X., Kanrar S., Stevenson R.A., Dardick C., Li Y., Jiang H., Zhang Y., Yu F., Bartley L.E., Chern M., Bart R., Chen X., Zhu L., Farmerie W.G., Gribskov M., Zhu J.K., Fromm M.E., Ronald P.C., Song W.Y. (2009) A rice kinase protein interaction map. *Plant Physiology* 149:1478-1492.
- Fan L.M., Zhao Z., Assmann S.M. (2004) Guard cells: a dynamic signaling model. *Current Opinion in Plant Biology* 7:537-46.
- Hardie D.G. (1999) Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 97-131.
- Hardie D.G. (2000) Plant protein serine/threonine protein kinases: classification into sub-families and overview of function. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology* 32:1-44.
- Harper J.F., Sussman M.R., Schaller G.E., Putnam-Evans C., Charbonneau H., Harmon A.C. (1991) A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science* 252:951-954.
- Hrabak E.M. (2000) Calcium-dependent protein kinases and their relatives. *Advances in Botanical Research* 32:185-233.
- Hrabak E.M., Chan C.W., Gribskov M., Harper J.F., Choi J.H., Halford N., Kudla J., Luan S., Nimmo H.G., Sussman M.R., Thomas M., Walker-Simmons K., Zhu J.K., Harmon A.C. (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology* 132:666-680.

- Kobayashi Y., Yamamoto S., Minami H., Kagaya Y., Hattori T. (2004) Differential activation of rice sucrose nonfermenting 1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell*. 16: 163-1177.
- Li J., Kinoshita T., Pandey S., Ng C.K.Y., Gygi S.P., Shimazaki K., Assmann S.M. (2002) Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* 418: 793-797.
- Li J., Wang X.Q., Watson M.B., Assmann S.M. (2000) Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287: 300-303.
- Melotto M., Underwood W., He S.Y. (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 46:101-122.
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K., He S.Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980.
- Mikolajczyk M., Awotunde O.S., Muszynska G., Klessig D.F., Dobrowolska G. (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* 12: 165–178.
- Mustilli A.C., Merlot S., Vavasseur A., Fenzi F., Giraudat J. (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14:3089-3099.
- Schroeder J.I., Kwak J.M., Allen G.J. (2001) Guard cell abscisic acid signaling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410:327-30.
- Shukla V., Mattoo A.K. (2008) Sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2 (SnRK2): a family of protein kinases involved in hyperosmotic stress signaling. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 14: 91-100.
- Vinagre F., Vargas C., Schwarcz K., Cavalcante J., Nogueira E.M., Baldani J.I., Ferreira P.C.G., Hemery A.S. (2006) Shr 5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. *Journal of Experimental Botany* 57:559-569.

- Wang C., Song C.P. (2008) Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid. *New Phytologist* 178:703-718.
- Xie D.X., Feys B.F., James S., Nieto-Rostro M., Turner J.G. (1998) *COI1*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280:1091-94.
- Xu L.H., Liu F.Q., Lechner E., Genschik P., Crosby W.L. (2002) The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:1919-35.
- Yoshida R., Hobo T., Ichimura K., Mizoguchi T., Takahashi F., Aronso J., Ecker J.R., Shinozaki K. (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 43:1473-1483.

3.3. PRODUÇÃO DE ÁCIDO ABCSÍCIO PELA BACTÉRIA ENDOFÍTICA *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 E QUANTIFICAÇÃO DO HORMÔNIO EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS

3.3.1. RESUMO

O fitormônio ácido abscísico tem papel fisiológico importante no desenvolvimento vegetal e em resposta a estresses. Nos últimos anos, diversos hormônios vegetais foram identificados e quantificados em fungos e bactérias. A biossíntese desses hormônios, nos diferentes microorganismos, ainda não tem sua função bem esclarecida, porém, alguns estudos evidenciam sua importância no estabelecimento da interação planta-bactéria. Neste trabalho, identificamos o hormônio ABA em meio de cultura quimicamente definido (LGIP) da bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, por GC-EIMS. Adicionalmente, o mesmo hormônio foi também quantificado em plantas de cana-de-açúcar inoculadas e submetidas aos estresses hídrico e salino. A inoculação dobrou a quantidade de ABA das plantas de cana-de-açúcar e aumentou a expressão de genes que respondem especificamente ao ABA. Quando essas plantas foram submetidas aos estresses, níveis endógenos consideráveis de ABA puderam ser quantificados, quatro vezes mais em relação aos das plantas-controle. Os resultados mostrados, neste trabalho, sugerem o envolvimento do hormônio ácido abscísico na resposta da planta de cana inoculada com a bactéria ao estresse osmótico. Estudos complementares com mutantes de *Arabidopsis*

deficientes em ABA evidenciam que a inoculação com a bactéria tem uma função fisiológica na germinação, similar à do ABA vegetal.

3.3.2. ABSTRACT

The plant hormone abscisic acid has important physiological role in plant development and in response to stresses. In recent years, several plant hormones were identified and quantified in fungi and bacteria. The biosynthesis of these hormones in different organisms has not yet fully understood his role, however, some studies have shown its importance in the establishment of plant-bacteria interaction. In this study, we identified the hormone ABA in chemically-defined culture medium (LGIP) of the endophytic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 by GC-EIMS. Additionally, the same hormone was also measured in inoculated plants of sugarcane and submitted to drought and salinity. Inoculation doubled the amount of ABA in sugarcane plants and up-regulated specific genes of response to ABA. When these plants were exposed to stresses, considerable levels of endogenous ABA could be quantified, four times more than the control. The results obtained in this study suggest the involvement of the hormone abscisic acid in inoculated sugarcane plants response to stresses. Additional studies with *Arabidopsis* mutants deficient to ABA showed that inoculation with the bacterium has a physiological function in germination, similar to ABA plant hormone.

3.3.3. INTRODUÇÃO

Plantas podem interagir com diferentes microorganismos, formando associações benéficas ou patogênicas. Nesses últimos anos, vários efeitos positivos foram atribuídos às bactérias endofíticas, como a promoção do crescimento vegetal, a fixação biológica do nitrogênio (Iniguez *et al.*, 2004; Hurek *et al.*, 2002; Sevilla *et al.*, 2001), a solubilização de nutrientes (Sessitsch *et al.*,

2004; Sturz *et al.*, 2000) e a produção de fitormônios (Bottini *et al.*, 2004; Cohen *et al.*, 2008; Schmelz *et al.*, 2003), sendo este último um dos mais aceitos para explicar os mecanismos promotores de crescimento, em resposta à interação (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003; Glick e Bashan, 1997).

O possível papel desses hormônios durante a interação planta-bactéria ainda é pouco conhecido, porém acredita-se que as alterações nas taxas hormonais poderiam auxiliar no estabelecimento da doença ou colonização (Cassán *et al.*, 2001a and b; Grant and Jones, 2009; Spaepen *et al.*, 2007).

A primeira observação da síntese de fitormônios por microorganismos foi realizada em plântulas de arroz infectadas com o fungo *Gibberella fujikuroi* (Kurosawa, 1926). O composto identificado foi denominado giberelina. Posteriormente, técnicas físico-químicas permitiram a identificação deste e de outros hormônios, como auxina e citocinina de bactérias e fungos (Bottini *et al.*, 2004; Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007).

O'Donnell *et al.* (2003) quantificaram o teor de hormônios vegetais em plantas de *Arabidopsis*, infestadas por *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, encontrando elevados níveis de auxina. Schmelz *et al.* (2003) confirmaram que PstDC3000 induzia genes da biossíntese de auxina e nas mesmas condições, o patógeno também induzia a produção de ácido abscísico (ABA). Estudos realizados por Cohen *et al.* (2008) também demonstraram a biossíntese do hormônio ABA pela bactéria endofítica *Azospirillum brasiliense* Sp 245, em meio de cultura.

O ácido abscísico é um hormônio vegetal envolvido em vários processos fisiológicos da planta (Zeevaart e Creelman, 1988). No desenvolvimento de sementes, o ABA é necessário para induzir a síntese de proteínas de reserva e lipídeos, bem como para a quebra da dormência de sementes e na aquisição de tolerância à desidratação (Seo e Koshiba, 2002). O ABA também possui um papel importante na resposta a vários estresses ambientais, como seca, salinidade e UV-B (Berli *et al.*, 2010; Travaglia *et al.*, 2007).

Entre as bactérias endofíticas diazotróficas já caracterizadas, objeto de estudo de muitos pesquisadores, está a *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Inicialmente, essa bactéria foi caracterizada como endofítica fixadora de nitrogênio. Porém, seu potencial agrobiotecnológico vem ampliando-se. Isto se deve a sua capacidade de solubilização de compostos como zinco e fosfato

(Intorne *et al.*, 2009), produção de bacteriocinas (Piñon *et al.*, 2002), biossíntese de fitormônios (Bastián *et al.*, 1998), bem como apresentar resistência a antibióticos e metais pesados (Ahmad *et al.*, 2004). A interação *G. diazotrophicus* X cana-de-açúcar representa um modelo de sistema eficaz para estudos de associação endofítico diazotrófico-monocotiledônea. Tal modelo tem sido bastante estudado, sendo o PGPB atribuído à fixação do nitrogênio e à produção de fitormônios, tanto em cana (Pedraza, 2008) como em outras espécies sacaríferas (Bastián *et al.*, 1999).

Neste trabalho, foi realizada a quantificação do hormônio ABA, em cultura de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, bem como em plantas de cana-de-açúcar inoculadas e submetidas à desidratação e salinidade. Tal caracterização foi obtida por meio de gás *chromatography-electron impact mass spectrometry* (GC-EIMS). Adicionalmente, genes envolvidos na resposta vegetal a ABA foram avaliados por *northern in silico*, utilizando uma biblioteca de cDNA de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria *G. diazotrophicus* (SUCEST).

3.3.4. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.4.1. Material biológico

3.3.4.1.1. Microorganismo e condições da cultura

Gluconacetobacter diazotrophicus cepa PAL5 (cedida gentilmente pelo Prof. Fábio Olivares, LBCT/UENF, Campos dos Goytacazes/RJ-Brasil) foi utilizada. A bactéria foi crescida no meio quimicamente definido LGIP em frasco *erlenmeyer*. Foram adicionados 0,5% de sacarose, 0,5% de sacarose + 100 mM de NaCl, 10% de sacarose e 10% de sacarose + 100 mM de NaCl, respectivamente, totalizando quatro tratamentos e controle (meio LGIP). A cultura foi incubada em um *shaker* orbital com banho (Shaker Pro, Viking, Biocontrol) a 120 rpm, a 30°C, no escuro, até alcançar a fase estacionária determinada pela OD₆₀₀.

3.3.4.2. Colonização de cana-de-açúcar por *Gluconacetobacter diazotrophicus*

G. diazotrophicus foi crescida em meio DIGS, mantida em *shaker* orbital por 12 horas a 30°C. Após o crescimento, a cultura foi utilizada para a inoculação de plantas de cana-de-açúcar de 20 dias de idade. As raízes dessas plantas foram mantidas mergulhadas na cultura bacteriana por 2 horas, plantas-controle foram mergulhadas em meio DIGS. Passado o tempo de inoculação, as mesmas foram plantadas em substrato areia e vermiculita (2:1) e mantidas em casa de vegetação. Após 15 dias de colonização das plantas de cana-de-açúcar pela bactéria *G. diazotrophicus*, essas foram coletadas da casa de vegetação, mantidas em nitrogênio líquido, e estocadas em freezer – 80°C, para posterior análise de ABA.

3.3.4.3. Teste de germinação em sementes de *Arabidopsis thaliana*

Sementes de *Arabidopsis thaliana* foram esterilizadas, em uma solução de hipoclorito de sódio 5%, e plaqueadas em meio líquido contendo sais inorgânicos Murashige & Skoog (1962). Para o teste de germinação, sementes foram germinadas em placas de petri contendo meio MS líquido, meio MS líquido acrescido de 2 µM de ABA, e de um exudado filtrado, proveniente de uma cultura de bactérias *G. diazotrophicus*, crescidas em meio MS líquido, em um *shaker* orbital a 30°C, até atingir a fase estacionária.

3.3.4.4. Identificação e quantificação de ABA endógeno em *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Para a quantificação de ABA em cultura bacteriana, 100 ng de [²H₆]-ABA (gentilmente doado por J. D. Cohen, Departamento de Horticultura, Universidade de Minnesota, Saint Paul-EUA) foram adicionados à metade do volume da cultura, no fim do período de incubação, como um padrão interno. A mistura permaneceu durante 3 horas no escuro, a 4°C, para o equilíbrio do isótopo. A outra metade da

cultura foi processada sem o padrão interno. A cultura bacteriana foi crescida de acordo com a descrição do método 'Microorganismo e condições da cultura' e, então, sonicadas duas vezes por 6 minutos. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 5000 rpm por 30 minutos, a 4°C. As células foram descartadas e o sobrenadante foi ajustado para pH 3.0, com ácido acético. Após o ajuste do pH, o líquido foi dividido em três frações contendo igual volume de acetato de etila (saturado com 1% de ácido acético) pH 2.8-3.0. As frações contendo o acetato de etila foram evaporadas em um rotavapor, e o resíduo dissolvido em 1 mL de uma mistura de metanol: água:ácido acético (79:20:1; v/v/v). Essa mistura foi filtrada e submetida à purificação em HPLC, utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈ µBonda-pack (Waters Associates, Parker Ltd., Milford-EUA). A eluição foi realizada com o aparato KONIK 500 (Konik Instruments, Barcelona-Espanha) num fluxo de 2 mL min⁻¹, usando um gradiente de 0-10 minutos para 10% de metanol em 1% de ácido acético; de 10-40 minutos para 10-73% de metanol em 1% de ácido acético; de 40-50 minutos para 73% de metanol em 1% de ácido acético; e de 50-60 minutos para 100% de metanol. A fração de 34-40 minutos foi coletada. Após a evaporação do solvente em um rotavapor, a amostra foi utilizada na análise por cromatografia gasosa, acoplada a um espectro de massas (GC-EIMS). Para a derivatização do metil-éster, 2-4 mL de metanol e 50-100 µL de CH₂N₂ foram adicionados, e deixados por 30 minutos à temperatura ambiente. Após os solventes serem eliminados sob N₂, o extrato foi dissolvido em 5 µL de hexano e 1 µL desse total foi injetado no sistema GC-MS (PerkinElmer Elite-5MS). O programa utilizado no GC foi 100-190°C a 15°C por minuto e, então, de 190-260°C a 5°C por minuto. A caracterização foi realizada por comparação de ABA autêntico comercial (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, USA), em que Me do ABA endógeno bacteriano foi comparado ao Me deuterado do hormônio-padrão.

3.3.4.5. Identificação e quantificação de ABA endógeno em plantas inoculadas

Para a quantificação em plantas de cana-de-açúcar inoculadas e estressadas (sal e seca), aproximadamente, 100 mg de tecido foliar fresco foram

homogeneizados em 1 mL de metanol gelado: água: ácido acético (79:10:1; v/v) com 100 ng de [²H₆]-ABA. Após filtração e evaporação do metanol, a fase aquosa foi purificada em coluna C18 Sep-Pack (Waters Associates, Milford-USA), lavada com hexano e eluída com metanol: água: ácido acético (79:10:1; v/v). Após a evaporação, a amostra foi particionada quatro vezes em acetato de etila saturada com água (pH 3.0). Essa fração foi então evaporada e redissolvida em uma mistura de metanol: água: ácido acético (79:20:1; v/v/v). Essa mistura foi filtrada e submetida à purificação em HPLC, utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈ μ Bonda-pack (Waters Associates, Parker Ltd., Milford-EUA). A eluição foi realizada com o aparato KONIK 500 (Konik Instruments, Barcelona-Espanha) num fluxo de 2 mL min⁻¹, usando um gradiente de 0-10 minutos para 10% de metanol em 1 % de ácido acético; de 10-40 minutos para 10-73% de metanol em 1% de ácido acético; de 40-50 minutos para 73% de metanol em 1% de ácido acético; e de 50-60 minutos para 100% de metanol. A fração de 34-40 minutos foi coletada. Após a evaporação do solvente em um rotavapor, a amostra foi utilizada na análise por cromatografia gasosa, acoplada a um espectro de massas (GC-EIMS). Para a derivatização do metil-éster, 2-4 mL de metanol e 50-100 μ L de CH₂N₂ foram adicionados, e deixados por 30 minutos à temperatura ambiente. Após os solventes serem eliminados sob N₂, o extrato foi dissolvido em 5 μ L de hexano e 1 μ L desse total foi injetado no sistema GC-MS (PerkinElmer Elite-5MS). O programa utilizado no GC foi 100-190°C a 15°C por minuto e, depois, 190-260°C a 5°C por minuto. A caracterização foi realizada por comparação de ABA autêntico comercial (Sigma Chem. Co., St Louis, MO, USA), em que Me do ABA endógeno bacteriano foi comparado ao Me deuterado do hormônio-padrão. As análises foram realizadas em duplicata.

3.3.5. RESULTADOS

3.3.5.1. **Ácido abscísico é produzido pela bactéria endofítica *G.diazotrophicus***

A biossíntese de ABA foi identificada na bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 por meio da quantificação desse hormônio, em GC-EIMS, em uma suspensão bacteriana crescida em meio quimicamente definido. A figura 36 mostra o espectro de massas de Me-ABA. O espectro confirma a produção do hormônio ácido abscísico em *G. diazotrophicus*, quando comparado ao espectro-padrão de ABA autêntico, utilizado como controle.

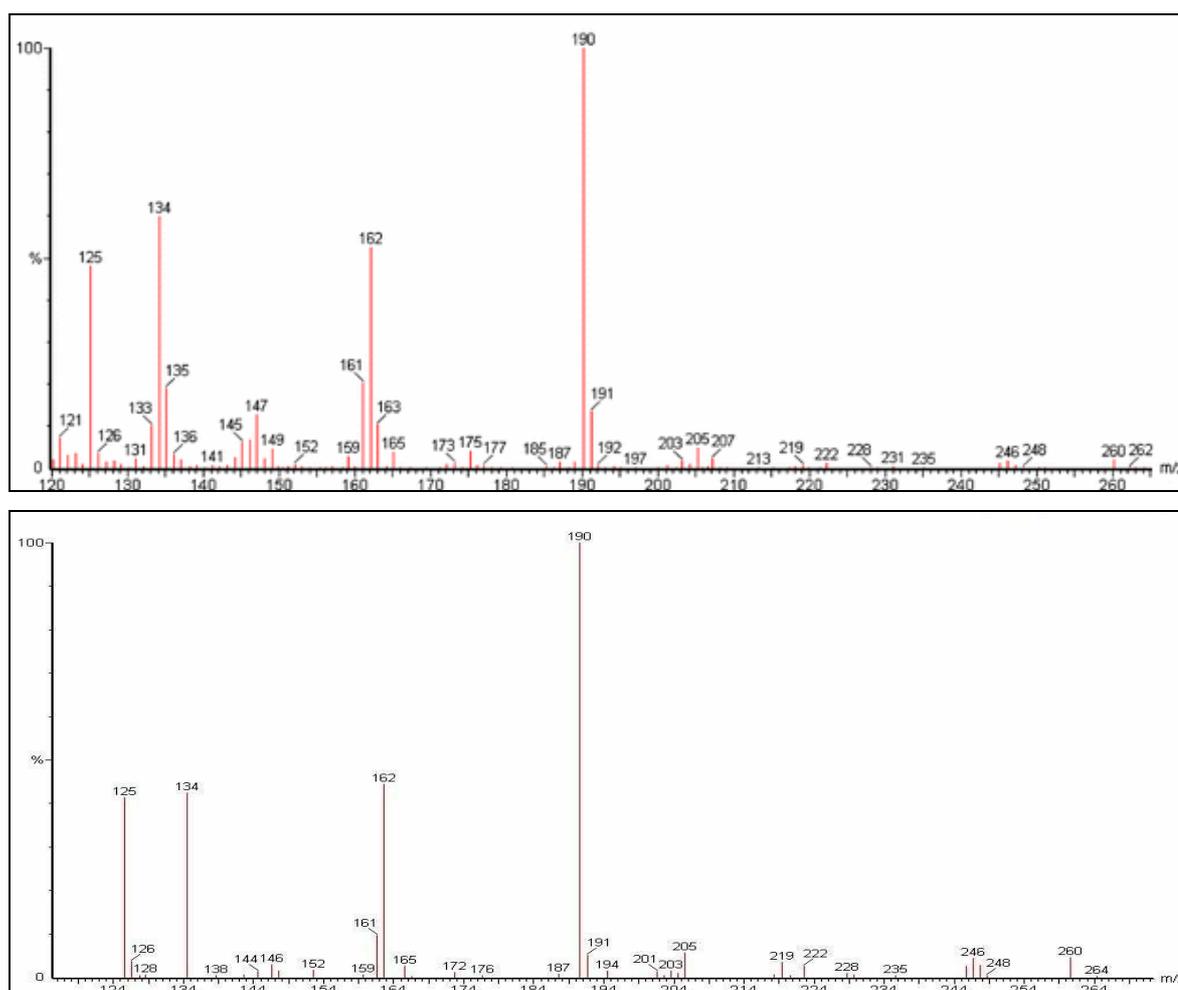


Figura 36 - Espectro de massas de ABA proveniente da cultura de *G. diazotrophicus* PAL5 (acima) comparado ao espectro-padrão de ABA comercial (abaixo).

Adicionalmente, a bactéria foi submetida a diferentes condições de crescimento, mimetizando os estresses osmótico e salino (sacarose e NaCl). Após 3 e 5 dias de crescimento nas condições citadas, foi realizada a quantificação de ABA. Observa-se, na tabela 6, que a bactéria apresentou níveis consideráveis do hormônio somente na presença de 10% de sacarose, quando

comparados aos níveis das plantas-controle (Meio LGIP). Verificou-se aumento na biossíntese de ABA aos 3 e 5 dias, apresentando um acréscimo no teor de ABA de três a quatro vezes, respectivamente. No mesmo tratamento, acrescido de NaCl, também observou-se a presença de ABA, no 5º dia.

Tabela 6 - Teor de ABA, em ng mL^{-1} , de *G. diazotrophicus* PAL5 crescida em meio quimicamente definido (LGIP), contendo sacarose e NaCl

Tratamento	03 Dias	05 Dias
Sacarose 0,5 %	0,600 \pm 0,032	0,236 \pm 0,083
Sacarose 0,5 % + NaCl	0,756 \pm 0,047	-
Sacarose 10 %	2,861 \pm 0,521	3,623 \pm 0,619
Sacarose 10 % + NaCl	0,695 \pm 0,019	1,177 \pm 0,532
Meio LGIP	0,839 \pm 0,016	0,825 \pm 0,007

3.3.5.2. O ABA bacteriano inibe a germinação de sementes de *Arabidopsis*

No intuito de verificar se o ABA bacteriano apresentava papel fisiológico similar ao do ABA vegetal, no que diz respeito à inibição da germinação. Sementes silvestres (*wild-type*) da cultivar Columbia e sementes de mutantes *abi1*, insensíveis ao ABA, foram germinadas em meio MS líquido, contendo 2 μM de ABA e exudado bacteriano. A figura 37 mostra que sementes silvestres apresentaram inibição na germinação na presença de ABA. A mesma observação pôde ser verificada nas sementes selvagens germinadas na presença do exudado de bactéria. Em contraste, todas as sementes do mutante *abi1* germinaram na presença de ABA e do exudado bacteriano.

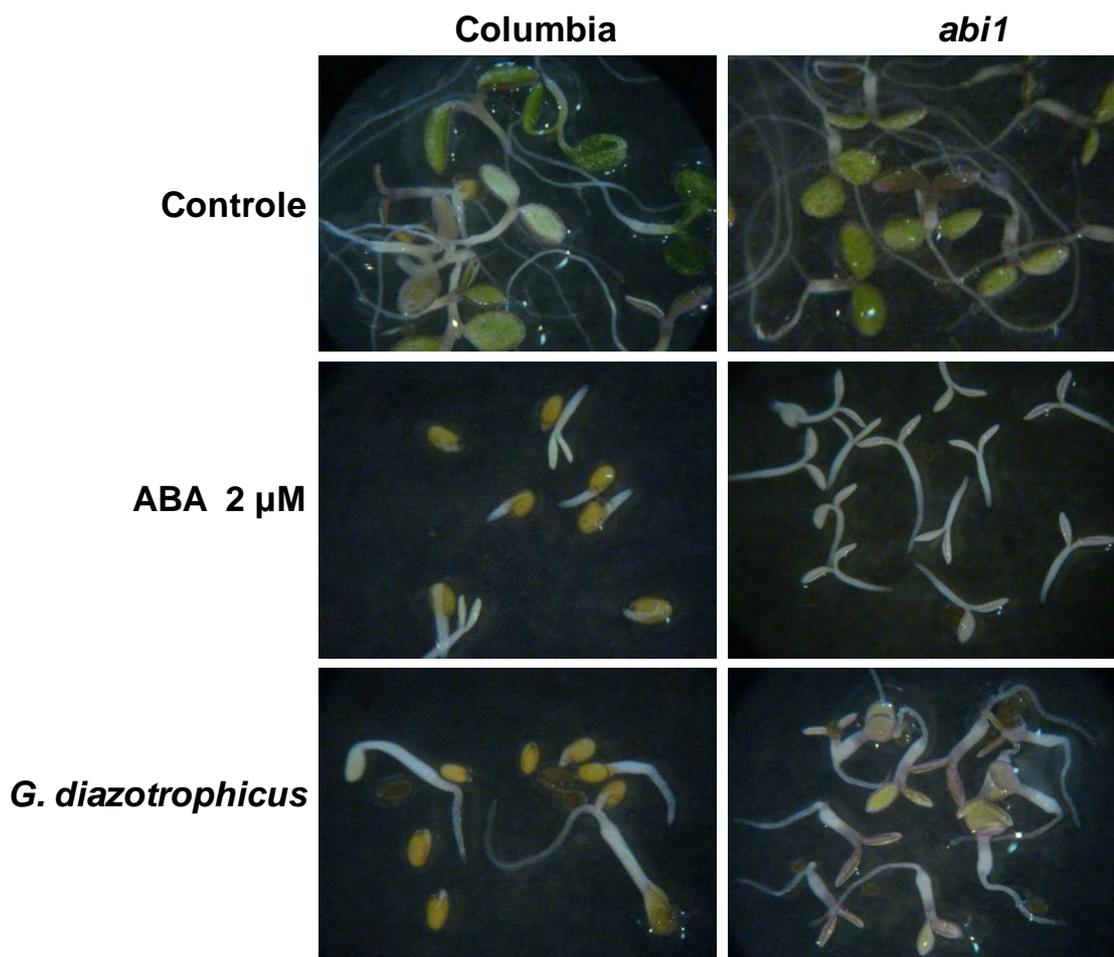


Figura 37 - Germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana* (Columbia e *abi1*) em placas de petri contendo meio MS líquido, acrescido de ABA 2 μM e do exudado bacteriano filtrado.

3.3.5.3. Níveis endógenos de ABA são aumentados em plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *G. diazotrophicus*

Os níveis endógenos de ABA foram quantificados em plantas de cana-de-açúcar inoculadas e submetidas aos estresses salino e hídrico (tabela 7). Em plantas expostas à salinidade e desidratadas, observou-se um aumento de 90 e 350%, respectivamente. Em plantas inoculadas, esse acréscimo também foi bastante considerável, apresentando um aumento de 230%. Com relação às plantas inoculadas e estressadas, observaram-se altos níveis endógenos de ABA, verificando-se um acréscimo de 380% sob desidratação, e 390% sob salinidade.

Tabela 7 - Níveis de ABA endógeno, em ng mL⁻¹, de plantas de cana-de-açúcar inoculadas e submetidas aos estresses hídrico e salino

Tratamento	Teor de ABA (ng g ⁻¹)
Controle	93
Desidratação	178
NaCl	415
Inoculada	215
Inoculada + Desidratação	449
Inoculada + NaCl	456

3.3.5.4. Genes responsivos a ABA apresentam expressão diferencial na presença da bactéria

Os genes selecionados tiveram sua expressão diferencial analisada *in silico*, em uma biblioteca de cDNAs de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *G. diazotrophicus* (SUCEST). O *Northern* eletrônico foi realizado mediante a análise computacional das frequências de ESTs na biblioteca de cDNA (AD1). Os *clusters* SCRFLR2034A04.g, SCSBHR1052C05.g, SCEPRZ1011A11.g e SCEQRT1027E02.g, encontrados no SUCEST, ortólogos putativos às proteínas GPA1, PLC1, PP2C e CDPK1, respectivamente, apresentaram-se fortemente regulados na presença da bactéria, quando comparados aos clusters das demais bibliotecas (figura 38).

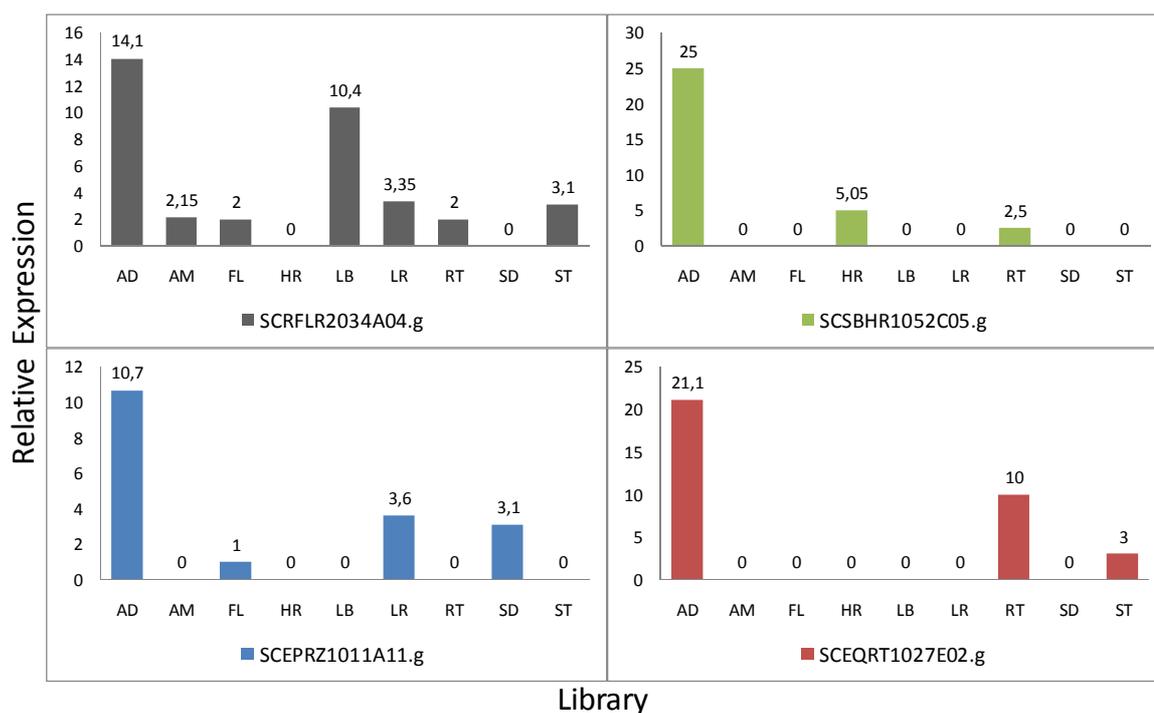


Figura 38 - Northern *in silico* de ESTs, correspondendo aos genes GPA1 (SCRFLR2034A04.g), PLC1 (SCSBHR1052C05.g), PP2C (SCEPRZ1011A11.g) e CDPK1 (SCEQRT1027E02.g) de cana-de-açúcar, usando o banco de dados do SUCEST.

3.3.6. DISCUSSÃO

Uma importante característica das bactérias endofíticas é a biossíntese de composto análogos aos hormônios vegetais, como auxina (Fuentes-Ramirez *et al.*, 1993), giberelina (Bastian *et al.*, 1998) e citocininas (Bazzicalupo e Okon, 2000). Algumas dessas bactérias também produzem a enzima 1-amino ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase e metabolizam ACC, um precursor do etileno (Mayak *et al.*, 2004). A síntese desses hormônios, pelas células bacterianas, poderia atuar na modulação dos níveis endógenos nas plantas hospedeiras. Com o desequilíbrio desses níveis hormonais poderia haver alterações na resposta vegetal aos diferentes estresses ou à condição ambiental imposta.

No intuito de verificar se bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 é capaz de biossintetizar o hormônio ABA, uma suspensão

bacteriana, crescida em meio quimicamente definido (LGIP), foi utilizada para identificar e quantificar ABA, pelo uso de GC-EIMS.

A biossíntese de ABA foi identificada no endófito, como mostra o espectro de massas de Me-ABA (figura 36). O espectro confirma a produção do hormônio ácido abscísico em *G. diazotrophicus*, quando comparado ao espectro-padrão de ABA autêntico, utilizado como controle.

Adicionalmente, a bactéria foi submetida a diferentes concentrações de sacarose, na presença ou ausência de NaCl, durante 3 e 5 dias. Os dados obtidos (tabela 6) evidenciaram que a bactéria apresentou níveis consideráveis do hormônio somente na presença de 10% de sacarose, quando comparados com os níveis das plantas-controle (Meio LGIP). Verificou-se aumento na biossíntese de ABA, apresentando um acréscimo no teor de ABA de três a quatro vezes, respectivamente. No mesmo tratamento, acrescido de NaCl, também observou-se a presença de ABA, no quinto dia. Tal resultado indica que *G. diazotrophicus* aumenta seus níveis de ABA, em resposta a um possível estresse osmótico. O mesmo resultado é bastante caracterizado em plantas. O ABA é produzido sob condições de desidratação e possui uma função importante em resposta ao estresse hídrico (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Xiong *et al.*, 2002; Finkelstein *et al.*, 2002). A importância do ABA para a bactéria ainda é desconhecida. Dessa forma, estudos posteriores seriam interessantes e necessários, no intuito de verificar o papel desse hormônio durante o estresse osmótico na bactéria, bem como seu envolvimento no metabolismo bacteriano.

O ABA regula vários aspectos do desenvolvimento vegetal, como maturação de sementes, dormência, germinação, abertura estomática, adaptação a estresses abióticos (Yoshida *et al.*, 2006). Com o objetivo de verificar se o ABA bacteriano apresenta o mesmo papel fisiológico na inibição da germinação, sementes de *Arabidopsis thaliana* foram germinadas em um exudado filtrado, proveniente de uma cultura de *G. diazotrophicus* (figura 37).

O exudado foi suficiente para inibir a germinação das sementes de plantas silvestres. Os resultados obtidos foram confirmados quando sementes de *abi1* apresentaram total germinação na presença de ABA e do exudado. Isso indica que o ABA bacteriano apresenta função semelhante à do hormônio ABA proveniente de plantas, no que diz respeito à inibição da germinação de sementes.

Para verificar se os níveis endógenos de ABA eram aumentados em plantas inoculadas, realizou-se a quantificação do hormônio, em plantas de cana-de-açúcar colonizadas pela bactéria e submetidas à salinidade e à desidratação (tabela 7).

A concentração de ABA aumentou em plantas estressadas. No entanto, plantas associadas com a bactéria *G. diazotrophicus* também apresentam níveis consideráveis do hormônio, sendo essa quantidade aumentada em plantas inoculadas e estressadas. Cabe ressaltar que, na presença da bactéria, as plantas expostas ao sal apresentam níveis de ABA similares aos níveis das plantas expostas à salinidade e não-inoculadas. Porém, as plantas desidratadas dobraram os níveis de ABA na presença da bactéria.

Muitos genes de plantas são regulados em resposta ao ABA. Para verificar uma possível regulação de genes responsivos ao ABA, durante a colonização por *G. diazotrophicus*, quatro *clusters* putativos ortólogos aos genes envolvidos na resposta ao hormônio foram selecionados: GPA1 (G-protein α -subunit), receptor envolvido no fechamento estomático mediado por ABA (Grill e Christmann, 2007); PLC1 (phospholipase C1), descrito como um sinal secundário para potencializar a resposta primária ao ABA (Sanchez e Chua, 2001); PP2C (protein phosphatase 2C), regulador da resposta ao ABA na germinação de sementes (Yoshida et al, 2006); e CDPK1 (proteína quinase dependente de Ca^{2+}), sensores de Ca^{2+} responsivos a hormônios (Mehta et al., 2007).

A análise *in silico* da expressão gênica pode ser feita baseada na frequência de *sequence tags* em bibliotecas de cDNA, permitindo a comparação de padrões de expressão de genes específicos (Ewing et al., 1999). Para isso, a metodologia utilizada neste trabalho permitiu quantificar os níveis de expressão dos genes GPA1, PLC1, PP2C e CDPK1, na biblioteca específica de plantas inoculadas com *G. diazotrophius*, oriundas do Banco SUCEST. Como podem ser visualizados, na figura 38, todos os genes analisados apresentaram indução na biblioteca AD1, mostrando serem regulados na presença de *G. diazotrophicus*. Essa alta expressão verificada em AD1 confirma a presença de ABA nas plantas de cana-de-açúcar e sugere que a presença da bactéria estaria ocasionando perturbações nas vias de sinalização, nas quais as proteínas analisadas participam. Todavia, não está claro o papel do hormônio ABA durante a interação, bem como os demais hormônios sintetizados pela bactéria também não foram

totalmente elucidados. Porém, os resultados dos dois primeiros trabalhos permitem especular que esse desbalanço hormonal, ocasionado pela bactéria, afetou a resposta de cana-de-açúcar aos estresses salino e hídrico. Nesse contexto, verifica-se que a bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 não é benéfica em algumas condições ambientais.

Nos últimos anos, algumas evidências do envolvimento de hormônios têm sido demonstradas na interação planta-bactéria (Valls *et al.*, 2006; Joo *et al.*, 2005). Em *Arabidopsis*, mutantes na via de biossíntese ou insensíveis ao ABA mostraram-se mais resistentes à bactéria *Pseudomonas* DC3000 (de Torres-Zabala *et al.*, 2007), indicando que o hormônio aumenta a susceptibilidade do vegetal durante a interação. Essa alteração poderia também estar ocorrendo em plantas colonizadas por *G. diazotrophicus*. Nesse caso, a bactéria poderia biossintetizar ABA para subverter ou reduzir a resposta da planta à colonização. Porém, como o endófito não causa nenhum dano aparente, a colonização é bem sucedida. Contudo, durante a interação, outros hormônios são produzidos, como giberelinas e auxinas. Esse desequilíbrio hormonal poderia também acarretar alterações na resposta vegetal.

Enfim, o efeito de cada hormônio ainda não foi totalmente esclarecido. Atualmente, os estudos realizados evidenciam a participação dos mesmos na modulação da defesa vegetal. Nesse contexto, experimentos posteriores poderiam ser realizados para avaliar o papel desses hormônios durante a interação.

3.3.7. CONCLUSÕES

- A bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 produz ABA *in vitro*, em meio de cultura quimicamente definido (LGIP).
- O ABA bacteriano inibe a germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana*.

- Os níveis endógenos de ABA são aumentados em plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *G. diazotrophicus*, sendo esses níveis ainda maiores em plantas inoculadas e expostas à salinidade e à desidratação.
- Os genes GPA1, PLC1, PP2C e CDPK1, responsivos ao ABA, são induzidos na biblioteca de cDNA de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com o endófito (AD1). Os resultados sugerem a biossíntese do ABA bacteriano em plantas colonizadas por *G. diazotrophicus*, bem como a regulação dos genes citados, na presença do hormônio.

3.3.8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad I., Sharma J., Ahmad F. (2004) Isolation and characterization of resistance traits of indigenous strains of *Acetobacter diazotrophicus* associated with sugarcane. *Sugar Tech* 6:41-46.
- Bastian F., Cohen A., Piccoli P., Luna V., Baraldi R., Bottini R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation* 24:7-11.
- Bazzicalupo M., Okon Y. (2000) Associative and endophytic symbiosis. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Kluwer academic publishers.
- Berli F.J., Moreno D., Piccoli P., Hespanhol-Viana L., Silva M.F., Bressan-Smith R.E., Cavagnaro J.B., Bottini R. (2010) Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant, Cell and Environment* 33: 1-10
- Bottini R., Cassán F., Piccoli P. (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotech* 65: 497-503.

- Cassán F., Bottini R., Schneider G., Piccoli P. (2001a) *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycone to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiology* 125: 2053-2058.
- Cassán F., Lucangeli C., Bottini R., Piccoli P. (2001b) *Azospirillum* sp. Metabolize [17,17-²H₂] Gibberellin A20 to [17,17-²H₂] Gibberellin A1 in vivo in dy rice mutant seedlings. *Plant Cell Physiology* 42: 763-767.
- Cohen A.C., Bottini R., Piccoli P. (2008) *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture médium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regulation* 54:97-103.
- De Torres-Zabala M., Truman W., Bennett M.H., Lafforgue G., Mansfield J.W., Egea P.R., Bögre L., Grant M. (2007) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO Journal* 26: 1434-1443.
- Ewing R.M., Kahla A.B., Poirot O., Lopez F., Audic S., Claverie J.M. (1999) Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Research* 9:950-959.
- Finkelstein R.R., Gampala S.S., Rock C.D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell (Suppl)* 14: S15-S45.
- Fuentes-Ramirez L.E., Jimenez-Salgado T., Abarca-Ocampo I.R., Caballero-Mellado J. (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indole-acetic acid-producing bacterium isolated from sugarcane cultivars in Mexico. *Plant and Soil* 154: 145-150.
- Glick B.R., Bashan Y. (1997) Genetic manipulation of plant growthpromoting bacteria to enhance biocontrol of fungal phytopathogens. *Biotechnology Advances* 15:353-378.
- Grant M.R., Jones J.D.G. (2009) Hormone (Dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 324:750-752.
- Grill E., Christmann A. (2007) A plant receptor with a big family. *Nature* 315:1676-1677.

- Hurek T., Handley L.L., Reinhold-Hurek B., Piche Y. (2002) *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 15:233-242.
- Iniguez A.L., Dong Y.M., Triplett E.W. (2004) Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17:1078-1085.
- Intorne AC, de Oliveira MV, Lima ML, da Silva JF, Olivares FL, de Souza Filho GA (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Archives of Microbiology* 191:477-83.
- Joo, J.H., Wang, S.Y., Chen, J.G., Jones, A.M., and Fedoroff, N.V. (2005). Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone. *Plant Cell* 17: 957-970.
- Kurosawa E. (1926) Experimental studies on the nature of the substance excreted by "bakanae" fungus. *Natural History Society of Formosa* 16:213-227.
- Mayak S., Tirosh T., Glick B.R. (2004) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:565-572.
- Mehta A., Silva M.S., Guidetti-Gonzalez S., Carrer H., Takita M.A, Martins NF (2007) Signaling pathways in a Citrus EST database. *Genetics and Molecular Biology* 30:734-751.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- O'Donnell P.J., Schmelz E.A., Moussatche P., Lund S.T., Jones J.B., Klee H.J. (2003) Susceptible to intolerance – a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response. *Plant Journal* 33:245-257.
- Pedraza RO (2008) Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 125:25-35.

- Persello-Cartieaux F., Nussaume L., Robaglia C. (2003) Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment* 26:189-199.
- Piñon D., Casas M., Blanch M., Fontaniella B., Blanco Y., Vicente C., Solas M.T., Legaz M.E. (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus* a sugarcane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugarcane pathogen. *Research in Microbiology* 153:345-351.
- Robert-Seilaniantz A., Navarro L., Bari R., Jones J.D. (2007) Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* 10:372-379.
- Sanchez J.P., Chua N.H. (2001) Arabidopsis PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals. *Plant Cell* 13:1143-1154.
- Schmelz E.A., Engelberth J., Alborn H.T., O'Donnell P., Sammons M., Toshima H., Tumlinson J.H. (2003) Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100:10552-10557.
- Seo M., Koshiha T. (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7:41-48.
- Sessitsch A., Reiter B., Berg G. (2004) Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology* 50:239-249.
- Sevilla M., Burris R.H., Gunapala N., Kennedy C. (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif⁻ mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 358-366.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58:221-227.
- Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Review* 31:425-448.
- Sturz A.V., Christie B.R., Nowak J. (2000) Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Science* 19:1-30.

- Travaglia C., Cohen A.C., Reinoso H., Castillo C., Bottini R. (2007) Exogenous abscisic acid enhances yield in wheat grown under field conditions of soil water restriction by increasing carbohydrate accumulation and redistribution to the grains. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 285-289.
- Valls M., Genin S., Boucher C. (2006) Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens* 2: 798-807.
- Xiong L.M., Schumaker K.S., Zhu J.K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14:S165-S183.
- Yoshida T., Nishimura N., Kitahata N., Kuromori T., Ito T., Asami T., Shinozaki K., Hirayama T. (2006) ABA-Hypersensitive Germination3 Encodes a Protein Phosphatase 2C (AtPP2CA) That Strongly Regulates Abscisic Acid Signaling during Germination among Arabidopsis Protein Phosphatase 2Cs. *Plant Physiology* 140:115-126.
- Zeevaart J.A.D., Creelman J.A. (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:439-473.

4. RESUMOS E CONCLUSÕES

Bactérias endofíticas podem interferir na fisiologia da planta, resultando em alterações no metabolismo vegetal. Como pode ser verificado, neste trabalho, a bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 interfere na resposta de plantas de cana-de-açúcar expostas aos estresses salino e hídrico. Os parâmetros avaliados permitiram verificar que plantas colonizadas apresentam maior susceptibilidade à salinidade e seca, sendo esta sensibilidade maior em plantas sob desidratação. Uma possível explicação seria a de que o endófito inibe o fechamento estomático dessas plantas colonizadas e expostas aos estresses salino e hídrico. Tal hipótese foi sustentada pela regulação dos genes que codificam as proteínas SAPK6 (SnRK2.4) e CO11, envolvidas no fechamento estomático via ABA e MeJA, respectivamente. Adicionalmente, a biossíntese de ABA foi identificada e quantificada em meio de cultura quimicamente definido (LGIP) da bactéria endofítica *G. diazotrophicus* PAL5. A presença do endófito fez com que plantas inoculadas dobrassem a concentração endógena de ABA, sendo ainda maior em plantas colonizadas e expostas à seca.

Diante do exposto, o entendimento da fisiologia da interação planta-endófito é imprescindível no contexto do manejo agrícola, já que, em condições adversas, poderiam modular de forma maléfica, podendo ocasionar a redução da produtividade, considerada indesejável. Nesse sentido, o uso indiscriminado de endofíticos na agricultura pode vir a ser prejudicial, resultando ainda em problemas agroecônômicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams P., Thomas J.C., Vernon D.M., Bohnert H.J., Jensen R.G. (1992) Distinct cellular e organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiology* 33:1215-1223.
- Ahmad I., Sharma J., Ahmad F. (2004) Isolation and characterization of resistance traits of indigenous strains of *Acetobacter diazotrophicus* associated with sugarcane. *Sugar Tech* 6:41-46.
- Albrecht V., Ritz O., Linder S., Harter K., Kudla J. (2001) The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca²⁺-regulated kinases. *EMBO Journal* 20:1051-1063
- Albrecht V., Weini S., Blazevic D., D'Angelo C., Batistic O., Kolukisaoglu U., Bock R., Schulz B., Harter K., Kudla J. (2003) The calcium sensor CBL1 integrates plant responses to abiotic stresses. *Plant Journal* 36:457-470.
- Allakhverdiev S.I., Sakamoto A., Nichiyama Y., Inaba M., Murata N. (2000) Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystems I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiology* 123:1047-1056.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402.

- Anderberg R.J., Walker-Simmons M.K. (1992) Isolation of a wheat cDNA clone for an abscisic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89:10183-10187.
- Anderson J.M., Aro E.M. (1994) Grana stacking and protection of Photosystem II in thylakoid membranes of higher plant leaves under sustained high irradiance: An hypothesis. *Photosynthesis Research* 41: 315-326.
- Anderson J.P., Badruzaufari E., Schenk P.M., Manners J.M., Desmond O.J., Ehlert C., Maclean D.J., Ebert P.R., Kazan K. (2004) Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:3460-3479.
- Andersson B., Aro E.M. (2001) Photodamage and D1 protein turnover in photosystem II. In EM Aro, B Andersson, eds, *Advances in Photosynthesis and Respiration-Regulation of Photosynthesis*, Vol 11. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 377-393.
- Andrews J.H., Harris R.F. (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review Phytopathology* 38:145-180.
- Apel K., Hirt H. (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 55, 373-399.
- Arruda, P. (2001) Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology* 5:122-127.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplast: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50:601-639.
- Aurora A., Sairam R.K., Srivastava G.C. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82: 1227-1238.
- Ausubel F.M. (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology* 6:973-79.
- Azevedo R.A., Alas R.M., Smith R.J., Lea P.J. (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation,

- in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104: 280-292.
- Babani F., Lichtenthaler H.K. (1996) Light-induced and age-dependent development of chloroplasts in etiolated barley leaves as visualized by determination of photosynthetic pigments, CO₂ assimilation rates and different kinds of chlorophyll fluorescence ratios. *Journal of Plant Physiology* 148: 555-566.
- Baldani J.I., Baldani V.L. (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77: 549-579
- Barber J., Nield J., Morris E.P., Zheleva D., Hankamer B. (1997) The structure, function and dynamics of photosystem two. *Physiologia Plantarum* 100: 817-827.
- Barbosa R.R. (2008) Efeito da colonização por *Gluconacetobacter diazotrophicus* na resposta de plantas de cana-de-açúcar ao estresse salino. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) Campos dos Goytacazes/RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 68p.
- Bari R., Jones J.D. (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69:473-488.
- Barka A., Belarbi E.A., Hachet C., Nowak J., Audran J.C. (2000) Enhancement of in vitro growth and resistance to Gray mould of *Vitis vinifera* L. co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 186:91-95.
- Barka E.A. (2001) Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C. *Australian Journal Plant Physiology* 28: 785-791.
- Bastian F., Cohen A., Piccoli P., Luna V., Baraldi R., Bottini R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation* 24:7-11.
- Battin T.J., Sloan W.T., Kjelleberg S., Daims H., Head I.M., Curtis T.P., Eberl L. (2007) Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nature Reviews Microbiology* 5:7-12.

- Baudet A.C., Dias Z. (2006) Analysis of slipped sequences in EST projects. *Genetics and Molecular Research*. 5:169-181.
- Bazzicalupo M., Okon Y. (2000) Associative and endophytic symbiosis. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Kluwer academic publishers.
- Behera R.K., Choudhury N.K. (2001) Photoinhibition of photosynthesis: Role of carotenoids in photoprotection of chloroplasts. *Photosynthetica* 39:481-488.
- Behera R.K., Mishra P.C., Choudhury N.K. (2002) High irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. *Journal of Plant Physiology* 159:967-973.
- Berger S., Benediktyova Z., Matous K., Bonfig K.B., Mueller M.J., Nedbal L., Roitsch T. (2007) Visualization of dynamics of plant–pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 58: 797-806.
- Berli F.J., Moreno D., Piccoli P., Hespanhol-Viana L., Silva M.F., Bressan-Smith R.E., Cavagnaro J.B., Bottini R. (2010) Abscisic acid is involved in the response of grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Malbec leaf tissues to ultraviolet-B radiation by enhancing ultraviolet-absorbing compounds, antioxidant enzymes and membrane sterols. *Plant, Cell and Environment* 33: 1-10
- Bertalan M., Albano R., Pádua V., Rouws L., Rojas C., Hemerly A., Teixeira K., Schwab S., Araujo J., Oliveira A., França L., Magalhães V., Alquéres S., Cardoso A., Almeida W., Loureiro M.M., Nogueira E., Cidade D., Oliveira D., Simão T., Macedo J., Valadão A., Dreschsel M., Freitas F., Vidal M., Guedes H., Rodrigues E., Meneses C., Brioso P., Pozzer L., Figueiredo D., Montano H., Junior J., de Souza Filho G., Flores V.M.Q., Ferreira B., Branco A., Gonzalez P., Guillobel H., Lemos M., Seibel L., Macedo J., Alves-Ferreira M., Sachetto-Martins G., Coelho A., Santos E., Amaral G., Neves A., Pacheco A.B., Carvalho D., Lery L., Bisch P., Rössle S.C., Ürményi T., Pereira A.R., Silva R., Rondinelli E., von Krüger W., Martins O., Baldani J.I., Ferreira P.C.G. (2009) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *BMC Genomics* 10:450

- Bohnert H.J., Jensen R.G. (1996) Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* 14: 89-97.
- Bolhàr-Nordenkamp H.R., Long S.P., Baker N.R., Öquist G., Schreibers U., Lechner E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: A review of current instrumentation. *Functional Ecology* 3:497-514.
- Bolhàr-Nordenkamp H.R., Öquist G. (1993) Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Hall, D., Scurlock, J.M.O.; Bolhàr-Nordenkamp, H.R.; Leegood, C. R. C.; Long, S.P. (eds), *Photosynthesis and production in a changing environment*, Chapman and Hall, London, p. 193-206.
- Borsani O, Valpuesta V, Botella MA (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol.* 126:1024-1030.
- Bottini R., Cassán F., Piccoli P. (2004) Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl Microbiol Biotech* 65: 497-503.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annals of Biochemistry* 72: 255-260.
- Bray EA, Bailez-Serres J, Weretilnyk E (2000) Response to abiotic stresses. In: B. Buchanan, W. Gruissem and R. Jone, Editors, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, Rockville pp. 1158–1203.
- Brooks D.M., Bender C.L., Kunkel B.N. (2005) The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* 6:629-639.
- Burd G.I., Dixon D.G., Glick B.R. (1998) A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 10, p. 3663-3668.
- Burger-Wiersma T., Veenhuls M., Korthals H.J., van de Wiel C.C.M., Mur L.R. (1986) A new prokaryote containing chlorophylls *a* and *b*. *Nature* 320: 262-264.

- Butler W.L., Kitajima M. (1975) A tripartite model for chloroplast fluorescence. In: Proceedings of the 3rd International congress on Photosynthesis. Editora M. Avron, Elsevier Amsterdam. p.13-24.
- Canvin D.T. (1990) Photorespiration and CO₂ concentrating mechanisms. In DT Dennis, DH Turpin, eds, Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Longman Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK, p. 253-273.
- Cao X., Costa L.M., Biderre-Petit C., Kbhaya B., Dey N., Perez P., McCarty D.R., Gutierrez-Marcos J.F., Becraft P.W. (2007) Abscisic acid and stress signals induce *Viviparous1* expression in seed and vegetative tissues of maize. *Plant Physiology* 143:720-731.
- Cassán F., Bottini R., Schneider G., Piccoli P. (2001a) *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycone to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiology* 125: 2053-2058.
- Cassán F., Lucangeli C., Bottini R., Piccoli P. (2001b) *Azospirillum* sp. Metabolize [17,17-²H₂] Gibberellin A₂₀ to [17,17-²H₂] Gibberellin A₁ in vivo in dy rice mutant seedlings. *Plant Cell Physiology* 42: 763-767.
- Cavalcante V.A., Döbereiner J. (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil* 108:23-31.
- Cavalcanti F.R., Oliveira J.T.A., Martins-Miranda A.S., Viégas R.A., Silveira J.A.G. (2004) Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytologist* 163: 563-671.
- Chaerle L., Hagenbeek D., De Bruyne E., Valcke R., van der Straten D. (2004) Thermal and chlorophyll-fluorescence imaging distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. *Plant Cell Physiology* 45: 887-896.
- Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. (2009) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. 103: 551-560.
- Cheong Y.H., Kim K.N., Pandey G.K., Gupta R., Grant J.J., Luan S. (2003) CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:1833-1845.

- Chisholm S.T., Coaker G., Day B., Staskawicz B.J. (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803-814.
- Close D.C., McArthur C. (2002) Rethinking the role of many plant phenolics—protection against photodamage not herbivores? *OIKOS* 99:166-172.
- Cohen A.C., Bottini R., Piccoli P. (2008) *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture médium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regulation* 54:97-103.
- Cohen I., Knopf J.A., Irihimovitch V., Shapira M. (2005) A proposed mechanism for the inhibitory effects of oxidative stress on Rubisco assembly and its subunit expression. *Plant Physiology* 137: 738-746.
- Conrath U., Beckers G.J.M., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., Newman M.A., Pieterse C.M.J., Poinssot B., Pozo M.J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L., Mauch-Mani B. (2006) Priming: Getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1062-1071.
- Creelman R.A., Mullet J.E. (1995) Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92: 4114-4119.
- Cui J., Bahrami A.K., Pringle E.G., Hernandez-Guzman G., Bender C.L., Pierce N.E., Ausubel F.M. (2005) *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses against pathogens and herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102:1791-1796.
- Cushman J.C., Bohnert H.J. (2000) Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* 3:117-124.
- De Bary A. (1866) Morphologie und physiologie der plize. Flechten und Myxomyceten V. II, Englemann, Leipzig.
- De Pascale S., Maggio A., Fogliano V., Ambrosino P., Ritieni A. (2001) Irrigation with saline water improves carotenoids content and antioxidant activity of tomato, *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 76:447-453.
- De Souza Filho G.A., Ferreira B.S., Dias J.M.R., Queiroz K.S., Branco A.T., Bressan-Smith R.E., Oliveira J.G., Garcia A.B. (2003) Accumulation of SALT

- protein in rice plants as response to environmental stresses. *Plant Science* 164: 623-628.
- De Torres-Zabala M., Truman W., Bennett M.H., Lafforgue G., Mansfield J.W., Egea P.R., Bögre L., Grant M. (2007) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO Journal* 26: 1434-1443.
- Devlin R.M. (1976) Factores que influyen sobre la intensidad de la fotosíntesis. In: Fisiología Vegetal. Editora Omega, S.A., Barcelona, 3ª edición, p. 245-259.
- Dhindsa R.S., Matowe W. (1981) Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defense against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 32:79-91.
- D'Hont A., Ison D., Alix K., Roux C., Glaszmann J.C. (1998) Determination of basic chromosome numbers in the genus *Saccharum* by physical mapping of ribosomal RNA genes. *Genome* 41:221-225.
- Dillewijn C. (1952) Botany of sugarcane. Waltham: Chronica Botanica, p.136-141. 359p.
- Ding X., Richter T., Chen M., Fuji H., Seo Y.S., Xie M., Zheng X., Kanrar S., Stevenson R.A., Dardick C., Li Y., Jiang H., Zhang Y., Yu F., Bartley L.E., Chern M., Bart R., Chen X., Zhu L., Farmerie W.G., Gribskov M., Zhu J.K., Fromm M.E., Ronald P.C., Song W.Y. (2009) A rice kinase protein interaction map. *Plant Physiology* 149:1478-1492.
- Döbereiner J., Reis V.M., Paula M.A., Olivares F.L. (1993) Endophytic diazotrophs in sugarcane, cereals and tuber plants. In: Palacios R., Mora J. and Newton W. (Eds), New horizons in nitrogen fixation. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture 17, Dordrecht: Kluwer, p. 671-676.
- Dong J., Chen C., Chen Z. (2003) Expression profiles of the *Arabidopsis* *WRKY* gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology* 51: 21-37.
- Dong Z., Canny M.J., Mccully M.E., Roboredo M.R., Cabadilla C.F., Ortega E., Rodés R.A. (1994) Nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. *Physiology Plant*. 105:1139-1147.

- Downing K.J., Leslie G., Thomson J.A. (2000) Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2804-2810.
- Dröge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47-95.
- Eulgem T., Rushton P.J., Schmelzer E., Hahlbrock K., Somssich I.E. (1999) Early nuclear events in plant defence signaling: rapid activation by WRKY transcription factors. *EMBO Journal* 18: 4689-4699.
- Ewing R.M., Kahla A.B., Poirot O., Lopez F., Audic S., Claverie J.M. (1999) Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Research* 9:950-959.
- Fan L.M., Zhao Z., Assmann S.M. (2004) Guard cells: a dynamic signaling model. *Current Opinion in Plant Biology* 7:537-46.
- Fernandes A.J. (1984) Manual da cana-de-açúcar. Editora Publicae, 1ª edição, Piracicaba, p.1-12.
- Ferreira B.S. (2002) Identificação de genes envolvidos na resposta ao estresse salino em cana-de-açúcar através de mineração de dados no banco de dados do projeto SUCEST. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes/RJ – Brasil.
- Finkelstein R.R., Gampala S.S., Rock C.D. (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell (Suppl)* 14: S15-S45.
- Flowers T.J., Yeo A.R. (1997) Breeding for salt resistance in plants. In: P.K. Jaiwal, R.P. Singh and A. Gulati, Editors, *Strategies for Improving Salt Tolerance in Higher Plants*, Science Publishers, Inc. pp. 247-264.
- Foyer C.H., Harbinson J. (1994) Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: C. Foyer, P. Mullineaux, eds, *Causes of Photooxidative Stresses and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1-42.

- Foyer C.H., Noctor G. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Foyer C.H., Noctor G. (2000) Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist* 146: 359-388.
- Foyer C.H., Noctor G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355-364.
- Foyer C.H., Noctor G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* 17:1866-1875.
- Fuentes-Ramirez L.E., Jimenez-Salgado T., Abarca-Ocampo I.R., Caballero-Mellado J. (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indole-acetic acid-producing bacterium isolated from sugarcane cultivars in Mexico. *Plant and Soil* 154: 145-150.
- Gabrielsen E.K. (1948) Effects of different chlorophyll concentrations on photosynthesis in foliage leaves. *Physiologia. Plantarum* 1:5-37.
- Glick B.R., Bashan Y. (1997) Genetic manipulation of plant growthpromoting bacteria to enhance biocontrol of fungal phytopathogens. *Biotechnology Advances* 15:353-378.
- Gorham J., Budrewicz E., Wyn Jones R.G. (1985) Salt tolerance in the *Triticeae*: growth and solute accumulation in leaves of *Thinopyrum bessarabicum*. *Journal of Experimental Botany* 36:1021-1031.
- Gosset D.R., Millhollon E.P., Lucas M.C., Banks S.W., Marney M.M. (1994) The effects of NaCl on antioxidant enzymes activities in callus tissue of salt-tolerant and sensitive cultivars (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Cell Reports* 13:498-503.
- Grant M.R., Jones J.D.G. (2009) Hormone (Dis)harmony moulds plant health and disease. *Science* 324:750-752.
- Greenway H., Munns R. (1980) Mechanisms of salt tolerance in non-halophytes. *Annual Review of Plant Physiology* 31:149-90.

- Grill E., Christmann A. (2007) A plant receptor with a big family. *Nature* 315:1676-1677.
- Grivet L., Arruda P. (2002) Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Current Opinion in Plant Biology* 5:122-127.
- Guo Y., Halfter U., Ishitani M., Zhu J.K. (2001) Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* 13:1383-1400.
- Ha S., Moore P.H., Heinz D., Kato S., Ohmido N., Fukui K. (1999) Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescence *in situ* hybridization and imaging methods. *Plant Molecular Biology* 39: 1165-1173.
- Halford N.G., Hardie D.G. (1998) SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Molecular Biology* 37: 735-48.
- Halfter U., Ishitani M., Zhu J.K. (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:3735-3740.
- Hallman J., Quadt-Hallman A., Mahaffee W.F., Kloepper J.W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43:895-914.
- Hardie D.G. (1999) Plant protein serine/threonine kinases: classification and functions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 97-131.
- Hardie D.G. (2000) Plant protein serine/threonine protein kinases: classification into sub-families and overview of function. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology* 32:1-44.
- Hardoim P.R., van Overbeek L.S., van Elsas J.D. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16:463-471.
- Harper J.F., Sussman M.R., Schaller G.E., Putnam-Evans C., Charbonneau H., Harmon A.C. (1991) A calcium-dependent protein kinase with a regulatory domain similar to calmodulin. *Science* 252:951-954.

- Hasegawa P.M., Bressan A.S., Zhu J.K., Bohnert H.J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51:463-499.
- Havaux M., Ernez M., Lannoye R. (1988) Sélection de variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) et de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) adaptées à la sécheresse par la mesure de l'extinction de la fluorescence de la chlorophylle in vivo. *Agronomie* 8:193-199.
- Hendry G.A.F., Houghton J.D., Brown S.B. (1987) The degradation of chlorophyll – a biological enigma. *New Phytology* 107: 255-302.
- Herrmann H., Häder D.P., Ghetti F. (1997) Inhibition of photosynthesis by solar radiation in *Dunaliella salina*: relative efficiencies of UV-B, UV-A and PAR. *Plant, Cell and Environment* 20:359-365.
- Holzwarth A.R. (1991) Excited-state kinetics in chlorophyll systems and its relationship to the functional organization of the photosystems. In: Chlorophylls, editora Scheer, H., London, p.1125-1151.
- Hrabak E.M. (2000) Calcium-dependent protein kinases and their relatives. *Advances in Botanical Research* 32:185-233.
- Hrabak E.M., Chan C.W., Gribskov M., Harper J.F., Choi J.H., Halford N., Kudla J., Luan S., Nimmo H.G., Sussman M.R., Thomas M., Walker-Simmons K., Zhu J.K., Harmon A.C. (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiology* 132:666-680.
- Huai J., Wang M., He J., Zheng J., Dong Z., Lv H., Zhao J., Wang G. (2008) Cloning and characterization of the SnRK2 gene family from *Zea mays*. *Plant Cell Reports* 27:1861-1868.
- Huner N.P.A., Öquist G., Sarhan F. (1998) Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* 3: 224-230.
- Hurek T., Handley L.L., Reinhold-Hurek B., Piche Y. (2002) *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 15:233-242.

- Hwang Y.S., Bethke P.C., Cheong Y.H., Chang H.S., Zhu T., Jones R.L. (2005) A gibberellin-regulated calcineurin B in rice localizes to the tonoplast and is implicated in vacuole function. *Plant Physiology* 138:1347-1358.
- Ingram J., Bartels D. (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 377-403.
- Iniguez A.L., Dong Y.M., Triplett E.W. (2004) Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17:1078-1085.
- Intorne AC, de Oliveira MV, Lima ML, da Silva JF, Olivares FL, de Souza Filho GA (2009) Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Archives of Microbiology* 191:477-83.
- Jajoo A., Bharti S., Mohanty P. (2001) Evaluation of the specific roles of anions in electron transport and energy transfer reactions in photosynthesis. *Photosynthetica* 39:321-337.
- James E.K., Reis V.M., Olivares F.L., Baldani J.I., Döbereiner J. (1994) Infection of sugarcane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany* 45:757-766.
- Jebara S., Jebara M., Limam F., Aouani M.E. (2005) Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 162: 929-936.
- Jithesh M.N., Prashanth S.R., Sivaprakash K.R., Parida A.K. (2006) Monitoring expression profiles of antioxidant genes to salinity, iron, oxidative, light and hyperosmotic stresses in the highly salt tolerant grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. by mRNA analysis. *Plant Cell Report* 25:865-876.
- Jones J.D.G., Dangl J.L. (2006) The plant immune system. *Nature* 444:323-29.
- Joo, J.H., Wang, S.Y., Chen, J.G., Jones, A.M., and Fedoroff, N.V. (2005). Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein alpha and beta subunits in the *Arabidopsis* oxidative stress response to ozone. *Plant Cell* 17: 957-970.

- Karpinski S., Reynolds H., Karpinska B., Wingsle G., Creissen G., Mullineaux P. (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* 284:654-657.
- Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D., Bohnert H.J. (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant Cell* 13: 889-905.
- Keller B., Grote K., Adamski J. (2006) In silico Northern blot, an automated method to determine expression patterns from EST databases, reveals tissue specificity of murine 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 11. *Molecular and Cell Endocrinology* 24:242-245.
- Kim K.N., Cheong Y.H., Grant J.J., Pandey G.K., Luan S. (2003) CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15:411-423.
- Knight H. (2000) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *International Review of Cytology* 195: 269-325.
- Kobayashi Y., Yamamoto S., Minami H., Kagaya Y., Hattori T. (2004) Differential activation of rice sucrose nonfermenting 1-related protein kinase2 family by hyperosmotic stress and abscisic acid. *Plant Cell*. 16: 163-1177.
- Krause G.H., Weis E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. The basics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349.
- Kurosawa E. (1926) Experimental studies on the nature of the substance excreted by "bakanae" fungus. *Natural History Society of Formosa* 16:213-227.
- Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl J.L. (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* 22:2623-2633.
- Lam E., Pontier D., del Pozo O. (1999) Die and let live: programmed cell death in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 502-507.
- Lambais M. (2001) In silico differential display of defense-related expressed sequence tags from sugarcane tissues infected with diazotrophic endophytes. *Genetics and Molecular Biology* 24:103-111.

- Laurie-Berry N., Joardar V., Street I.H., Kunkel B.N. (2006) The *Arabidopsis thaliana* *JASMONATE INSENSITIVE 1* gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 19:789-800.
- Lawlor D.W., Cornic G. (2002) Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 275-294.
- Lee S.P., Hwang Y.S., Kim Y.J., Kwon K.S., Kim H.J. (2001) Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *Journal Biological Chemistry* 276: 29826-29832.
- Leme Júnior J., Borges J.M. (1965) Açúcar-de-cana. Imprensa Universitária, Viçosa, 328p.
- Li J., Kinoshita T., Pandey S., Ng C.K.Y., Gygi S.P., Shimazaki K., Assmann S.M. (2002) Modulation of an RNA-binding protein by abscisic-acid-activated protein kinase. *Nature* 418: 793-797.
- Li J., Wang X.Q., Watson M.B., Assmann S.M. (2000) Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287: 300-303.
- Lima G.A. (1984) Cultura da cana-de-açúcar. Editora Livroceres, 1ª edição, Fortaleza, p.15-35.
- Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK (2000) The *Arabidopsis thaliana* *SOS2* gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3730-3734.
- Liu J., Zhu J.K. (1998) An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 14960-14964.
- López-Climent M.F., Arbona A., Pérez-Clemente R.M., Gómez-Cadenas A. (2008) Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus, *Environmental and Experimental Botany* 62:176-184.
- Lorenzo O., Solano R. (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* 8:532-40.

- Lu C., Qiu N., Lu Q., Wang B., Kuang T. (2002) Does salt stress lead to increased susceptibility of photosystem II to photoinhibition and changes in photosynthetic pigment composition in halophyte *Suaeda salsa* grown outdoors? *Plant Science* 163: 1063-1068.
- Lu C.M., Vonshak A. (2002) Effects of salinity stress on photosystem II function in cyanobacterial *Spirulina platensis* cells. *Physiologia Plantarum* 114: 405-413.
- Luan S., Kudla J., Rodriguez-Concepcion M., Yalovsky S., Gruissem W. (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* [Suppl] 14:389-400.
- Ma, H.; Schulze, S.; Lee, S.; Yang, M.; Mirkov, E.; Irvine, J.; Moore, P.; Paterson, A. (2004). An EST survey of the sugarcane transcriptome. *Theor. Ap. Gen.* 108: 851-863.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444:139–158.
- Majumdar S., Ghogh S., Glick B.R., Dumbroff E.B. (1991) Activities of chlorophyllase, phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-1,5-bisphosphatase carboxylase in the primary leaves of soybean during senescence and drought. *Physiologia Plantarum* 81:473-480.
- Mansour M.M.F. (1997) Cell permeability under salt stress. In: Jaiwl PKR, Singh RP, Gulati A (eds) *Strategies for improving salt tolerance in higher plants*. Science, Enfield, USA, pp 87-110.
- Mansour M.M.F., Salama K.H.A. (2004) Cellular basis of salt tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany* 52:113-122.
- Martínez L., Caballero J., Orozco J., Martínez-Romero E. (2003) Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). *Plant Soil* 257:35-47.
- Matamoros M.A., Dalton D.A., Ramos J., Clemente M.R., Rubio M.C., Becana M. (2003) Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiology* 133: 499-509.
- Mathis P., Paillotin G. (1981) In: *The biochemistry of plants*. (eds.) Hatch, M. D.; Boardman, N. K. Academic Press, New York, 97p.

- Maule R.F., Mazza J.A., Martha Jr. G.B. (2001) Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. *Scientia Agrícola* 58: 295-301.
- Maxwell K., Johnson G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51:659-668.
- Mayak S., Tirosh T., Glick B.R. (2004) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:565-572.
- McDowell J.M., Dangi J.L. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Science* 25: 79-82.
- Mehta A., Silva M.S., Guidetti-Gonzalez S., Carrer H., Takita M.A, Martins NF (2007) Signaling pathways in a Citrus EST database. *Genetics and Molecular Biology* 30:734-751.
- Mekkaoui M.E., Monneveux P., Damania A.B. (1989) Chlorophyll fluorescence as a predictive test salt tolerance in cereals: preliminary results on durum wheat. *Rachis* 8: 16-19.
- Meloni D.A., Oliva M.A., Martinez C.A., Cambraia J. (2003) Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49: 69-76.
- Melotto M., Underwood W., He S.Y. (2008) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. *Annual Review of Phytopathology* 46:101-122.
- Melotto M., Underwood W., Koczan J., Nomura K., He S.Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion *Cell* 126:969-980.
- Menossi M., Silva-Filho M.C., Vincentz M., Van-Sluys M.A., Souza G.M. (2008) Sugarcane functional genomics: Gene Discovery for Agronomic Trait Development. *International Journal of Plant Genomics* Article ID 458732, 11p.
- Merchant S., Sawaya M.R. (2005) The light reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery. *Plant Cell* 17:648-663.

- Meyer S., Saccardy-Adji K., Rizza F., Genty B. (2001) Inhibition of photosynthesis by *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging. *Plant, Cell and Environment* 24: 947-955.
- Mhadhbi H., Jebara M., Limam F., Aouani M.E. (2004) Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 717-722
- Mikolajczyk M., Awotunde O.S., Muszynska G., Klessig D.F., Dobrowolska G. (2000) Osmotic stress induces rapid activation of a salicylic acid-induced protein kinase and a homolog of protein kinase ASK1 in tobacco cells. *Plant Cell* 12: 165–178.
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:9 405-410.
- Moller I.M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 561–591.
- Monneveux P., Mekkaoui M.E., Xu X. (1990) Physiological basis of salt tolerance in wheat. Chlorophyll fluorescence as a new tool for screening tolerant genotypes. In: Wheat Breeding. Prospects and Future Approaches. Varna, Bulgaria, p.1-33.
- Moon J., Parry G., Estelle M. (2004) The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell* 16: 3181-3195.
- Murashige T., Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Mustilli A.C., Merlot S., Vavasseur A., Fenzi F., Giraudat J. (2002) *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14:3089-3099.
- Nazaenko L.V. (1992) Effect of sodium chloride on ribulosebiphosphate carboxylase of *Euglena* cells. *Fiziologiya Rastenii* 39: 748-752.

- Netto A.T., Campostrini E., Oliveira J.G., Yamanishi O.K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya* L. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14: 203-210.
- Newton A.C., McBeath C. (1996) The impact of desiccation on chlorophyll fluorescence in detached leaves of six tropical tree species. *Photosynthetica* 32: 491-501.
- Nozawa A., Koizumi N., Sano H. (2001) An *Arabidopsis* SNF1-related protein kinase, AtSR1, interacts with a calcium-binding protein, AtCBL2, of which transcripts respond to light. *Plant Cell Physiology* 42:976-98.1
- O'Donnell P.J., Schmelz E.A., Moussatche P., Lund S.T., Jones J.B., Klee H.J. (2003) Susceptible to intolerance – a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response. *Plant Journal* 33:245-257.
- Ögren E., Baker N.R. (1985) Evaluation of a technique for the measurement of chlorophyll fluorescence from leaves exposed to continuous white light. *Plant Cell Environmental* 8: 539-547.
- Olivares F.L., Baldani V.L.D., Reis V.M., Baldani J.I., Döbereiner J. (1996) Occurrence of endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. *Biology and Fertility of Soils* 21:197-200.
- Opanasenko V., Semenova G., Agafonov A. (1999) Changes on the structure and functional state of thylakoids under the conditions of the osmotic shock. *Photosynthesis Research* 62: 281-290.
- Ozturk Z.N., Talame V., Deyholos M., Michalowski C.B., Galbraith D.W., Gozukirmizi N., Tuberosa R., Bohnert H.J. (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology* 48: 551-573.
- Pandey G.K., Cheong Y.H., Kim K.N., Grant J.J., Li L., Hung W., D'Angelo C., Weinl S., Kudla J., Luan S. (2004) The calcium sensor Calcineurin B-Like 9 modulates ABA sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:1912-1924.

- Papageorgiou G. (1975) Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In: Bioenergetics of Photosynthesis, editora Govindjee, Academic Press, New York, p.319-337.
- Paranhos S.B. (1987) Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Editora Fundação Cargill, volume 1, Campinas, 431p.
- Parida A.K., Das A.B. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- Parker J.E., Barber C.E., Fan M.J., Daniels M.J. (1993) Interaction of *Xanthomonas campestris* with *Arabidopsis thaliana*: characterization of a gene from *X. c. pv. raphani* that confers avirulence to most *A. thaliana* accessions. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 6:216-24.
- Pauly N., Pucciariello C., Mandon K., Innocenti G., Jamet A., Baudouin E., Hérouart D., Frenco P., Puppo A. (2006) Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume–*Rhizobium* symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 57:1769-1776.
- Pedraza R.O. (2008) Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 125:25-35.
- Persello-Cartieaux F., Nussaume L., Robaglia C. (2003) Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. *Plant, Cell & Environment* 26:189-199.
- Petrini O. (1991) Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews J, Hirano S (Eds), Microbial ecology of leaves. New York: Springer Verlag, p. 179-197.
- Pinazza L.A., Alimandro R. (2001) Os espantosos números do álcool. In: Agroanalysis, São Paulo, 21:9 p.11-14.
- Piñon D., Casas M., Blanch M., Fontaniella B., Blanco Y., Vicente C., Solas M.T., Legaz M.E. (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus* a sugarcane endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugarcane pathogen. *Research in Microbiology* 153:345-351.
- Plaut Z., Grieve C.M., Mass E.V. (1990) Salinity effects on CO₂ assimilation and diffusive conductance of cowpea leaves. *Physiologia Plantarum* 79:31-38.

- Premachandra G.S., Saneoka H., Fujita K., Ogata S. (1992) Leaf water relations, osmotic adjustment, cell membrane stability, epi-cuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in sorghum. *Journal of Experimental Botany* 43:1569-1576.
- Quiroga M., Guerrero C., Botella M.A., Barcelo A., Amaya I., Medina M.I., Alonso F.J., de Forchetti S.M., Tigier H., Valpuesta V. (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* 122: 1119-1127.
- Rafalski J.A., Hanafey M., Miao G.H., Ching A., Lee J.M., Dolan M., Tingey S. (1998) New experimental and computational approaches to the analysis of gene expression. *Acta Biochimica Polonica* 45:929- 934.
- Reis J.R., Olivares F.L., Oliveira A., Reis V.M., Baldani J.I., Döbereiner J. (1995) Infection of colonization of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane plantlets. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB p.225-226.
- Rentel M.C., Knight M.R. (2004) Oxidative stress-induced calcium signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135: 1471-1479.
- Riera M., Valon C., Fenzi F., Giraudat J., Leung J. (2005) The genetics of adaptative responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signalling components. *Physiologia Plantarum* 123:111-119.
- Robert-Seilaniantz A., Navarro L., Bari R., Jones J.D. (2007) Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* 10:372-379.
- Robertson G.P. (1999) GS+: Geostatistics for the environmental sciences. Versão 5.03 Beta, Plainwell, Gamma Design Software, 152p.
- Rocha F.R., Papini-Terzi F.S., Nishiyama-Jr M.Y., Vêncio R.Z.N., Vicentini R., Duarte R.D.C., Rosa-Jr V.E., Vinagre F., Barsalobres C., Medeiros A.H., Rodrigues F.A., Ulian E.C., Zingaretti S.M., Galbiatti J.A., Almeida R.S., Figueira A.V.O., Hemerly A.S., Silva-Filho M.C., Menossi M., Souza G.M (2007) Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC Genomics* 8:71.

- Rodrigues Neto J., Malavolta Jr. V.A., Victor O. (1986) Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, 12(1-2):16.
- Rozeff N. (1995) Harvest comparisons of green and burned sugarcane in Texas. *International Sugar Journal* 97:501-506.
- Ryan C.A., Huffaker A., Yamaguchi Y. (2007) New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. *Cellular Microbiology* 9:1902-1908.
- Sahay N.S., Varma A. (1999) *Piriformospora indica*: a new biological hardening tool for micropropagated plants. *FEMS Microbiology Letters* 181:297-302.
- Sanchez J.P., Chua N.H. (2001) Arabidopsis PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals. *Plant Cell* 13:1143-1154.
- Sattelmacher B. (2001) The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytologist* 149:167-92.
- Scandalios J.G. (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in Genetics* 28: 1-41.
- Schmelz E.A., Engelberth J., Alborn H.T., O'Donnell P., Sammons M., Toshima H., Tumlinson J.H. (2003) Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100:10552-10557.
- Schreiber U., Bilger W., Hormann H., Neubauer C. (1998) Chlorophyll fluorescence as a diagnostic tool: basics and some aspects of practical relevance. In: Photosynthesis - a Comprehensive Treatise, editora Raghavendra AS, Cambridge University Press, Cambridge, p.320-336
- Schroeder J.I., Kwak J.M., Allen G.J. (2001) Guard cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature* 410: 327-330.
- Schuppler U., He P-H., John P.C.L., Munns R. (1998) Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle quinase activity in wheat leaves. *Plant Physiology* 117: 667-678.
- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., Oono Y., Kamiya A., Nakajima M., Enju A., Sakurai T. (2002) Monitoring the expression profiles of

- 7,000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* 31: 279-292.
- Seo M., Koshiba T. (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7:41-48.
- Sessitsch A., Reiter B., Berg G. (2004) Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. *Canadian Journal of Microbiology* 50:239-249.
- Sevilla M., Burris R.H., Gunapala N., Kennedy C. (2001) Comparison of benefit to sugarcane plant growth and ¹⁵N₂ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif⁻ mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 358-366.
- Shapira M., Lers A., Heifetz P., Yrihimovitz V., Osmond B.C., Gillham N.W., Boynton J.E. (1997) Differential regulation of chloroplast gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* during photoacclimation: Light stress suppresses synthesis of the Rubisco LSU protein while enhancing synthesis of the PSII D1 protein. *Plant Molecular Biology* 33: 1001-1011.
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Youshimura K. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal Experimental Botany* 53: 1305-1319.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (1997) Gene expression and signal transduction in water stress response. *Plant Physiology* 115: 327-334.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58:221-227.
- Shukla V., Mattoo A.K. (2008) Sucrose non-fermenting 1-related protein kinase 2 (SnRK2): a family of protein kinases involved in hyperosmotic stress signaling. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 14: 91-100.
- Smedema L.K., Shiati K. (2002) Irrigation and salinity: a perspective review of the salinity hazards of irrigation development in the arid zone. *Irrigation and Drainage System* 16:2 161-174.

- Smith S.E., Johnson D.W., Conta D.M., Hotchkiss J.R. (1994) Using climatological, geographical, and taxonomic information to identify sources of mature-plant salt tolerance in alfafa. *Crop Science* 34: 690-694.
- Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Review* 31:425-448.
- Spartz A.K., Gray W.M. (2009) Plant hormone receptors: new perceptions. *Genes & Development* 22:2139-2148.
- Spoel S.H., Johnson J.S., Dong X. (2007) Regulation of tradeoffs between plant defences against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104:18842-18847.
- Spreitzer R.J. (1993) Genetic dissection of Rubisco structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 1-49.
- Sreenivasan T.V., Ahloowalia B.S., Heinz D.J. (1987). Cytogenetics. In: Sugarcane Improvement Through Breeding, editora D.J. Heinz, Elsevier Press, Amsterdam, p.211-253.
- Steffen R. (2003) Time-resolved spectroscopic investigations of photosystem II. Tese (Doutorado em química). Universidade Técnica de Berlim, Berlim.
- Stevenson G.C. (1965) Genetics and breeding of sugarcane. London: Longmans, 284p.
- Strasser R.J., Srivatava A., Tsimilli-Michael M. (1999) Screening the Vitality and photosynthetic activity of plants by fluorescence transient. In: Crop Improvement for Food Security (R.K. Behl, M.S. Punia, B.P.S. Lather, eds). SSARM, Hisar, Índia, p.72-115.
- Strobel G., Daisy B. (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Review* 67:491-502.
- Sturz A.V., Christie B.R., Nowak J. (2000) Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Science* 19:1-30.
- Sugiharto B. (2004) Biochemical and Molecular Studies on Sucrose-phosphate Synthase and Drought Inducible-protein in Sugarcane (*Saccharum officinarum*), *Journal ILMU DASAR*, 5: 62-67.

- Takahashi S., Milward S.E., Fan D-Y., Chow W.S., Badger M.R. (2009) How Does Cyclic Electron Flow Alleviate Photoinhibition in Arabidopsis? *Plant Physiology* 149:1560-1567.
- Takemura T., Hanagata N., Sugihara K., Baba S., Karube I., Dubinki Z. (2000). Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza*. *Aquatic Botany* 68:15-28.
- Tapia-Hernandez A., Bustillos-Cristales M.R., Jimenez-Salgado T., Caballero-Mellado J., Fuentes-Ramírez L.E. (2000) Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial Ecology* 39:49-55.
- Tezara W., Martinez D., Rengifo E., Herrera A. (2003) Photosynthetic responses of the tropical spiny shrub *Lycium nodosum* (Solanaceae) to drought, soil salinity and saline spray. *Annals of Botany* 92: 757-65.
- Travaglia C., Cohen A.C., Reinoso H., Castillo C., Bottini R. (2007) Exogenous abscisic acid enhances yield in wheat grown under field conditions of soil water restriction by increasing carbohydrate accumulation and redistribution to the grains. *Journal of Plant Growth Regulation* 26: 285-289.
- Ueda A., Kathiresan A., Inada M., Narita Y., Nakamura T., Shi W., Takabe T., Bennett J. (2003) Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. *Journal of Experimental Botany* 55: 2213-2218.
- Umezawa T., Yoshida R., Maruyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2004) SRK2C, a SNF1-related protein kinase 2, improves drought tolerance by controlling stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101:17306-17311.
- Underwood W., Melotto M., He S.Y. (2007) Role of stomata in bacterial invasion. *Cellular Microbiology* 9:1621-29.
- Valicheski R.R. (2006) <http://www.ebape.fgv.br/radma/doc/GEM/GEM-031.pdf#search=%22regi%C3%A3o%20norte%20fluminense%20solo%20salino%22> 12/10/06.
- Valls M., Genin S., Boucher C. (2006) Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens* 2: 798-807.

- Van Breusegem F.V., Vranova E., Dat J.F., Inze´ D. (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161: 405-414.
- Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44:135-162.
- 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. (2003) Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach. *Symbiosis* 35:159–180.
- Verma S.C., Ladha J.K., Tripathi K. (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deep water rice. *Journal of Biotechnology* 91:127-141.
- Vettore A.L., da Silva F.R., Kemper E.L., Arruda P. (2001) The libraries that made SUCEST. *Genetics and Molecular Biology* 24:1-7.
- Vinagre F., Vargas C., Schwarcz K., Cavalcante J., Nogueira E.M., Baldani J.I., Ferreira P.C.G., Hemerly A.S. (2006) Shr 5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N₂-fixing endophytic bacteria association. *Journal of Experimental Botany* 57:559-569.
- Wahid A., Ghazanfar A. (2006) Possible involvement of some secondary metabolites in salinity tolerance of sugarcane. *Journal of Plant Physiology* 163:723-730.
- Walters R.G. (2005) Towards and understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany* 56: 435-447.
- Wang C., Song C.P. (2008) Guard-cell signalling for hydrogen peroxide and abscisic acid. *New Phytologist* 178:703-718.
- Wasternack C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* 100:681-697.
- Wellburn A.R. (1994) The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* 144:307-313.

- Wenbo M., Zalec K., Glick B.R. (2001) Biological activity and colonization pattern of the bioluminescence-labeled plant growth-promoting bacterium *Kluyvera ascorbata* SUD165/26. *FEMS Microbiology Ecology* 35:137-144.
- Whatley J.M. (1982) Ultrastructure of plastid inheritance: green algae to angiosperms. *Biological Review* 57: 527-569.
- Willekens H., Chamnongpol S., Davey M., Schraudner M., Langebartels C., Van Montagu M., Inzé D., Van Camp W. (1997) Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO Journal* 16:4806-4816.
- Willekens H., Van Camp W., Van Montagu M., Inzé D., Langebartels C., Sandermann H. (1995) Ozone, sulfur dioxide and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant Physiology* 106:1007-1014.
- Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G.V., Provart N.J. (2007) An "electronic fluorescent pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS ONE* 2: e718.
- Wohlgemut H., Mittlestrass K., Kschieschan S., Bender J., Weigel H.J., Overmyer K., Kangasjärvi J., Sandermann H.J., Langebartels C. (2002) Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone. *Plant, Cell Environmental* 25: 717-726.
- Xie D.X., Feys B.F., James S., Nieto-Rostro M., Turner J.G. (1998) *COI1*: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280:1091-94.
- Xiong L.M., Schumaker K.S., Zhu J.K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14:S165-S183.
- Xu L.H., Liu F.Q., Lechner E., Genschik P., Crosby W.L. (2002) The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14:1919-35.
- Yanomoto Y., Kobayashi Y., Matsumoto H. (2001) Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiology* 125: 199-208.

- Yoshida R., Hobo T., Ichimura K., Mizoguchi T., Takahashi F., Aronso J., Ecker J.R., Shinozaki K. (2002) ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology* 43:1473-1483.
- Yoshida T., Nishimura N., Kitahata N., Kuromori T., Ito T., Asami T., Shinozaki K., Hirayama T. (2006) ABA-Hypersensitive Germination3 Encodes a Protein Phosphatase 2C (AtPP2CA) That Strongly Regulates Abscisic Acid Signaling during Germination among *Arabidopsis* Protein Phosphatase 2Cs. *Plant Physiology* 140:115-126.
- Zahir Z.A., Arshad M., Frankenberger Jr. W.T. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria: Applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy* 81:97-168.
- Zeevaart J.A.D., Creelman J.A. (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:439-473.
- Zhang J.X., Kirkham M.B. (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiology*. 35:785-791.
- Zhu J.K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71.
- Zielinski R.E. (1998) Calmodulin and calmodulin-binding proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:697-725.