

PARTICIPAÇÃO DAS VIAS DE PRODUÇÃO E PERCEPÇÃO DO
HORMÔNIO ETILENO DURANTE A INTERAÇÃO ENTRE
Gluconacetobacter diazotrophicus E PLANTAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR E *Arabidopsis thaliana*

ROBERTA RIBEIRO BARBOSA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
DEZEMBRO – 2010

PARTICIPAÇÃO DAS VIAS DE PRODUÇÃO E PERCEPÇÃO DO
HORMÔNIO ETILENO DURANTE A INTERAÇÃO ENTRE
Gluconacetobacter diazotrophicus E PLANTAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR E *Arabidopsis thaliana*

ROBERTA RIBEIRO BARBOSA

“Dissertação 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 Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Orientador: Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
DEZEMBRO – 2010

PARTICIPAÇÃO DAS VIAS DE PRODUÇÃO E PERCEPÇÃO DO
HORMÔNIO ETILENO DURANTE A INTERAÇÃO ENTRE
Gluconacetobacter diazotrophicus E PLANTAS DE
CANA-DE-AÇÚCAR E *Arabidopsis thaliana*

ROBERTA RIBEIRO BARBOSA

“Dissertação 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 Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.”

Aprovada em 14 de dezembro de 2010.

Comissão Examinadora:

Prof. Marco Antônio Lopes Cruz (D.Sc. em Biociências e Biotecnologia) – UFRJ

Prof. Jurandi Gonçalves de Oliveira (D.Sc. em Biologia Vegetal) – UENF

Prof. Fábio Lopes Olivares (D.Sc. em Agronomia) - UENF

Prof. Gonçalo A. de Souza Filho (D.Sc. em Biociências e Biotecnologia) - UENF
(Orientador)

*À minha família que compreendeu minhas
ausências e angústias e que sempre me
incentivou a jamais desistir, na certeza de
que este é o início de uma longa
caminhada.*

Dedico e ofereço

AGRADECIMENTOS

A DEUS, nosso Criador, presença viva em minha vida, que me impulsiona a caminhar em busca dos meus ideais. A fé em Deus nos faz crer no incrível, ver o invisível e realizar o impossível.

Aos meus pais,, Cláudio Roberto e Maria Helena, e irmãos Victor e Luíza, pelo apoio, compreensão e respeito às minhas ausências e limitações. Obrigada pelo amor, confiança e incentivo. Vocês são TUDO para mim!

A Phillip, meu amigo, conselheiro, companheiro, marido, amor. Sua existência é um presente de Deus na minha vida. Única e eternamente te amo!!!

À minha querida madrinha Maria Helena, que, apesar de longe, nunca deixou de apoiar e acreditar em mim.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas pela oportunidade da realização do Curso.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela bolsa de estudos a mim concedida.

Ao Professor Gonçalo Apolinário de Souza Filho, pelo apoio teórico transmitido com competência e dedicação. Suas críticas foram extremamente relevantes para o meu crescimento acadêmico. Obrigada pela confiança, pelo convívio e amizade. Minha gratidão, respeito e admiração.

À grande amiga Juliana, pelo carinho, companheirismo, confiança, amizade. Sua presença, apoio, descontração tornou mais leve cada momento do

mestrado. Obrigada por tudo!

A Wellington, que foi de fundamental importância no início da minha pesquisa, e com seu carinho, respeito e amizade, mesmo longe, tornou-se um grande e inesquecível amigo.

À amiga Monique, que esteve presente em cada momento nesses anos acadêmicos. Sua amizade e alegria me foram contagiantes.

À Ana Lídia, pelo seu grande apoio e amizade durante as etapas do mestrado.

Aos meus amigos, Marcelita, Vanessa, Suelem, Paulo Victor, Leonardo e Cássius pela cumplicidade e união. Nunca me esquecerei de vocês!!!

Aos colegas e amigos do LBT, Aline, Bia, Cristina, Fernanda, Fred, Janice, Leandro, Marcos Vinícius, Mariana, Natália, Paulo, Patrícia, Tamires e Verônica, pela prazerosa convivência, pelas sugestões, apoio e incentivo.

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.

Ao Professor Marcelo Gomes, e alunos, Wily, Gustavo e Michele, pelo apoio teórico e colaboração no equipamento de detecção de etileno, que foi fundamental para a realização deste trabalho.

À Professora Virgínia Silva Carvalho, pela colaboração em um processo importante nesta dissertação: a cultura de tecidos de cana-de-açúcar.

Aos Professores Fábio Lopes Olivares, Jurandi Gonçalves de Oliveira e Marco Antônio Lopes Cruz, pelas sugestões e por participarem da minha banca de mestrado.

A todos os professores de pós-graduação que, com seus conhecimentos, contribuíram para o meu crescimento profissional.

Aos meus colegas de turma, pela vivência e aprendizado compartilhado nestes dois anos de pós-graduação.

Aos professores e colegas do Laboratório de Biotecnologia e a todos que, de alguma forma, me auxiliaram, me incentivaram ou me proporcionaram bons momentos para a continuação e finalização desta dissertação.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1- INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Interação planta-micro-organismo.....	4
2.2. Sistema imune vegetal	6
2.3. Fitormônios e defesa vegetal	9
2.3.1. Ácido salicílico.....	13
2.3.2. Auxina	14
2.3.3. Etileno	15
2.4. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	19
2.5. A Cana-de-açúcar	21
2.6. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudo de genética molecular de plantas	24
3 - OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos	28
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Material vegetal e condições de cultivo.....	29
4.1.1. Cultura <i>in vitro</i> de cana-de-açúcar	29
4.1.2. Cultivo de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	30

4.2. Micro-organismos, condições de cultivo e processos de inoculação de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> e <i>Pseudomonas syringae</i> DC3000.....	32
4.2.1. Micro-organismos.....	32
4.2.2. Condições de cultivo	33
4.2.3. Processos de inoculação	33
4.2.3.1. Padronização das condições de inoculação <i>in vitro</i> de plântulas de cana-de-açúcar com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	33
4.3. Inoculação de plântulas de cana-de-açúcar.....	35
4.4. Inoculação de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
4.5. Determinação da emissão de etileno (C ₂ H ₄).....	36
4.6. Extração de pigmentos fotossintéticos.....	37
4.7. Determinação de fenólicos vegetais	37
4.8. Análise do acúmulo de calose.....	38
4.9. Análise de morte celular.....	38
4.10. Análise dos níveis de colonização	38
4.11. Análise estatística	39
5 - RESULTADOS.....	40
5.1. Obtenção de plântulas de cana-de-açúcar por meio da cultura de tecidos vegetais.....	40
5.2. Padronização das condições de inoculação <i>in vitro</i> de plântulas de cana-de-açúcar com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	41
5.3. Quantificação da taxa de emissão de etileno de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	44
5.4. Análise da resposta de defesa vegetal à inoculação de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	46
5.4.1. Quantificação dos teores de pigmentos fotossintéticos.....	46
5.4.2. Quantificação dos fenólicos vegetais	48
5.4.3. Análise do acúmulo de calose.....	51
5.4.4. Quantificação de morte celular.....	52
5.5. Análise dos níveis de colonização de <i>Arabidopsis thaliana</i> por <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	54
6 - DISCUSSÃO.....	Erro! Indicador não definido.56
7 - CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Percepção do micro-organismo e indução da defesa vegetal chamada imunidade inata (PTI).....	7
Figura 2 - Representação do sistema imune vegetal	8
Figura 3 - Interação entre os fitormônios durante a defesa vegetal	12
Figura 4 - Via de biossíntese do hormônio etileno e ciclo Yang	16
Figura 5 - Via de sinalização do hormônio etileno.....	17
Figura 6 - Distribuição e produção de cana-de-açúcar em todo o mundo em 2008	24
Figura 7 - <i>Arabidopsis thaliana</i> e análise funcional de seus genes.....	26
Figura 8 - Regeneração de plantas de cana-de-açúcar RB758540 por embriogênese somática direta.....	41
Figura 9 - Crescimento de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> em diferentes meios de cultura	42
Figura 10 - Crescimento de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> em diferentes meios de cultura.....	43
Figura 11 - Plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	44
Figura 12 - Taxa de emissão de etileno de plântulas de cana-de-açúcar submetidas à inoculação com <i>G. diazotrophicus</i> , somente ao estresse salino (1,5% NaCl por 48h) e a inoculação com posterior estresse salino (1,5% NaCl por 48h	45

Figura 13 - Teores de pigmentos fotossintéticos em plantas de <i>A. thaliana</i> inoculadas e não-inoculadas com <i>P. syringae</i> DC3000 e <i>G. diazotrophicus</i> , após 4 dias	48
Figura 14 - Teores de fenólicos vegetais em plantas de <i>A. thaliana</i> inoculadas e não-inoculadas por <i>P. syringae</i> DC3000 e <i>G. diazotrophicus</i> , após 4 dias	50
Figura 15 - Teores de fenólicos vegetais em plantas de <i>A. thaliana</i> inoculadas e não-inoculadas por <i>G. diazotrophicus</i> , após 10 dias	51
Figura 16 - Deposição de calose em folhas de <i>A. thaliana</i> inoculadas <i>G. diazotrophicus</i> após 10 dias	52
Figura 17 - Morte celular em folhas de <i>A. thaliana</i> inoculadas <i>G. diazotrophicus</i> após 10 dias.....	53
Figura 18 - Quantificação do nível de colonização de plantas de <i>A. thaliana</i> inoculadas com <i>G. diazotrophicus</i> e <i>P.syringae</i>	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Material vegetal transgênico utilizado.	31
Quadro 2 - Material vegetal mutante utilizado.	31
Quadro 3 - Composição dos meios de cultura.	34

RESUMO

BARBOSA, Roberta Ribeiro; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Dezembro de 2010; Participação das vias de produção e percepção do hormônio etileno durante a interação entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* e plantas de cana-de-açúcar e *Arabidopsis thaliana*; Orientador: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Conselheiros: Profa. Rosana Rodrigues e Prof. Fábio Lopes Olivares.

As bactérias são organismos de estrutura celular simples e que podem ocupar e colonizar diferentes nichos na Terra. Nas plantas, as bactérias podem formar associações benéficas ou patogênicas, localizando-se no interior ou na superfície das mesmas. Aquelas que se localizam no interior das plantas sem causar danos aparentes são denominadas endofíticas. Para se adaptarem às mudanças em seu ambiente e à invasão de organismos patogênicos, as plantas precisam de mecanismos de regulação eficazes. As vias de sinalização hormonal são um dos mecanismos que asseguram à planta um potencial de defesa. Entretanto, estas vias permitem aos patógenos e a outros micro-organismos a manipulação da defesa para o seu benefício. Entre as bactérias que promovem alterações na expressão de genes envolvidos com a regulação hormonal vegetal, está a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, uma das primeiras bactérias endofíticas diazotróficas isolada de cana-de-açúcar, em 1988. Entre os mecanismos responsáveis pela promoção de crescimento vegetal promovido por *G. diazotrophicus*, estão a fixação biológica de nitrogênio e a produção de hormônios

do crescimento. Em virtude de suas características peculiares, vários estudos têm sido realizados com o intuito de entender a sua fisiologia e a base genética da interação, e sua contribuição em cada associação. Entre esses estudos estão aqueles que visam ao entendimento das alterações na expressão de genes relacionados a hormônios vegetais como o etileno, durante as interações de *G. diazotrophicus*. Sendo o etileno um hormônio importante durante a defesa vegetal, tal alteração pode ser de fundamental importância durante o processo de colonização endofítica e não patogênica de *G. diazotrophicus*. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a participação do hormônio vegetal etileno em comparação com os hormônios ácido salicílico e auxina, durante o processo de interação entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* e plantas de cana-de-açúcar e *Arabidopsis thaliana*. Para tal, foram realizadas análises da emissão de etileno por plantas de cana-de-açúcar na presença de *G. diazotrophicus*, análise da resposta de defesa em plantas de *A. thaliana* mutantes defectivos para etileno em comparação ácido salicílico e auxina e avaliação do efeito de tais mutações durante o processo de colonização de *G. diazotrophicus*. Os resultados demonstraram que plantas de cana-de-açúcar apresentam uma indução na emissão do hormônio etileno na presença de *G. diazotrophicus*, e que, embora não provoque sintomas visíveis de doença, a inoculação por *G. diazotrophicus* culmina no disparo de respostas de defesa em plantas mutantes de *A. thaliana*. Tais respostas são observadas em alterações nos níveis de flavonoides, morte celular e deposição de calose, que foram mais evidentes nos mutantes de etileno. Embora tenha disparado respostas de defesa, o hormônio etileno não mostrou ser fundamental durante o processo de colonização por esta bactéria, levando em consideração que sua colonização não foi afetada nos mutantes defectivos para este hormônio. Os mutantes defectivos, para ácido salicílico e auxina, apresentaram respostas de defesa diferente à dos mutantes defectivos para etileno, e *G. diazotrophicus* obteve um nível superior de colonização. Tais dados permitiram um maior entendimento do envolvimento do etileno e conseqüentemente do ácido salicílico e auxina, durante a interação *G. diazotrophicus* e cana-de-açúcar, e poderão tornar-se de fundamental importância no estudo de associações endofíticas.

ABSTRACT

BARBOSA, Roberta Ribeiro; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Dezembro de 2010; Participation of ethylene hormone production and perception pathways during the interaction between *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane and *Arabidopsis thaliana* plants. Advisor: Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho; Committee Members: Profa. Rosana Rodrigues and Fábio Lopes Olivares.

Bacteria are simple organisms to cell structure and that can occupy and colonize different niches on Earth. In plants, bacteria can form associations beneficial or pathogenic, being located within or on the surface thereof. Those that are located inside the plants without causing apparent damage are called endophytes. To adapt to changes in their environment and the invasion of pathogenic organisms, plants need mechanisms for effective and efficient regulation. Hormonal signaling pathways are one mechanism that ensures the plant a potential defense. However, these channels allow pathogens and other microorganisms manipulate of defense for your benefit. Among the bacteria that promote changes in the expression of genes involved in plant hormonal regulation, is *Gluconacetobacter diazotrophicus*, an endophytic diazotrophic bacteria of the first isolated from sugarcane in 1988. Among the mechanisms responsible for promoting plant growth promoted by *G. diazotrophicus*, are nitrogen fixation and production of growth hormones. Because of its unique characteristics, several studies have been conducted in order to understand their physiology and genetic basis of

interaction and its contribution in each association. Among these studies are those that seek to understand the changes in gene expression related to plant hormones as ethylene, while the interactions of *G. diazotrophicus*. As an important hormone ethylene during plant defense, such a change may be of fundamental importance during the non-pathogenic and endophytic colonization of *G. diazotrophicus*. In this context, this work aimed to study the role of the plant hormone ethylene in comparison to the hormones auxin and salicylic acid during the process of interaction between *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane and *Arabidopsis thaliana* plants. To this end, we analyzed the emission of ethylene by plants of sugarcane in the presence of *G. diazotrophicus*, analysis of defense response in plants of *A. thaliana* mutants defective for ethylene compared to salicylic acid and auxin and evaluating the effect of such mutations during the process of colonization of *G. diazotrophicus*. The results showed that plants of sugarcane have an induction in the emission of the hormone ethylene in the presence of *G. diazotrophicus*, and although that does not cause visible symptoms of disease, inoculation with *G. diazotrophicus* culminates in triggering defense responses in mutant plants of *A. thaliana*. Such responses are observed in altered levels of flavonoids, cell death and callose deposition, which were evident in the ethylene mutants. Although triggered defense responses, the hormone ethylene was not a part during the process of colonization by this bacterium, considering that its colonization was not affected in mutants defective for this hormone. The mutants defective for auxin and salicylic acid showed different responses to the defense of mutants defective for ethylene and *G. diazotrophicus* had a higher level of colonization. Such data allowed a better understanding of the involvement of ethylene and consequently auxin and salicylic acid during the interaction *G. diazotrophicus* and sugarcane and could become of fundamental importance in the study of endophytic associations.

1– INTRODUÇÃO

Dentre todas as culturas agrícolas existentes no Brasil, a cana-de-açúcar é uma das mais importantes e vem ganhando destaque, principalmente pela possibilidade de sua utilização como biocombustível em todo o mundo. No Brasil, maior produtor mundial, a cana-de-açúcar e seus derivados são a segunda fonte de energia combustível e representam 16% da oferta, perdendo apenas para o petróleo (Gazeta, 2009).

Plantada há séculos no Brasil, a cultura da cana-de-açúcar sempre utilizou pouca ou nenhuma fertilização nitrogenada. Embora em grande abundância na atmosfera, apenas os organismos diazotróficos podem fixar e incorporar o nitrogênio atmosférico à biomassa vegetal (Dixon e Kahn, 2004). Tal fato levou ao surgimento de várias pesquisas sobre a contribuição da fixação biológica de nitrogênio para o aumento de produtividade das lavouras. Dentre essas pesquisas, destacam-se aquelas relacionadas aos micro-organismos endofíticos (Magnani et al., 2010).

Os micro-organismos endofíticos representam uma fonte de diversidade de inestimável valor para ser explorada em culturas de importância econômica. Diversas espécies de micro-organismos endofíticos, além de promoverem o crescimento vegetal por meio da fixação biológica de nitrogênio (Baldani et al., 1997), são capazes de produzir hormônios reguladores do crescimento vegetal, ou substâncias análogas, como auxina (Fuentes-Ramirez et al., 1993) e giberelinas (Bastian et al., 1998), aumentar a resistência a estresses bióticos (Pleban et al., 1995) e abióticos (Hallmann et al., 1997), realizar o controle

biológico de pragas e doenças nas plantas (Downing, et al., 2000; Verma et al., 2001), induzir a resistência sistêmica (Hallmann et al., 1997) e produzir antibióticos (Strobel e Daisy, 2003).

Uma das primeiras bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio foi encontrada em associação com a cana-de-açúcar no Brasil (Cavalcante e Döbereiner, 1988). Primeiramente nomeada como *Acetobacter diazotrophicus* e, posteriormente, denominada *Gluconacetobacter diazotrophicus*, ela foi encontrada colonizando os tecidos de raízes, caule e folhas da cana-de-açúcar (Yamada et al., 1997). Também, em pesquisas posteriores, foi isolada de outras plantas ricas em carboidratos, tais como, milho, arroz, capim-elefante, abacaxi e sorgo (Baldani et al., 1997; Ferreira, 2002). Entre os mecanismos responsáveis pela promoção de crescimento vegetal promovido por *G. diazotrophicus*, estão a fixação biológica de nitrogênio e a produção de hormônios do crescimento (Muthukumarasamy et al., 2005).

Os hormônios produzidos por *G. diazotrophicus* atuam sobre a divisão, alongação, diferenciação celular e também na defesa vegetal contra estresses bióticos e abióticos. Integrados numa grande rede, estes hormônios podem interferir na síntese de outras substâncias, assim como na de outros hormônios, entre eles, o etileno (Taiz e Zeiger, 2004).

O etileno, fitormônio gasoso, é conhecido por regular diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento nas plantas, como abscisão de flores e folhas, amadurecimento de frutos, inibição do crescimento de raízes, além de estar envolvido em processos de resposta a estresse biótico e abiótico. (Pierik et al., 2006). Apresenta também um papel importante na resposta de defesa vegetal a patógenos (Taiz e Zeiger, 2004).

Tal papel na resposta imune das plantas pode ser subvertido por alguns micro-organismos e, dessa forma, estar relacionado ao fato de algumas bactérias colonizarem o interior de tecidos vegetais de forma não patogênica. Porém, tal mecanismo ainda não está totalmente esclarecido (Rosenblueth e Martinez-Romero, 2006).

Estudos recentes demonstraram que vários genes apresentam uma expressão diferencial em cana-de-açúcar, ativada pela presença de *G. diazotrophicus*. Entre eles, destacam-se os genes envolvidos com a via de sinalização do etileno. Entretanto, os mecanismos envolvidos nesse processo

permanecem pouco elucidados (Nogueira et al., 2001).

Considerando todo o potencial a ser explorado em bactérias endofíticas e o conhecimento relativamente limitado, principalmente em relação ao envolvimento hormonal durante a interação cana-de-açúcar e *G. diazotrophicus*, este trabalho teve como objetivo, utilizando plantas mutantes de *A. thaliana*, caracterizar a importância do fitormônio etileno durante a colonização de plantas por *G. diazotrophicus*. Com o intuito de avaliar a importância deste hormônio em relação a outros hormônios vegetais, durante a colonização de *G. diazotrophicus*, foi realizado um trabalho comparativo com os hormônios ácido salicílico e auxina.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Interação planta-micro-organismo

As bactérias são organismos de estrutura celular simples e que podem ocupar e colonizar diferentes nichos possíveis na Terra, incluindo o sistema digestivo dos animais, fontes termais, fendas oceânicas e as plantas. Nestas, as bactérias podem formar associações benéficas, simbióticas (Mithofer, 2002), ou patogênicas, localizando-se no interior ou na superfície das mesmas (Newman e Banfield, 2002).

Os estudos da colonização de tecidos vegetais por bactérias iniciaram-se em 1870, principalmente com os trabalhos de Pasteur (Hollis, 1951). Nesta época, acreditava-se que as bactérias que colonizavam o interior vegetal, atualmente denominadas endofíticas, eram contaminantes da desinfestação superficial incompleta, ou que se tratavam de patógenos com pouca virulência (Hollis, 1951). Porém, trabalhos posteriores demonstraram que as bactérias endofíticas, ao contrário do que se pensava, podiam promover o crescimento vegetal e reduzir os sintomas de doenças causadas por diversos patógenos (Hallmann et al., 1997). A partir desses trabalhos, uma nova definição, proposta por Hallmann et al. (1997), surgiu para a palavra endofítico. Estes estariam caracterizados como todos os micro-organismos que vivem no interior das plantas, sem lhes causar danos aparentes, podendo promover o crescimento da planta e o aumento da produtividade agrícola (Mirza et al., 2001).

As bactérias endofíticas entram na planta principalmente pela raiz, sendo que a parte aérea vegetal, como flores e caule, podem também ser utilizadas para

tal fim. Sua entrada ocorre por meio de enzimas hidrolíticas, como pectinases ou celulases, ou por aberturas naturais ou provocadas por injúrias. Dentro do tecido vegetal, essas bactérias podem dispersar-se sistemicamente ou se localizar em determinados pontos específicos (Hallmann et al., 1997).

Entre os mecanismos responsáveis pelo crescimento vegetal promovido pelos endofíticos, encontram-se a fixação biológica de nitrogênio (Baldani et al., 1997), produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal, ou substâncias análogas, como auxina (Fuentes-Ramirez et al., 1993) e giberelinas (Bastian et al., 1998); o aumento da resistência a estresses bióticos (Pleban et al., 1995) e abióticos (Hallmann et al., 1997); o controle biológico de pragas e doenças nas plantas (Downing et al., 2000; Verma et al., 2001); a indução da resistência sistêmica (Hallmann et al., 1997) e a produção de antibióticos (Strobel e Daisy, 2003).

Os efeitos na promoção do crescimento vegetal por bactérias endofíticas incluem acréscimos de altura e biomassa da parte aérea, do caule, das raízes, formação de pelos radiculares e foliares, e lignificação de vasos do xilema (Sturtz, 1995).

Apesar de sua grande importância, os grupos de bactérias endofíticas classificados ainda não representam toda a diversidade encontrada na natureza (Pace, 1997). Isso se deve ao fato de que a maioria das bactérias não pode ser obtida como colônia pura, procedimento necessário para sua identificação, assim como para sua quantificação (Pace, 1997). Atualmente, novas técnicas têm sido desenvolvidas e utilizadas para avaliação de diversidade e quantificação bacteriana, entre elas, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa em tempo real (qPCR). Capaz de detectar o número de cópias de um gene durante uma PCR, por meio da utilização de marcadores fluorescentes, esta técnica é capaz de avaliar e quantificar a presença de DNA, sendo utilizada em estudos de quantificação e localização de micro-organismos.

Na cultura da cana-de-açúcar, vários estudos têm demonstrado a presença de espécies de bactérias colonizando o interior de raízes, colmos e folhas (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Baldani et al., 1992; Olivares et al., 1996). Algumas destas são capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, sendo, portanto, classificadas como diazotróficas. Dentre estas, as espécies mais estudadas pertencem aos gêneros *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter*. Estes também têm

sido isolados de outras plantas ricas em carboidratos, tais como, milho, arroz, capim-elefante, abacaxi e sorgo (Baldani et al., 1997; Ferreira, 2002).

2.2. Sistema imune vegetal

As plantas representam uma importante fonte de água e nutrientes para os micro-organismos. Para ter acesso a esses nutrientes, muitas bactérias patogênicas ou mutualísticas, como as rizobactérias, são capazes de invadir, colonizar e estabelecer uma infecção em suas plantas hospedeiras. Enquanto as bactérias fitopatogênicas causam prejuízos e, frequentemente, prejudicam o desenvolvimento e reprodução das plantas, a infecção de leguminosas por rizobactérias resulta em benefícios pela troca de nutrientes (Soto et al., 2009).

Para que ocorra a entrada do micro-organismo, um conjunto de barreiras de defesa vegetal deve ser vencido (Hückelhoven, 2007). A maioria dos patógenos tem acesso ao interior das plantas diretamente, ultrapassando a primeira barreira vegetal, via penetração da superfície foliar ou radicular. Esta entrada ocorre por meio de ferimentos ou de aberturas naturais, tais como, estômatos e hidatódios (Knogge, 1996). Uma vez dentro da planta, a segunda barreira deve ser vencida: a parede celular. Utilizando-se de enzimas, hormônios ou toxinas, os patógenos invadem as células vegetais e, posteriormente, são reconhecidos por receptores de superfície extracelular que detectam moléculas específicas de micro-organismos (Hückelhoven, 2007).

Reconhecida como imunidade basal vegetal, ou imunidade inata, a percepção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) é responsável pela primeira linha de resposta vegetal, embora tal mecanismo de imunidade ainda não esteja totalmente esclarecido (Takeda et al., 2003). Receptores de reconhecimento padrão (PRRs), presentes na membrana plasmática das células vegetais, são capazes de reconhecer os padrões moleculares associados a micro-organismos (MAMPs) patogênicos (PAMPs) ou não (Chisholm et al., 2006).

O processo de sinalização desenvolvido pelas células vegetais, para perceber e responder aos patógenos, pode ser dividido em três etapas básicas: (1) o reconhecimento ou percepção do sinal, realizado por receptores celulares

específicos ou inespecíficos que reconhecem moléculas de origem do patógeno; (2) a transdução do sinal, que consiste na transmissão do mesmo para seu sítio de ação dentro da célula, podendo ser feita de forma direta ou indireta (via mensageiros secundários, alterações na fosforilação de proteínas e por meio de proteínas-G; e (3) a tradução do sinal, que consiste na conversão do sinal em respostas celulares específicas (Côte et al., 1995).

Após o reconhecimento dos eliciadores pelos receptores, ocorre a abertura de canais de íons, acidificação do citoplasma, ativação de quinases, produção de espécies reativas de oxigênio, ativação de outros mensageiros secundários (ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno), ativação de fatores de transcrição, transcrição de genes de defesa (proteínas PR, enzimas de fitoalexinas, lignificação de tecidos, calose e outros reforços da parede celular), resistência local (reação de hipersensibilidade) e, subsequentemente, 'imunidade' sistêmica (resistência sistêmica adquirida ou resistência sistêmica induzida) que envolve vários sinais (Grant e Lamb, 2006) (Figura 1).

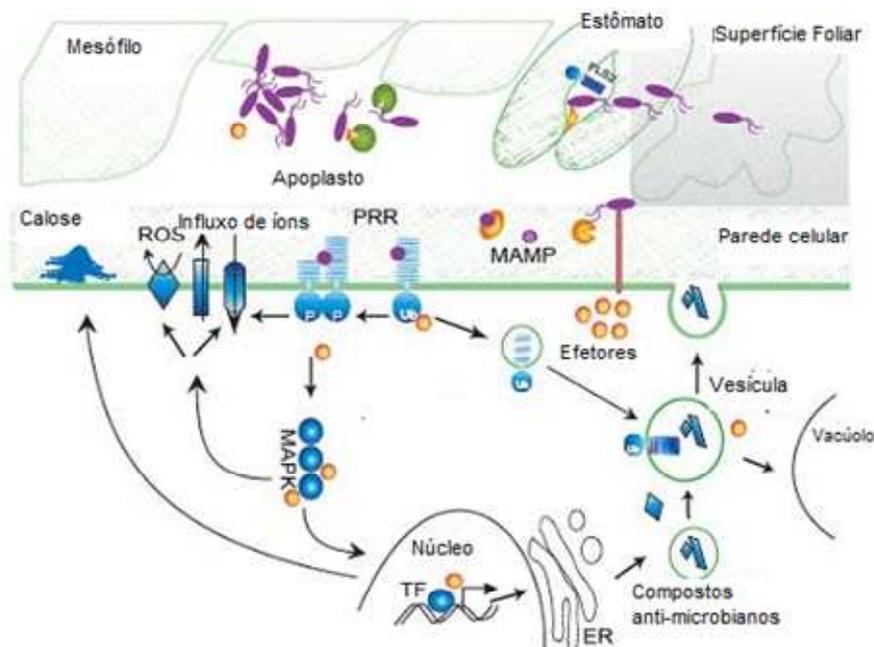


Figura 1 - Percepção do micro-organismo e indução da defesa vegetal chamada imunidade inata (PTI) (adaptado de Göhre e Robatzek, 2008).

Durante a coevolução, muitos micro-organismos desenvolveram a capacidade de suprimir a defesa vegetal baseada em PAMPs e, assim,

estabelecerem-se em seu hospedeiro. Para colonizar seus hospedeiros de forma eficiente, *Pseudomonas syringae* e outros patógenos têm envolvido uma variedade de fatores de virulência para subverter a defesa vegetal (Nomura et al., 2005). Um dos fatores de virulência está envolvido com o sistema de secreção do tipo III que secreta um grande número de proteínas efetoras de virulência (He et al., 2006). A partir desse momento, a doença se desenvolve causando necrose e degradação dos pigmentos fotossintéticos (Wang et al., 2005). Em resposta a essa capacidade, as plantas desenvolveram a segunda linha de resposta que é baseada em genes de resistência, conhecida como resposta hipersensível. Tal defesa geralmente conduz à necrose local (Boller e Felix, 2009) (Figura 2).

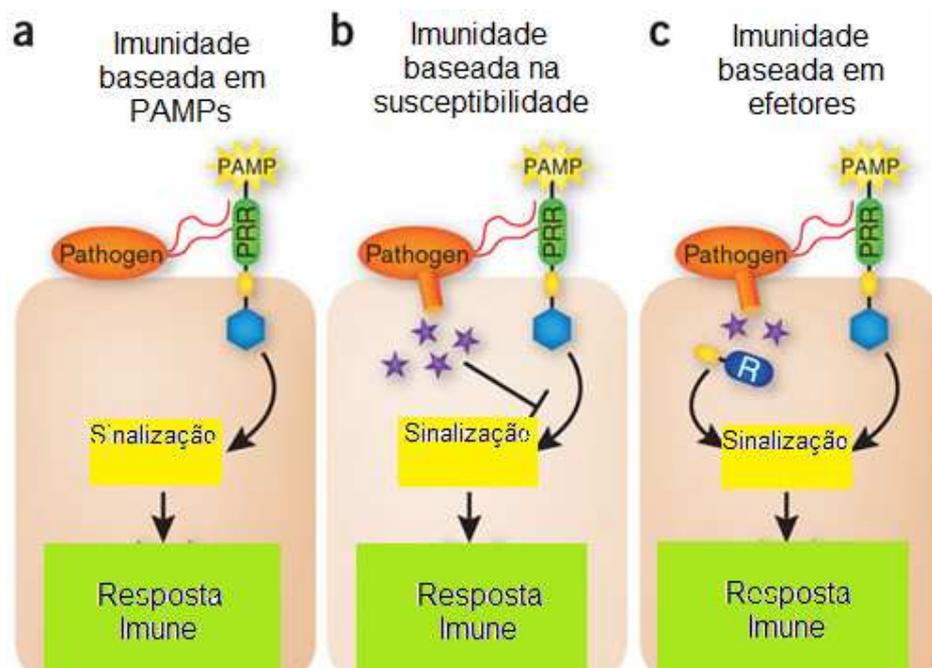


Figura 2 - Representação do sistema imune vegetal. (a) Reconhecimento de PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) resultando numa cascata de sinalização. (b) Liberação de efetores pelo patógeno suprimindo a defesa relacionada a PAMPs. (c) Resposta vegetal, pelo reconhecimento desses efetores resultando numa segunda resposta imune chamada de imunidade ativada por efetores (Corné et al., 2009)

Com o intuito de proteger tecidos vegetais mais distantes do sítio de infecção do patógeno, as plantas desenvolveram a resistência induzida. Esta pode ser dividida em duas categorias, a resistência sistêmica adquirida (SAR) e a resistência sistêmica induzida (ISR) (Van Loon et al., 1998). Na SAR, a resistência

desenvolve-se de forma sistêmica em resposta a um patógeno que causa uma lesão necrótica (HR) ou por aplicação exógena de ácido salicílico ou compostos sintéticos, como o acibenzolar-S-metil (ASM) e o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA). Nesta, a resistência expressa, geralmente, é efetiva contra um amplo espectro de patógenos e está associada à produção de proteínas relacionadas à patogênese (PRP's). Muitas delas possuem atividade antimicrobiana e são excelentes marcadores moleculares para a resposta de resistência. Já na ISR, geralmente induzida por rizobactérias, a sinalização é mediada pelo ácido jasmônico e etileno (Van Loon et al., 1998). Embora ainda não totalmente elucidado, os micro-organismos benéficos, entre eles a *Gluconacetobacter diazotrophicus*, também podem induzir uma resposta sistêmica vegetal (Cavalcante et al., 2007).

2.3. Fitormônios e defesa vegetal

O desenvolvimento vegetal é um processo regulado por fatores externos e internos. Tais fatores permitem o crescimento, a multiplicação e a diferenciação e posterior variabilidade de células, tecidos e órgãos da planta. Entre os fatores externos que podem afetar o desenvolvimento vegetal estão: a luz (energia solar), dióxido de carbono, água, sais minerais e a temperatura. Os fatores internos incluem os hormônios vegetais ou fitormônios que atuam sobre a divisão, alongação, diferenciação celular e também na defesa vegetal contra estresses bióticos e abióticos (Taiz e Zeiger, 2004). Os órgãos vegetais podem ser influenciados por tais mensageiros químicos, apresentando como consequência alterações morfológicas (Weaver, 1976).

A palavra hormônio deriva do termo grego *horman* que significa "excitar". São substâncias orgânicas e que atuam nos diferentes órgãos da planta: caule, raiz, folhas, flores e frutos. São produzidos em pequenas frações e com função direcionada a locais bem específicos. Como alguns hormônios podem ter atividade inibitória, eles são mais apropriadamente referidos como reguladores químicos ou fitorreguladores (Taiz e Zeiger, 2004).

Até recentemente, acreditava-se que o desenvolvimento vegetal era regulado por cinco classes principais de hormônios: auxinas, giberelinas, cito

cininas, ácido abscísico e o etileno. Entretanto novos estudos têm demonstrado a existência de hormônios esteróides, os brasinoesteróides, que possuem muitos efeitos morfológicos no desenvolvimento vegetal, atuando principalmente no metabolismo protéico (Taiz e Zeiger, 2004).

A auxina foi o primeiro hormônio descoberto nas plantas. Em meados de 1930, foi determinado que a auxina era um ácido indol-3-acético (AIA), sendo este considerado a auxina de maior abundância e relevância fisiológica, embora outras formas tenham sido descobertas posteriormente, como o ácido indol butírico (AIB) e o ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) (Taiz e Zeiger, 2004). Tal hormônio modula vários processos, como resposta a gravidade e a luz, formação e arquitetura das raízes, desenvolvimento vascular e crescimento em cultura de tecidos (Davies, 1995), sendo essencial para o desenvolvimento vegetal.

Após cerca de 20 anos da descoberta da auxina, um segundo grupo de hormônios foi caracterizado: as giberelinas. Descoberta a partir de um fungo *Gibberella fujikuroi*, e identificada como uma substância hidrossolúvel que acarretava o crescimento anormal de plantas de arroz, as giberelinas passaram a ter grande utilidade na agricultura (Taiz e Zeiger, 2004). Sintetizadas nas folhas jovens, assim como as auxinas, e transportadas pelo xilema e floema, as giberelinas induzem o crescimento vegetativo pela expansão longitudinal das células, quebram a dormência de gemas caulinares e sementes, promovem o florescimento, causam o desenvolvimento de frutos partenocárpicos em algumas espécies e retardam a senescência de folhas e frutos de citrus (Weaver, 1972).

Diferentemente das giberelinas, que promovem o crescimento pelo alongamento celular, as citocininas regulam principalmente a divisão celular vegetal, induzindo o crescimento. Desde sua descoberta, várias funções tem sido atribuídas a essa amino-purina (Miller et al., 1955), entre elas: inibição da senescência foliar, mobilização de nutrientes, dominância apical, desenvolvimento floral, quebra de dormência e germinação de sementes. Elas têm um papel importante no desenvolvimento controlado e organizado das plantas superiores (Taiz e Zeiger, 2004).

O ácido abscísico (ABA), fator central na resposta das plantas a estresses abióticos como déficit hídrico, salinidade e baixas temperaturas (Xiong et al., 2002) é também fundamental na germinação e crescimento vegetal. Está envolvido em processos como fechamento de estômatos, síntese de proteínas de

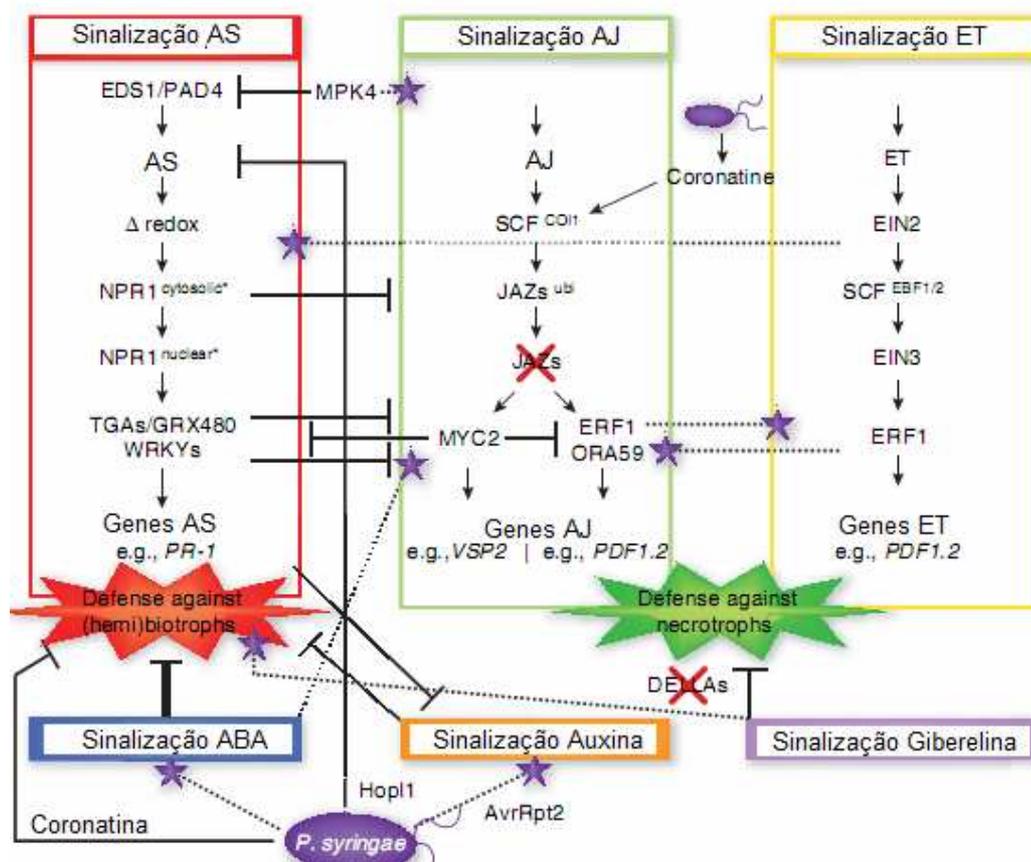
reserva de sementes, a inibição de germinação de embriões e pode acarretar inibição (Pilet e Barlow, 1987) ou indução (Yamaguchi e Street, 1977) do crescimento de raízes. É conhecido também por influenciar a síntese de outro hormônio, o etileno e assim promover a senescência de folhas e o amadurecimento de frutos (Yeh et al., 1995).

Regulando vários processos internos, o etileno, fitormônio gasoso, apresenta efeitos em processos de crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses durante toda a vida da planta (Taiz e Zeiger, 2004).

Além das funções já relatadas, os hormônios vegetais também estão envolvidos nos processos de defesa vegetal. Dependendo da infecção e do patógeno, a planta é estimulada a sintetizar um ou mais hormônios (De Vos et al., 2005). Evidências desse papel chave dos hormônios na defesa vegetal surgiram de estudos com *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* (tabaco), em que mutantes e linhas transgênicas com deficiências na síntese de hormônios apresentavam severas alterações em suas resistências. Tal regulação permite que as plantas rapidamente se adaptem a estresses bióticos e abióticos de uma maneira mais eficiente (Corné et al., 2009).

A cinética da biossíntese dos hormônios e a sinalização durante a interação da planta com seus patógenos podem ser decisivas na resposta de defesa vegetal. Os fitormônios podem ser rapidamente transformados em seus derivados que dessa forma podem atuar em outro nível de regulação da imunidade (Corné et al., 2009).

Estudos com *Arabidopsis thaliana* têm demonstrado que a defesa vegetal não é influenciada somente pela interação entre os hormônios ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. ABA demonstrou ser antagonista a defesa dependente de ácido salicílico; as auxinas estão envolvidas com a susceptibilidade a *Pseudomonas syringae* e afeta a síntese de ácido jasmônico; as giberelinas regulam a degradação de proteínas DELLA, responsáveis pela susceptibilidade a patógenos biotrópicos e resistência a patógenos necrotrópicos, por meio da modulação entre a sinalização de ácido salicílico e ácido jasmônico. Citocininas e brassinoesteróides também estão envolvidos nos mecanismos de defesa vegetal embora tais processos ainda não estejam totalmente esclarecidos (Navarro et al., 2008) (Figura 3).



L: efeito negativo;

estrelas roxas: efeito positivo

Figura 3 – Interação entre os fitormônios durante a defesa vegetal. Patógenos como *P. syringae* produzem proteínas efetoras (coronatina, Hop1 e AvrRpt2) que manipulam a resposta imune e promovem a virulência. A sinalização de AS (ácido salicílico), AJ (ácido jasmônico) e ET (etileno) representa o eixo principal da defesa vegetal e os outros hormônios apenas integram essas sinalização (Corné et al., 2009)

A interação entre os hormônios pode fornecer às plantas um grande potencial de regulação, mas ao mesmo tempo permite aos patógenos e a outros micro-organismos, a manipulação da defesa para o seu benefício. Exemplo dessa estratégia é a infecção de *A. thaliana* por *P. syringae* que, ao injetar seus fatores de virulência, suprime a defesa vegetal principalmente por alterar a regulação hormonal de ABA e auxina, permitindo assim o desenvolvimento da doença (de Torres-Zabala et al., 2007).

Muitos micro-organismos também produzem fitormônios ou substâncias análogas para gerar um desbalanço hormonal e conseqüentemente manipular o sistema de defesa vegetal. Esse é um dos mecanismos usados por alguns patógenos para conferir virulência e causar doença. A produção de hormônios por bactérias endofíticas também pode gerar um desbalanço nos níveis vegetais de hormônio e indiretamente influenciar a resposta imune da planta hospedeira (Bari e Jones, 2009).

As diversas funções dos hormônios demonstram que a sinalização responsável pela imunidade da planta está estritamente relacionada com o desenvolvimento vegetal embora os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não estejam totalmente esclarecidos.

2.3.1. Ácido salicílico

Além dos hormônios citados anteriormente, existem outras substâncias orgânicas naturais que apresentam uma grande atividade biológica, quando aplicadas exogenamente em baixas concentrações, entre elas está o ácido salicílico. Seu nome deriva do latim *salix* (salgueiro – árvore de onde é extraído) e é um tipo de ácido fenólico que funciona como hormônio vegetal. Extratos da casca do salgueiro faziam parte da medicina ocidental na Antiguidade Clássica e Idade Média e eram muito utilizados por seus efeitos sobre a dor, febre e inflamações. No século XIX, após muitas tentativas frustradas de se tentar isolar os compostos presentes na casca do salgueiro responsáveis por estas características, o ácido salicílico foi descoberto pelo químico italiano Raffaele Piria (Taiz e Zeiger, 2004).

Sua síntese está ligada à rota fenilpropanoide onde o ácido cinâmico age com o precursor. Nas plantas, este atua com funções no desenvolvimento, fotossíntese, transpiração e absorção de íons. Também induz mudanças na anatomia foliar e está envolvido em processos de sinalização e defesa vegetal contra patógenos. A defesa mediada por ácido salicílico ocorre pela indução na produção de proteínas relacionadas à patogênese e está envolvido na resistência sistêmica adquirida (SAR) (Van Loon et al., 1998).

Durante o desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade ao patógeno, produz-se, na proximidade da zona necrótica, uma maior quantidade de ácido

salicílico. Uma parte do ácido entra no floema e pode ser detectado em outras folhas. Este aumento na síntese de ácido salicílico induz a síntese de proteínas de resistência e desencadeia resistência a posteriores infecções (SAR) (Van Loon et al., 1998).

Para o entendimento do papel do ácido salicílico durante a defesa vegetal, muitos mutantes defectivos na produção ou percepção deste hormônio têm sido desenvolvidos. Tais mutantes não apresentam uma resposta sistêmica efetiva em resposta ao contato com o patógeno, demonstrando a importância deste hormônio durante o processo de sinalização e defesa vegetal. Linhas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, expressando o gene bacteriano *NahG*, são incapazes de acumular ácido salicílico devido à degradação do mesmo pela enzima salicilato hidroxilase e, conseqüentemente, não desenvolvem resistência sistêmica adquirida decorrente da infecção patogênica (Dong, 2004).

2.3.2. Auxina

As auxinas são o grupo hormonal mais conhecido. O termo deriva do grego *auxein*, que significa aumentar ou crescer, e é utilizado para descrever compostos naturais ou sintéticos que apresentam uma atividade similar à do ácido indolacético, o primeiro hormônio isolado de planta (Zazimalova e Napier, 2003).

A síntese deste hormônio pode ocorrer a partir do aminoácido triptofano por três vias diferentes: rota do ácido indolpirúvico (utilizada pela maioria das espécies vegetais), rota da triptamina e rota da indolacetaldoxima (via característica das famílias *Brassicaceae*, *Poaceae* e *Mussaceae*). A existência de mutantes que bloqueiam a síntese do triptofano tem permitido obter evidências que a auxina é produzida por uma rota alternativa, independentemente de triptofano, porém, não se conhece em detalhes tal rota. O precursor desta rota seria o indolglicerolfosfato que, por sua vez, é precursor do triptofano (Davies, 1995).

Os efeitos da auxina, no crescimento e na morfogênese das plantas, são múltiplos e complexos e se devem principalmente à sua ação no alongamento, divisão e diferenciação celular. A auxina está envolvida em crescimento de órgãos, tropismos, dominância apical, inibição da abscisão, formação de raízes, iniciação floral e desenvolvimento de frutos. Seus efeitos fisiológicos dependem

de muitos fatores: nível de auxina livre, tipo de auxina, estado de desenvolvimento e sensibilidade do tecido vegetal à auxina (Davies, 1995).

Embora tenha muitos efeitos, principalmente no desenvolvimento de plantas, a auxina também tem papel importante durante a defesa vegetal. Recentes estudos revelaram que este hormônio atua de forma integrada com outros hormônios vegetais, entre estes, o ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Evidências sugerem que a auxina e o ácido salicílico desempenham funções antagonistas durante a defesa das plantas, enquanto que a auxina e o ácido jasmônico atuam de forma cooperativa (Kazan e Manners, 2009).

Muitos micro-organismos também podem produzir a auxina como mecanismo de patogênese vegetal. Tal fato ocorre com as bactérias *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Erwinia herbicola* e estirpes de *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* e pv. *syringae*, bem como nas interações simbióticas mutualísticas (*Rhizobium* sp.); ou ainda, na promoção do crescimento vegetal por bactérias benéficas. Neste último grupo, estão incluídos membros do gênero *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, bem como, *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae* e *G. diazotrophicus* (Patten e Glick, 1996).

2.3.3. Etileno

No século XIX, quando a queima do carvão era utilizada como fonte de energia para a iluminação das ruas, observava-se que as árvores, nas proximidades das lâmpadas, desfolhavam com maior intensidade que as outras. A partir dessas observações, deduziu-se que o gás emitido pela queima do carvão era o responsável por tal efeito. Em 1901, Dimitry Neljubov, estudante do Instituto Botânico de São Petersburg na Rússia, identificou o etileno como a molécula presente no gás que causava essa resposta vegetal (Taiz e Zeiger, 2004).

Identificado em 1910, como um produto natural dos tecidos vegetais, e 1934, como um hormônio, o etileno é produzido por quase todas as partes vegetais, embora a proporção dependa do tecido e do estágio de desenvolvimento. O tecido meristemático é o mais ativo na biossíntese de etileno, sendo tal hormônio também produzido durante a senescência vegetal, o amadurecimento de frutos, assim como durante ferimentos e estresses, tais

como, seca, doenças e alterações de temperatura (Taiz e Zeiger, 2004).

O etileno (C_2H_4) é um hidrocarboneto insaturado da família das olefinas, sendo classificado como eteno. É um gás incolor, levemente adocicado e de odor etéreo, sendo o hormônio mais largamente utilizado na agricultura (Taiz e Zeiger, 2004). A sua via de biossíntese foi descrita por Yang e Hoffman (1984), que compreende dois passos com reações enzimáticas. Na primeira reação, S-adenosilmetionina (SAM) é convertido em ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) pela ação da enzima ACC sintetase (ACS). O ACC é então metabolizado pela enzima ACC oxidase (ACO), por uma reação de oxidação que necessita de O_2 e ferro, e que é ativada pelo CO_2 para produzir etileno. Outra importante reação é o chamado ciclo de Yang, que recupera a metionina e ressynetiza o SAM. Em alguns casos, o etileno regula sua própria produção, induzindo a uma nova síntese de ACS e ACO (Grierson, 1998) (Figura 4).

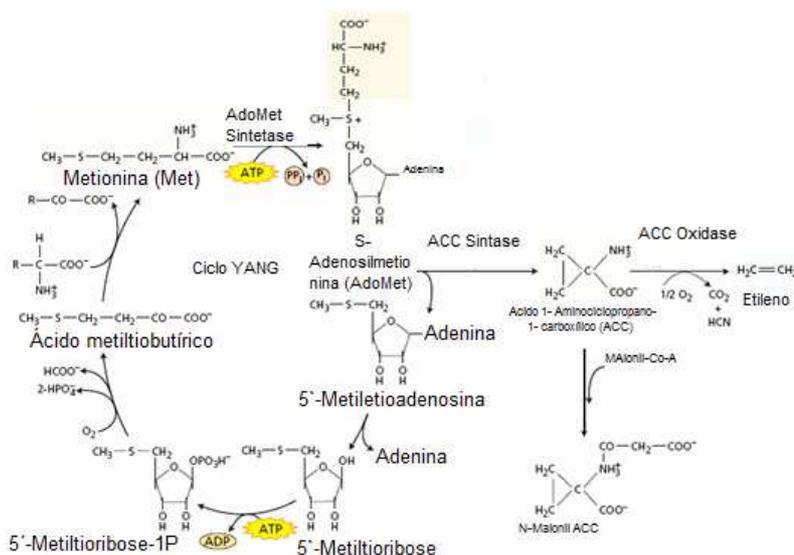


Figura 4 – Via de biossíntese do hormônio etileno e ciclo Yang. (Fonte: Taiz e Zeiger, 2004).

O etileno produzido é percebido por famílias de receptores (incluindo o ETR1- *Ethylene-binding receptors*). Tais receptores ativam a proteína quinase CTR1 (*Constitutive Triple Response*) que ativa outras proteínas, numa cascata de sinalização. Tal via culmina na regulação de fatores de transcrição (incluindo os

da família EREBP, *Ethylene-Responsive Element Binding Proteins*, que incluem ERF1, *Ethylene Response Factor 1* e EDF1, *Ethylene Response DNA Binding Factor 1* ao EDF4, *Ethylene Response DNA Binding Factor 4*), e, como resultado, na transcrição de diversos genes relacionados ao etileno (Pierik et al., 2006) (Figura 5).

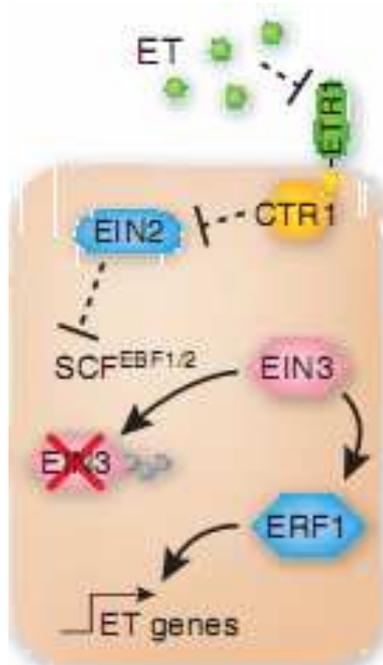


Figura 5 – Via de sinalização do hormônio etileno. O hormônio é percebido por receptores de membrana plasmática como os ETR1. Esses receptores são reguladores negativos da resposta a etileno, porque na ausência do etileno eles mantêm o papel regulatório negativo de CTR1, que reprime o regulador positivo EIN2. Após a percepção do etileno, a repressão da sinalização de etileno por CTR1 é aliviada permitindo a sinalização por EIN2. Após essa sinalização, a expressão de genes responsivos a etileno como o EIN3 se tornam ativos. Fatores de transcrição como os EIN3 ativam a transcrição de fatores como os ERF1 e resultando na expressão de genes responsivos a etileno (Fonte: Corné et al., 2009)

O etileno também pode estimular o crescimento de plantas semiaquáticas (Voeselek e Van der Veen, 1994), tabaco (Pierik et al., 2003) e *arabidopsis* (Smalle et al., 1997). Sua síntese é induzida em condições de estresse, como seca, encharcamento, baixas temperaturas, exposição ao ozônio ou a fermentos, sendo, em todos esses casos, devido a um aumento na transcrição do gene da ACC sintase (Taiz e Zeiger, 2004).

Em algumas situações, outros hormônios, como o ABA e a auxina, podem interagir com o etileno influenciando sua atividade. Plantas que são submetidas à

seca, apresentam um aumento na acumulação de ABA. Esse aumento previne a produção excessiva de etileno que inibiria o crescimento de raízes. O etileno também pode influenciar e afetar as concentrações de ABA vegetal (LeNobel et al., 2004). A auxina, por sua vez, pode alterar a biossíntese de etileno, aumentando sua produção, devido a um estímulo na atividade da ACC sintase. Tal fato demonstra que muitas respostas vegetais, atribuídas à auxina, são na verdade mediadas pela síntese de etileno induzida pela auxina (Taiz e Zeiger, 2004). A interação entre esses dois hormônios também tem sido relatada no crescimento de pelos nas raízes (Pitts et al., 1998) , formação de raízes adventícias (Visser et al., 1996) e fototropismo (Harper et al., 2000).

A produção de etileno está estreitamente envolvida também em resposta de defesa vegetal a patógenos (Taiz e Zeiger, 2004). As plantas frequentemente respondem a uma infecção com aumento na biossíntese de etileno (Abeles et al., 1992). Acredita-se que o aumento na síntese, durante o ataque de um patógeno, alivia o estresse causado por ele, uma vez que impede a difusão da doença por toda a planta. Entretanto, muitos fungos e bactérias patogênicas são capazes de produzir o etileno como um fator de virulência, o qual aumentaria sua habilidade de colonizar os tecidos vegetais (Chagué et al., 2006). Dessa forma, a inibição da síntese ou a não percepção do etileno pela planta, pode diminuir significativamente a severidade de doenças, como a infecção de fungos (Bashan, 1994).

Ainda não está clara a diferente atuação do etileno em determinadas interações planta-patógeno. Enquanto o etileno induz a resistência, quando aplicado antes da infecção; quando gerado durante ou aplicado após a infecção, os sintomas manifestam-se e a doença progride. Acredita-se que tal fato se deve à dupla atividade do etileno, em alguns momentos, atuando como um fator de virulência e, em outros, afetando negativamente a atividade de outros patógenos (Van Lonn et al., 2006).

Com o intuito de se estudar todos os efeitos que o etileno pode induzir nos tecidos vegetais, vários mutantes envolvidos com a via de sinalização desse hormônio têm sido desenvolvidos. Entre esses, os mutantes de *Arabidopsis thaliana*, uma das plantas superiores que melhor se presta às análises de biologia molecular, têm sido os mais utilizados em todo o mundo. Mutantes insensíveis ao etileno, com diversas alterações da morfologia dos cotilédones e hipocótilo

durante a germinação, permitiram identificar os genes *ETR*, *EIN1*, *EIN2*, *ETO1* e *HLS1*. O gene *RHD6* também responde ao etileno, nas raízes, determinando o posicionamento correto dos primórdios dos pelos radiculares (Dolan e Roberts, 1995).

Tais mutantes são de fundamental importância em pesquisas hormonais e na elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nessas vias.

2.4. *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Entre as bactérias já caracterizadas e produtoras de hormônios do crescimento vegetal, está a *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Uma das primeiras bactérias endofíticas diazotróficas isoladas de cana-de-açúcar, em 1988, e que coloniza raiz, caule e folhas de plantas ricas em açúcar (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Li e MacRae, 1991; Reis et al., 1994).

G. diazotrophicus é uma bactéria pertencente à família Acetobacteriaceae, gram-negativa, ácido-tolerante, aeróbica obrigatória, com células medindo 0,7 a 0,9 µm por 1-2 µm, com flagelos laterais e sem esporos. Ela cresce bem em meio de cultura a 30°C, pH de 5,5 e altas concentrações de sacarose (10%). Entretanto, tolera pH mais baixos (3,0 ou menos), concentrações de sacarose de até 30% em meio de cultivo e tem a habilidade de fixar nitrogênio somente em condições de microaerofilia (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Stephan et al., 1991). Tal bactéria apresenta boa adaptação a outras condições extremas, como temperaturas elevadas e altas concentrações de sal em meio de cultura (Tejera et al., 2003).

A associação existente entre a *G. diazotrophicus* e a cana-de-açúcar é denominada “endofítica obrigatória”, uma vez que a bactéria se limita ao interior da planta, não sobrevivendo no solo (Baldani et al., 1997). Sua colonização, que não causa sintomas visíveis de doença ou mudanças na anatomia vegetal, ocorre nos espaços intercelulares (Dong et al., 1997) do colmo, sendo encontrada também em folhas e raízes. Sua entrada ocorre pela ponta da raiz (James et al., 1994). Células de *G. diazotrophicus* também são detectadas intracelularmente no tecido radicular da cana-de-açúcar (Bellone et al., 1997)

Entre os mecanismos responsáveis pela promoção de crescimento vegetal

promovido por *G. diazotrophicus*, estão a fixação biológica de nitrogênio e a produção de hormônios do crescimento (Muthukumarasamy et al., 2005). A bactéria *G. diazotrophicus* é capaz de excretar 50% do nitrogênio fixado, favorecendo o crescimento da planta hospedeira (Cojho et al., 1993) e de produzir auxinas e giberelinas (Muthukumarasamy et al., 1999; Bastian et al., 1998; Fuentes-Ramirez et al., 1993). Estes hormônios são reconhecidos como os possíveis fatores responsáveis pela promoção do crescimento em cana-de-açúcar (Muthukumarasamy et al., 2006).

G. diazotrophicus sintetiza bacteriocinas, cuja atividade de lisossima inibe o crescimento do patógeno de cana-de-açúcar *Xanthomonas albilineans* (Pinon et al., 2002). Adicionalmente, produz levansucrase (LsdA), que permite a bactéria utilizar sacarose como fonte de carbono, levando esse consumo a uma acumulação de ácidos glucônicos que acarretam a acidificação do meio. O acúmulo de ácidos pode promover a solubilização de zinco e de outros compostos fosfatados inorgânicos no solo que, posteriormente, se tornam disponíveis à planta hospedeira (Saravanan et al., 2007).

Por todas essas características peculiares da *G. diazotrophicus*, principalmente por promover o crescimento e proteção da cana-de-açúcar, vários estudos têm sido realizados com o intuito de entender a sua fisiologia e a base genética da sua interação com a planta.

Com esse intuito, pesquisadores do Projeto Riogene, a partir de 2001, juntaram esforços para o sequenciamento do DNA genômico da bactéria *G. diazotrophicus* estirpe PAL-5. Tal sequenciamento identificou 3990 ORFs (*Open reading frame*), alguns deles codificando proteínas de funções já conhecidas como aquelas envolvidas no estabelecimento endofítico, na colonização, na produção de hormônios e na atividade de fixação de nitrogênio (Bertalan et al., 2009). Entretanto, a maioria dos ORFs ainda não foi caracterizada ou validada, aguardando-se novas pesquisas (Lery et al., 2008).

Juntamente com o sequenciamento de *G. diazotrophicus*, outro projeto de fundamental importância, principalmente nos estudos de sua interação com a cana-de-açúcar, é o SUCEST (*Sugarcane EST Genome Project*). Iniciado em 1999 e financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), tal projeto visou a gerar informações acerca do transcriptoma da cana-de-açúcar. Dentro desse projeto, várias bibliotecas de cDNA representando

diferentes condições fisiológicas foram construídas. Dentre elas, uma se destaca, a AD1, originada de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus* (Vettore et al., 2003).

Nessa biblioteca, vários genes foram descritos como tendo uma expressão diferencial em cana-de-açúcar, pela presença de *G. diazotrophicus*. Entre esses genes, estão aqueles potencialmente relacionados com a fixação biológica de nitrogênio, promoção do crescimento, com a resposta a estresses bióticos e abióticos e com a via de sinalização hormonal. Podem-se destacar, nos genes envolvidos com a resposta hormonal, aqueles envolvidos com a via de sinalização do etileno, como EREBP e ETR1, cuja expressão diferencial é encontrada exclusivamente na biblioteca AD1, não sendo encontrada na biblioteca HR1, de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, também presente no SUCEST. Tal expressão diferencial pode estar relacionada com o estabelecimento endofítico de *G. diazotrophicus* (Nogueira et al., 2001).

Ainda não estão claros quais são os mecanismos moleculares que estão envolvidos nas interações planta-bactéria endofítica, entre elas na interação cana-de-açúcar X *G. diazotrophicus*. A investigação da expressão gênica, utilizando-se informações do sequenciamento de *G. diazotrophicus*, juntamente com o projeto SUCEST, será de grande utilidade na elucidação e caracterização dessas vias (Nogueira et al., 2001).

2.5. A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar, monocotiledônia mundialmente conhecida, é uns dos únicos produtos de origem agrícola que, ao longo dos séculos, foi alvo de várias disputas e conquistas. Conhecida e cultivada há séculos, seus primeiros relatos são encontrados nas escrituras mitológicas dos hindus (ProCana, 2008).

Existem algumas controvérsias quanto a sua real origem, entretanto é de consenso geral que ela é oriunda do continente asiático (Lima, 1984). A teoria mais aceita a considera natural da Polinésia, sendo *Saccharum robustum* uma espécie que se originou da Nova Guiné (Cesnik e Miocque, 2004), local onde, em 1928, a expedição Brandes, dos Estados Unidos, descobriu 167 variedades nativas (Lima, 1984).

Em 1493, Cristóvão Colombo, genro de um grande produtor de açúcar, em sua segunda expedição, na Ilha da Madeira, introduziu nas Américas a cana-de-açúcar. No Brasil, os colonizadores portugueses encontraram terras fecundas, de relevos planos, ondulados e suaves, propícios à cultura (Lima, 1984), introduzindo-a a partir de 1502.

O primeiro engenho foi fundado no Brasil em 1532. Em 1536, Pero Luiz Góis fundou, na Capitania de São Tomé, planície de Campos, o Engenho de Vila-de-Rainha (Fernandes, 1984), dando início ao processo industrial de açúcar que até hoje é uma atividade de grande importância econômica na Região Norte Fluminense.

Em 1753, Linneu classificou em seu livro *Species Plantarum*, a cana-de-açúcar como *Saccharum officinarum* e *Saccharum spicatum* (Cesnik e Miocque, 2004). Atualmente, a classificação mais aceita da cana-de-açúcar é conforme descrito a seguir (NCBI, 2009):

- Reino:Plantae
- Divisão:.....Magnoliophyta
- Classe:.....Liliopsida
- Ordem:.....Poales
- Família:.....Poaceae
- Gênero:.....*Saccharum*
- Espécies:.....*Saccharum arundinaceum*
Saccharum baldwinii
Saccharum brevibarbe
Saccharum fulvum
Saccharum giganteum
Saccharum officinarum
Saccharum barberi
Saccharum edule
Saccharum sinense
Saccharum ravennae
Saccharum robustum
Saccharum spontaneum

Para a obtenção de elevados padrões de produtividade e resistência às principais doenças e pragas, as variedades utilizadas comercialmente não são variedades botânicas e sim intercruzamentos entre espécies cultivadas e silvestres de *Saccharum*, juntamente com gêneros relacionados que apresentam cruzamentos compatíveis com a cana-de-açúcar, tais como, *Ripidium* e *Sclerostachya*. Esse conjunto de gêneros e espécies compreende a base genética da cana-de-açúcar e tem sido denominado de “Complexo *Saccharum*” (Cesnik e Miocque, 2004).

O genoma da cana-de-açúcar é um genoma amplo e com alto grau de ploidia (Sreenivasan et al.,1987). As cultivares de cana-de-açúcar modernas podem ter entre $2n=100$ e $2n=130$ cromossomos. Clones de *S. officinarum* normalmente têm $2n=80$ cromossomos, e *S. spontaneum* tem entre $2n=40$ e $2n=128$ cromossomos. O genoma não replicado de uma célula somática é 7440 Mpb em *S. officinarum* ($2n=80$) (D’Hont e Glaszmann, 2001).

As qualidades da cana-de-açúcar são relatadas mesmo antes de Cristo, quando o homem já a conhecia como “algo que produzia mel sem o auxílio de abelhas” e que uma “bebida embriagante” poderia ser fabricada a partir do seu caldo. A produção do açúcar conhecida como “sarkara”, existia na Índia desde 3000 a.C. (Cesnik e Miocque, 2004). Devido à sua importância e ao seu grande valor comercial, quantidades de açúcar eram mencionadas como patrimônios em testamentos por reis e nobres, no século XVI, e muitos presentes em forma de estátuas de açúcar eram ofertados em cerimônias de coroamento de reis e papas (ProCana, 2008).

A importância econômica da cana-de-açúcar é principalmente devido à sua múltipla utilização. A partir dela, são obtidos a rapadura, o melado, a aguardente, o açúcar, o álcool e produtos farmacêuticos (Meirelles, 2006). O impulso em sua produção no Brasil surgiu com o advento, na década de 70, do Programa Nacional do Álcool – PROÁLCOOL. Este programa foi de grande importância econômica, estratégica e ambiental e tornou o Brasil um dos principais países a utilizar esta forma de combustível (Ferreira, 2002).

Em 2010, a safra produziu cerca de 604 milhões de toneladas, numa área de 8 milhões de hectares, o que representou um aumento de 10,2% na área plantada em relação a 2009. São Paulo continua como maior produtor nacional,

sendo responsável por 53,60% da produção brasileira (362 milhões de toneladas). A região Centro-Oeste é a que mais cresce, tendo o estado de Mato Grosso do Sul aumentado sua área cultivada em 51,4% em 2010 (Conab, 2010).

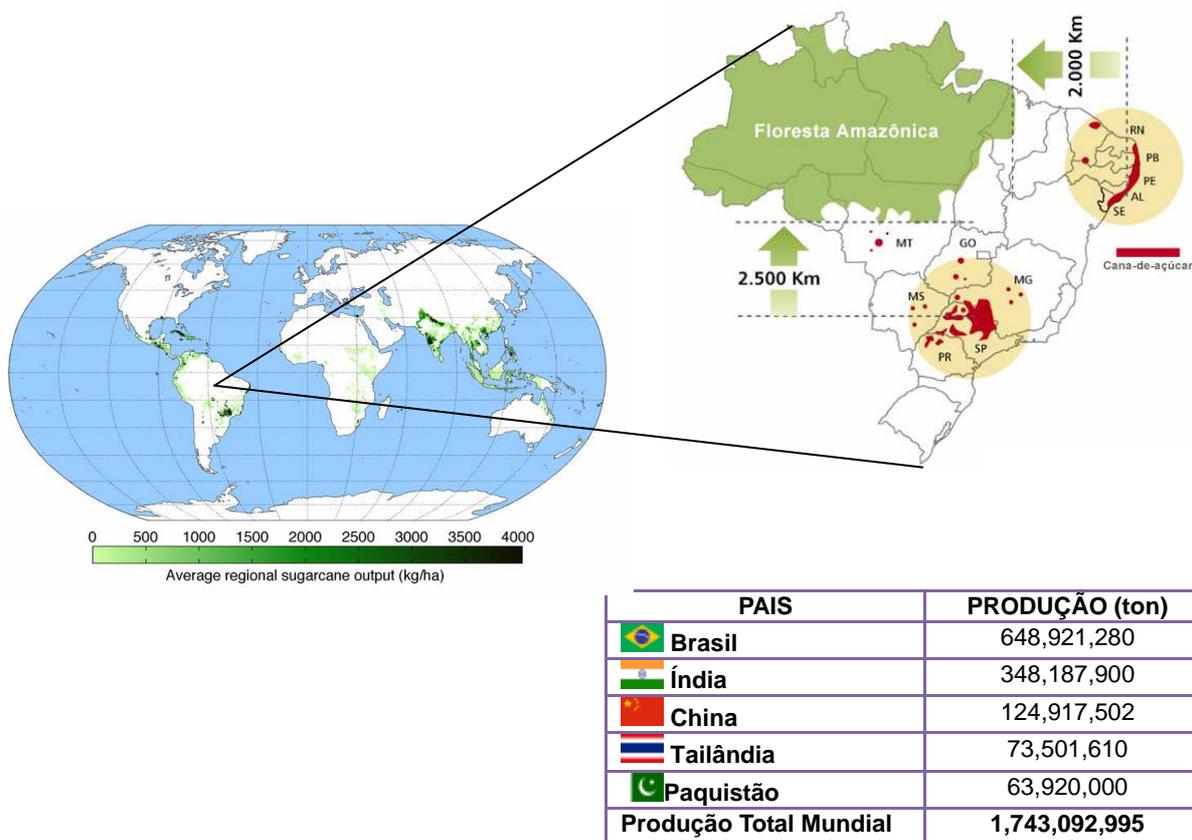


Figura 6 – Distribuição e produção de cana-de-açúcar em todo o mundo em 2008.

(Reproduzida de FAO, 2010; IBGE 2010).

2.6. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudo em genética molecular de plantas

Nos estudos de hormônios vegetais, algumas metodologias podem ser utilizadas. Dentre elas, a utilização de mutantes, ou a aplicação do hormônio ou do seu inibidor. Porém, para se aplicar o hormônio, é necessário que esse já tenha sido purificado e, além disso, não se conhece o efeito da aplicação exógena nos níveis endógenos do hormônio. A aplicação de inibidores não está disponível para todas as classes hormonais e nem sempre o inibidor é específico a um

determinado hormônio. Adicionalmente, o acesso de tais hormônios a tecidos internos pode ocorrer em concentrações impróprias para o efeito desejado. Dessa forma, a utilização de mutantes se tornou a ferramenta mais aplicada em biologia molecular (Cavalini et al., 2004).

O fato de a cana-de-açúcar possuir alto grau de ploidia torna extremamente difícil a obtenção de seus mutantes hormonais. Nesse sentido, são utilizados modelos vegetais que permitem mutações. Entre eles, estão: tomate, ervilha, milho, arroz e *arabidopsis* (Cavalini et al., 2004).

A *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh é uma dicotiledónea descoberta por Johannes Thal (de onde surge o nome *thaliana*) nas montanhas Harz, Alemanha, no século XVI e se encontra distribuída por vários continentes, principalmente nas regiões temperadas do hemisfério norte (TAIR, 2010). Sua classificação atual é (NCBI, 2010):

- Reino:Plantae
- Divisão:.....Magnoliophyta
- Classe:.....Magnoliopsida
- Ordem:.....Brassicales
- Família:.....Brassicaceae
- Gênero:.....*Arabidopsis*
- Espécie :.....*Arabidopsis thaliana*

O primeiro mutante, AGAMOUS, foi descrito, em 1873, por Alexander Braun (*Arabidopsis* Home, 2010) e, em 1943, Friedrich Laibach relatou sobre o potencial desta espécie como planta modelo. Não considerada uma planta de interesse econômico e com suas características peculiares (ciclo de vida curto, pequeno tamanho, genoma relativamente pequeno, autogamia, o que permite que novas mutações se tornem homozigotas, susceptibilidade à infecção por *Agrobacterium tumefaciens*), tornou-se o organismo modelo no estudo de genética molecular de plantas (Raven et al., 1996).

Uma vantagem apresentada por plantas de *Arabidopsis* é o seu pequeno genoma. Muitas espécies vegetais têm genomas grandes, muitas vezes como resultado de eventos de poliploidização e acúmulo de sequências não-codificadoras, durante sua evolução. O milho tem um genoma de cerca de 2400 Megabases - cerca de 19 vezes o tamanho do genoma de *Arabidopsis*. O genoma

do trigo é 16000 Megabases - 128 vezes maior que a *Arabidopsis* e 5 vezes maior do que o *Homo sapiens* - e tem três cópias de muitos de seus genes. Os genomas grandes representam desafios para as pesquisas, incluindo dificuldades no sequenciamento, bem como no isolamento e clonagem de locos mutantes (TAIR, 2010).

Arabidopsis thaliana foi a primeira planta e o terceiro organismo multicelular, depois de *Caenorhabditis elegans* (The *C.elegans* Sequencing Consortium, 1998) e *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000), a ser sequenciado (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), o que ocasionou um aumento gradativo no número de trabalhos publicados que a utilizam como planta modelo, cerca de 20 por dia útil (Bevan e Walsh, 2006) (Figura 7).

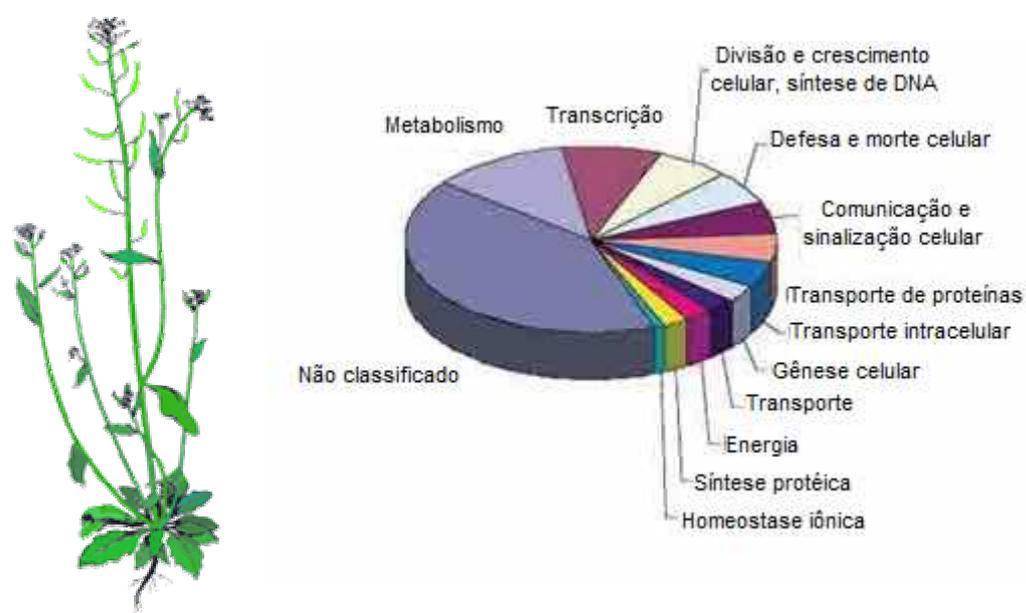


Figura 7- *Arabidopsis thaliana* e análise funcional de seus genes (Nature, 2000).

A disponibilidade de uma ampla base de conhecimento sobre *Arabidopsis* e as ferramentas de pesquisa desenvolvidas permitem sua utilização em estudos de bioquímica, fisiologia, genética, entre outros. A espécie vem sendo utilizada em estudos de crescimento e desenvolvimento vegetal, como, por exemplo, o processo de floração que envolve uma complexa rede de vias de sinalização, sendo modulada por condições ambientais (Mouradov et al., 2002), e na identificação de genes envolvidos na resposta à limitação de fósforo (Sánchez-Calderón et al., 2006).

São muitas as possibilidades de uso do conhecimento adquirido em

A.thaliana nas espécies agrícolas. Após o seu sequenciamento, o objetivo principal recai sobre a elucidação da função de cada um dos seus 26.000 genes. A partir dessas descobertas, as diversas rotas metabólicas e suas interações nos processos fisiológicos vegetais poderão ser elucidadas (Delatorre e da Silva, 2008).

3 - OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a participação das vias de produção e percepção do hormônio etileno, em comparação ao ácido salicílico e auxina, durante o processo de interação entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* e plantas de cana-de-açúcar e *Arabidopsis thaliana*.

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar o efeito da inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* sobre os níveis de emissão de etileno por plantas de cana-de-açúcar;
- Avaliar, em plantas de *A. thaliana* mutantes para etileno, ácido salicílico e auxina, a resposta de defesa decorrente da colonização por *G. diazotrophicus*, quanto aos parâmetros de teor de pigmentos fotossintéticos, teor de fenólicos vegetais, deposição de calose e morte celular;
- Avaliar o efeito de mutações nas vias de produção e percepção de etileno, ácido salicílico e auxina em plantas de *A. thaliana*, durante a colonização por *G. diazotrophicus*.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e condições de cultivo

4.1.1. Cultura “*in vitro*” de cana-de-açúcar

Durante os trabalhos, foram utilizadas plantas de cana-de-açúcar da cultivar RB758540, 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 expostos à termoterapia que consiste na imersão dos mesmos em água a 52°C por 2 horas para redução de microorganismos. Após o tratamento, os minitoletes foram plantados em vasos plásticos de 700 mL, contendo substrato inerte e autoclavado, composto por uma mistura de areia, vermiculita e substrato comercial (PLANTMAX^R) numa proporção de 2:1:1. Em seguida, foram transferidos para casa-de-vegetação, onde permaneceram por 30 dias e, então, foram utilizados para a retirada de ápices meristemáticos e posterior indução da cultura de tecidos.

Os meristemas foram submetidos à desinfestação superficial com solução de álcool 70% (v/v) por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio a 0,5% (p/v) por 20 minutos, sob agitação, e três lavagens com água destilada autoclavada. Foram utilizados, como explantes, segmentos basais de folhas jovens não expandidas, sendo retiradas as folhas expandidas uma a uma, até ficar um cilindro central com

aproximadamente 5 mm de diâmetro e 1 cm de comprimento. Os explantes foram mergulhados em solução de ácido ascórbico a 0,5 g.L⁻¹ para evitar o ressecamento e prevenir a oxidação e, em seguida, foram inoculados nos meios de indução de embriogênese somática direta, como citado por Lee (1984).

Transcorridos cinco passagens da cultura, as plântulas foram induzidas a enraizamento de acordo com Lee (1984). Após 90 dias, já com o sistema radicular desenvolvido, estas foram transferidas para meio de baixo crescimento de *G. diazotrophicus* e seguiram para o processo de inoculação descrito posteriormente.

4.1.2. Cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana*

Os materiais vegetais utilizados foram de plantas de *Arabidopsis thaliana* selvagens, ecótipo COL-0, plantas defectivas para a percepção de etileno (*ein2*, *ein2-1*, *ein2-5*, *ein3-1*, *etr1-3*), a produção ou percepção de ácido salicílico (*NahG*, *sid2-2*) e para a percepção de auxina (*aux1-7*). Tais materiais foram gentilmente cedidos pelo Dr. Frederick Ausubel (Departamento de Biologia Molecular- Hospital Geral de Massachusetts – Harvard Medical School – USA)

As sementes de tais materiais foram submetidas à desinfestação superficial em etanol 95% por 2 minutos, solução de hipoclorito de sódio 50%, sob agitação, por 10 minutos e seis lavagens em água destilada autoclavada. Estas foram mantidas por 2 dias a 4°C. Posteriormente, foram transferidas para substrato inerte e autoclavado “Jiffy-7 pellets” e acondicionadas em câmara de cultivo apropriada (22°C e irradiância de 120 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante 12 horas por dia)

Em intervalos de 15 dias, as plantas foram irrigadas com solução de *Hoagland* modificada (Hoagland e Arnon, 1938) contendo KNO₃ 6,0 mM, Ca(NO₃)₂.4H₂O 4,0 mM, NH₄H₂PO₄ 2,0 mM, MgSO₄.7H₂O 1,0 mM, KCl 0,05 mM, H₃BO₃ 0,025 mM, MnSO₄.H₂O 2,0 μM , ZnSO₄.7H₂O 2,0 μM , CuSO₄.5H₂O 0,5 μM , H₂MoO₄ 0,5 μM e NaFeDTPA 0,053 mM. O pH foi ajustado para 6,0.

Transcorridas 4 semanas, estas foram inoculadas de acordo com o protocolo posteriormente descrito.

Quadro 1 - Material vegetal transgênico utilizado. (Fonte: Abreu e Munné-Bosch, 2009).

TRANSGÊNICO	DESCRIÇÃO	CARACTERÍSTICAS	CONSTRUÇÃO	ECÓTIPO de <i>A thaliana</i>
<u><i>nahG</i></u>	Afeta o acúmulo de ácido salicílico, devido a presença da enzima salicilato hidroxilase que degrada o respectivo ácido.	Aumento do crescimento vegetal e do conteúdo de nitrogênio e antioxidantes nas sementes. Resistência sistêmica adquirida relacionada a genes PR não desenvolvida.	Clonagem em <i>A. thaliana</i> de um gene que codifica a enzima salicilato hidroxilase originada de <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	Col-0

Quadro 2 - Material vegetal mutante utilizado. (Fonte: *Arabidopsis* hormone e mutant database, 2010)

MUTANTE	DESCRIÇÃO	CARACTERÍSTICAS	CONSTRUÇÃO	ECÓTIPO de <i>A thaliana</i>
<u><i>ein2 e 2-1</i></u> <u><i>Ethylene Insensitive 2 e 2-1</i></u>	Afetado na transdução de sinal do etileno. Atua <i>downstream</i> da CTR1. Regula positivamente ORE 1 e negativamente regula mir164A,B,C envolvido com a senescência foliar.	Insensível ao etileno. Resistente a citocinina em ambiente escuro. Apresenta redução do crescimento bacteriano.	Diepoxibutano (<i>ein 2</i>) Etil metano sulfonato. Substituição de C por T no nucleotídeo 3448, gerando um stop códon.	Col-0
<u><i>ein 2-5</i></u> <u><i>Ethylene Insensitive 2-5</i></u>	Afetado na transdução de sinal do etileno. Atua <i>downstream</i> da CTR1. Regula positivamente ORE 1 e negativamente regula mir164A,B,C envolvido com a senescência foliar.	Insensível a etileno. Sensível a estresse osmótico.	Raio X. Deleção no nucleotídeo 2731 causando um <i>frameshift</i> .	Col-0

Cont. Quadro 2

MUTANTE	DESCRIÇÃO	CARACTERÍSTICAS	CONSTRUÇÃO	ECÓTIPO de <i>A. thaliana</i>
<u><i>ein 3-1</i></u> <u><i>Ethylene Insensitive 3-1</i></u>	Mutação afeta atividade de um fator de transcrição nuclear que inicia a cascata transcricional de resposta a etileno. Este fator atua <i>downstream</i> da histidina quinase receptora de etileno ETR1 e da Raf-quinase CTR1.	Parcialmente sensível ao etileno.	Etil metano sulfonato. Substituição de G por A no nucleotídeo 598	Col-0
<u><i>etr1-3</i></u> <u><i>Ethylene Response 1-3</i></u>	Mutação afeta a ligação de etileno ao receptor membranar localizado na membrana plasmática.	Aumenta o número de raízes laterais. Reduz o transporte de auxina. Afeta o metabolismo de ABA, auxina, citocinina e giberelina.	Etil metano sulfonato.	Col-0
<u><i>sid 2-2</i></u> <u><i>Salicylic Acid Induction Deficient 2-2</i></u>	Mutação afeta a atividade da isocorismato sintase, da via de síntese de ácido salicílico.	Fechamento estomático e resposta a lipopolissacarídeo afetadas na presença de patógenos.	Deleção/ rearranjo no éxon 9.	Col-0
<u><i>aux 1-7</i></u> <u><i>Auxin Resistant 1-7</i></u>	Mutação interfere na transcrição de um transportador de influxo de auxina.	Resistente a auxina. Atua nas raízes laterais ou células da epiderme influenciando a posição e iniciação das raízes.	Etil metano sulfonato. Uma substituição de nucleotídeo (G por A no éxon 9) conduz a uma mutação <i>missense</i> Gly459Asp	Col-0

4.2. Micro-organismos, condições de cultivo e processos de inoculação de *G. diazotrophicus* e *Pseudomonas syringae* DC3000

4.2.1. Micro-organismos

Para as inoculações de *G. diazotrophicus* em cana-de-açúcar, foi utilizada a estirpe PAL-5, presente na bacterioteca da UENF. Nos processos de inoculação em *Arabidopsis thaliana* foi utilizada *G. diazotrophicus* resistente ao antibiótico

canamicina. Tal bactéria, mutante intergênico, foi cedida pela doutoranda Aline Chaves Intorne a partir do banco de mutantes desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia da UENF (Intorne, 2008). O micro-organismo patogênico utilizado foi *Pseudomonas syringae* v. *Tomato* DC3000, gentilmente cedido pela Dra. Jen Sheen (Departamento de Genética- Harvard Medical School-USA).

4.2.2. Condições de cultivo

A bactéria *G. diazotrophicus* foi crescida em meio DYGS modificado contendo em g.L⁻¹: 2,0 glicose; 1,5 peptona bacteriológica; 2,0 extrato de levedura; 0,5 K₂HPO₄; 0,5 MgSO₄.7H₂O; 3,75 ácido glutâmico; 5 mL azul de bromotimol 0.5% em 0,2 M KOH. Meio sólido: 15,0 ágar (Rodrigues Neto, 1986). O pH inicial do meio foi ajustado para 6,0 com KOH. (Cavalcante e Döbereiner, 1988).

A bactéria *Pseudomonas syringae* foi crescida em meio LB low salt contendo, em g.L⁻¹: 10,0 triptona, 5,0 extrato de levedura e 5,0 NaCl. O pH inicial do meio será ajustado para 7,0. As culturas foram incubadas em erlenmeyer com chicanas vedadas com mantas de algodão envoltas em gaze, a 30 °C em estufa por 24 h, utilizando-se agitador orbital com rotação de 120 min⁻¹.

4.2.3. Processos de inoculação

4.2.3.1. Padronização das condições de inoculação “*in vitro*” de plântulas de cana-de-açúcar com *G. diazotrophicus*

Para tais foram feitas culturas de *G. diazotrophicus* em erlenmeyer com chicanas vedadas com mantas de algodão envoltas em gaze, a 30 °C em estufa por 24 h, utilizando-se agitador orbital com rotação de 120 min⁻¹. Foram utilizados para comparação um meio de ótimo crescimento (meio DYGS) e baixo crescimento (Água) com os seguintes meios:

Quadro 3 - Composição dos meios de cultura

MEIO	COMPOSIÇÃO	
<p><u>Meio de enraizamento</u> Modificado sem sacarose</p>	<p>Macronutrientes KNO₃ 9,40mM, NH₄NO₃ 20mM, MgSO₄.7H₂O 0,75mM, KH₂PO₄ 0,75mM, CaCl₂.2H₂O 1,5mM, FeSO₄.7H₂O 0,05mM, Na₂EDTA 0,2mM, Vitaminas Ácido nicotínico 0,5mg/L Piridoxina 0,5mg/L Tiamina 0,1mg/L Glicina 2mg/L</p>	<p>Micronutrientes MnSO₄.H₂O 50µM, ZnSO₄.7H₂O 15µM, H₃BO₃ 50 µM, KI 2,5µM, Na₂MoO₄.2H₂O 0,5µM, CoCl₂.6H₂O 0,05µM, CuSO₄.5H₂O 0,05µM</p>
<p><u>Solução de Hoagland</u> (Hoagland e Arnon, 1950) Modificada</p>	<p>KNO₃ 6,0mM, Ca(NO₃)₂.4H₂O 4,0mM, NH₄H₂PO₄ 2,0mM, MgSO₄.7H₂O 1,0mM, KCl 0,05mM, H₃BO₃ 0,025mM, MnSO₄.H₂O 2,0µM, ZnSO₄.7H₂O 2,0µM, CuSO₄.5H₂O 0,5µM, H₂MoO₄ 0,5µM, NaFeDTPA 0,053mM.</p>	
<p><u>Solução Yoshida</u> (Yoshida, 1972)</p>	<p>NH₄NO₃ 40mg/L NaH₂PO₄.H₂O 10mg/L K₂SO₄ 40mg/L CaCl₂ 40mg/L MgSO₄.7H₂O 40mg/L FeCl₃.6H₂O 2mg/L MnCl₂.4H₂O 0,5mg/L ZnSO₄.7H₂O 0,01mg/L CuSO₄.5H₂O 0,01mg/L H₃BO₃ 0,2mg/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 0,05mg/L</p>	

Cont. Quadro 3

MEIO	COMPOSIÇÃO	
<p>MS (Murashige e Skoog, 1962)</p>	<p>Macronutrientes KNO₃ 18,80mM, NH₄NO₃ 41,20mM, MgSO₄.7H₂O 1,5mM, KH₂PO₄ 1,25mM, KI 5µM, CaCl₂.2H₂O 3mM, FeSO₄.7H₂O 0,1mM, Na₂EDTA 0,2mM, Vitaminas Ácido nicotínico 0,5mg/L Piridoxina 0,5mg/L Tiamina 0,1mg/L Glicina 2mg/L</p>	<p>Micronutrientes MnSO₄.H₂O 100µM, ZnSO₄.7H₂O 30µM, H₃BO₃ 100 µM, Na₂MoO₄.2H₂O 1µM, CoCl₂.6H₂O 0,1µM, CuSO₄.5H₂O 0,1µM Sacarose 30g/L</p>
<p>MS (Murashige e Skoog, 1962) Modificado sem sacarose</p>	<p>Macronutrientes KNO₃ 18,80mM, NH₄NO₃ 41,20mM, MgSO₄.7H₂O 1,5mM, KH₂PO₄ 1,25mM, KI 5µM, CaCl₂.2H₂O 3mM, FeSO₄.7H₂O 0,1mM, Na₂EDTA 0,2mM, Vitaminas Ácido nicotínico 0,5mg/L Piridoxina 0,5mg/L Tiamina 0,1mg/L Glicina 2mg/L</p>	<p>Micronutrientes MnSO₄.H₂O 100µM, ZnSO₄.7H₂O 30µM, H₃BO₃ 100 µM, Na₂MoO₄.2H₂O 1µM, CoCl₂.6H₂O 0,1µM, CuSO₄.5H₂O 0,1µM</p>

O meio que apresentou o mais baixo crescimento de *G. diazotrophicus*, mas que permitiu o desenvolvimento das plântulas de cana-de-açúcar, foi o escolhido para o processo de inoculação.

4.3. Inoculação de plântulas de cana-de-açúcar

A cultura de *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi crescida por 24 horas, de acordo com as condições descritas anteriormente. Ao atingir densidade óptica, no comprimento de onda de 600 nm, em torno de 1,0, correspondente a aproximadamente 10^8 células.mL⁻¹ (contagem em câmara de Neubauer), esta foi utilizada para a inoculação. Em condições estéreis, os sistemas radiculares das plântulas de cana-de-açúcar foram mantidos por 6 horas em contato com a cultura. Após este período, as plântulas foram transferidas para o meio de cultura

de baixo crescimento de *G. diazotrophicus* e retransferidas para o novo meio a cada 15 dias.

4.4. Inoculação de plantas de *A. thaliana*

No processo de inoculação de plantas de *A. thaliana*, a cultura foi centrifugada a 2500 min^{-1} por 10 minutos e, após descarte do sobrenadante, as células bacterianas foram ressuspensas em água ultrapura estéril. A densidade óptica final, medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm, esteve em torno de 0,01, correspondente a 10^5 células.mL⁻¹ (contagem em câmara de Neubauer), para *G. diazotrophicus* e 0,001, correspondente a 10^5 CFU.mL⁻¹ para *P. Syringae*.

A inoculação foi realizada a partir da injeção de 0,2 a 0,3 mL da suspensão bacteriana, na concentração de 10^5 CFU.mL⁻¹, na superfície foliar, mediante o manuseio de uma seringa sem agulha (He et al., 2006) .

4.5. Determinação da taxa de emissão de etileno (C₂H₄)

A taxa de emissão de etileno foi determinada no Laboratório de Ciências Físicas – UENF. Foi utilizado um espectrômetro fotoacústico colocada no interior da cavidade de um laser de CO₂ e um sistema comercial de análise de gás (URAS), cujo funcionamento é baseado na absorção do infravermelho. No espectrômetro fotoacústico, mudanças de pressão são detectadas por um microfone fixado no interior de um tubo ressonador da célula fotoacústica, por meio do qual flui a amostra gasosa contendo as moléculas sob investigação; o sinal acústico é produzido pela flutuação periódica de pressão, a uma frequência de ressonância de 1600 Hz (Voesenek et al., 1997).

Quatro plantas de cada tratamento, controle e inoculada com aproximadamente 90 dias de idade e 15 dias de inoculação, foram hermeticamente fechadas durante 14 horas e colocadas dentro de uma câmara, onde os gases (etileno e CO₂) são conduzidos para o sensor fotoacústico, utilizando o ar como gás de arraste, num sistema de fluxo contínuo. Antes de entrar na célula fotoacústica, o gás de análise passa através de uma armadilha de N₂ líquido, eliminando assim traços de CO₂ e de H₂O e hidrocarbonetos de alto

peso molecular. Após a passagem pela célula fotoacústica, este fluxo é lançado para o ambiente. O sistema é calibrado diariamente usando-se uma amostra padrão de etileno diluída em ar sintético na concentração de 1 ppm. Na análise de gases como um todo, será possível monitorar simultaneamente a emissão de etileno e de CO₂.

4.6. Extração de pigmentos fotossintéticos

Para a extração de pigmentos fotossintéticos, foram utilizados 2 discos foliares, da região mediana da folha, com cerca de 20 mg de tecido.

Durante a extração, o tecido retirado de cada tratamento foi em tubos de ensaio com tampa, contendo 300µL de DMSO (dimetil sulfóxido). Estes foram mantidos no escuro por 2 dias em temperatura ambiente até a extração total dos pigmentos fotossintéticos.

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

Utilizando-se as equações de Wellburn (1994) foram estimados os teores de pigmento por área foliar em mg/g.

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

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

$$\text{(Carotenóides) } C_{x+c} = (1000 A_{480} - 2,14 C_a - 70,16 C_b)/220$$

4.7. Determinação de fenólicos vegetais

Para a quantificação de antocianinas e flavonóis foram utilizados 2 discos foliares, da região mediana da folha, correspondentes a 20mg de tecido vegetal. As amostras foram maceradas em solução contendo 85% de etanol e 15% de HCl (1,5N). O homogenato foi deixado 12h sob 4°C totalmente protegido da luz. Após o período de incubação foi realizada a leitura de absorbância a 374 e 535 nm. Os teores totais de flavonóis e antocianinas foram calculados por meio das seguintes equações em mg/g:

Flavonóis = $(ABS_{374} \times \text{volume de extração em mL} \times 100) / \text{peso fresco} \times 78,5$

Antocianinas = $(ABS_{535} \times \text{volume de extração em mL} \times 100) / \text{peso fresco} \times 98,2$

4.8. Análise de acúmulo de calose

Discos foliares da região da nervura central das folhas, previamente inoculados com *G. diazotrophicus*, foram clarificados mediante imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% por 2 horas, e, em seguida, lavados três vezes com água ultrapura e corados com o reagente Azul de Anilina 5% em solução tampão de K_2HPO_4 pH 9,5 por 1 hora. As amostras foram examinadas quanto ao acúmulo de calose por meio de microscopia de fluorescência, utilizando-se um aumento de 5X (Benitez-Afonso et al., 2009).

4.9. Análise de morte celular

Para análise de morte celular, quatro discos foliares foram imersos em 1 mL de solução de azul de Evans a 0,25% e incubados em agitador a 80 min^{-1} por 20 minutos. Em seguida, foram lavados em água ultrapura até a retirada total do corante e macerados com 0,5 mL de SDS a 1%. Posteriormente, foram adicionados 0,5 mL água ultrapura e centrifugados a 5000 min^{-1} por 3 minutos. Uma alíquota de 0,8 mL do sobrenadante foi utilizada para leitura em espectrofotômetro a 600 nm. A determinação de morte celular foi realizada por porcentagem, considerando o branco como 0% de morte celular.

4.10. Análise dos níveis de colonização

Para mensurar o crescimento bacteriano nas folhas inoculadas, dois discos foliares foram submetidos à maceração em água ultra pura estéril. Em seguida, foram feitas diluições seriadas (He et al., 2006).

Para quantificação de *G. diazotrophicus*, as amostras foram plaqueadas em meio LGI-P sólido contendo, em g.L^{-1} : 100,0 sacarose; 0,2 K_2HPO_4 ; 0,6 KH_2PO_4 ; 0,2 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,2 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 0,002 $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$; 0,01

FeCl₃.6H₂O, 5 mL azul de bromotimol 0.5% em 0,2 M KOH; 15 ágar, acrescido do antibiótico canamicina 50 µg.mL⁻¹. O pH inicial do meio foi ajustado para 5,5.

Para quantificação de *P. syringae*, as amostras foram plaqueadas em meio LB *low salt* sólido contendo, em g.L⁻¹: 5 NaCl, 2,5 extrato de levedura 5 triptona, 15 ágar, acrescido do antibiótico rifampicina 50 µg.mL⁻¹. O pH inicial do meio foi ajustado para 7,4.

Unidades formadoras de colônia foram contadas dois dias após a incubação a 28 °C, para *P. syringae* e após quatro dias para *G. diazotrophicus*.

4.11. Análise Estatística

Os dados foram organizados e os gráficos gerados no programa Microsoft Excel. Posteriormente, os dados foram testados através da análise de variância (ANOVA). Quando necessário, o teste *t* foi utilizado para comparação entre os tratamentos no nível de 5% de significância.

5 - RESULTADOS

5.1. Obtenção de plântulas de cana-de-açúcar por meio da cultura de tecidos vegetais

Para a realização dos ensaios de inoculação de *G. diazotrophicus* e posterior quantificação da taxa de emissão de etileno, foi necessária a obtenção de plântulas de cana-de-açúcar a partir da cultura *in vitro*. A fim de maximizar a obtenção de plantas micropropagadas de maneira mais rápida e eficiente, optou-se por trabalhar com a técnica de embriogênese somática direta, que é a formação de tecidos e órgãos vegetais sem passar pela calogênese (Figura 8).

Cerca de um sexto dos explantes retirados foi danificado pela oxidação. Neste processo, ocorre a liberação de compostos fenólicos pelas células danificadas pelo corte, escurecendo o meio de cultura e podendo afetar o desenvolvimento dos tecidos vegetais. Tal fato, entretanto, não se tornou limitante para a obtenção de plântulas de cana-de-açúcar. A percentagem de formação de embriões viáveis foi da ordem de 44%.

Durante a indução da embriogênese somática, foi possível constatar a diferenciação dos tecidos vegetais em intervalos de 10 dias. Quando os embriões foram separados do explante e transferidos para os tubos de ensaio, contendo meio MS com reguladores de crescimento, surgiram regiões clorofiladas, após 15 dias do subcultivo, e a formação de primórdios foliares. Após 60 dias em meio de diferenciação, plantas completas foram regeneradas e formaram-se perfilhos.

Diante dos resultados, observa-se a viabilidade da técnica de micropropagação da variedade RB758540 de cana-de-açúcar por meio da indução de embriogênese somática direta. A partir dela foi possível a obtenção de plantas no período de 90 a 100 dias após a inoculação dos explantes *in vitro*.

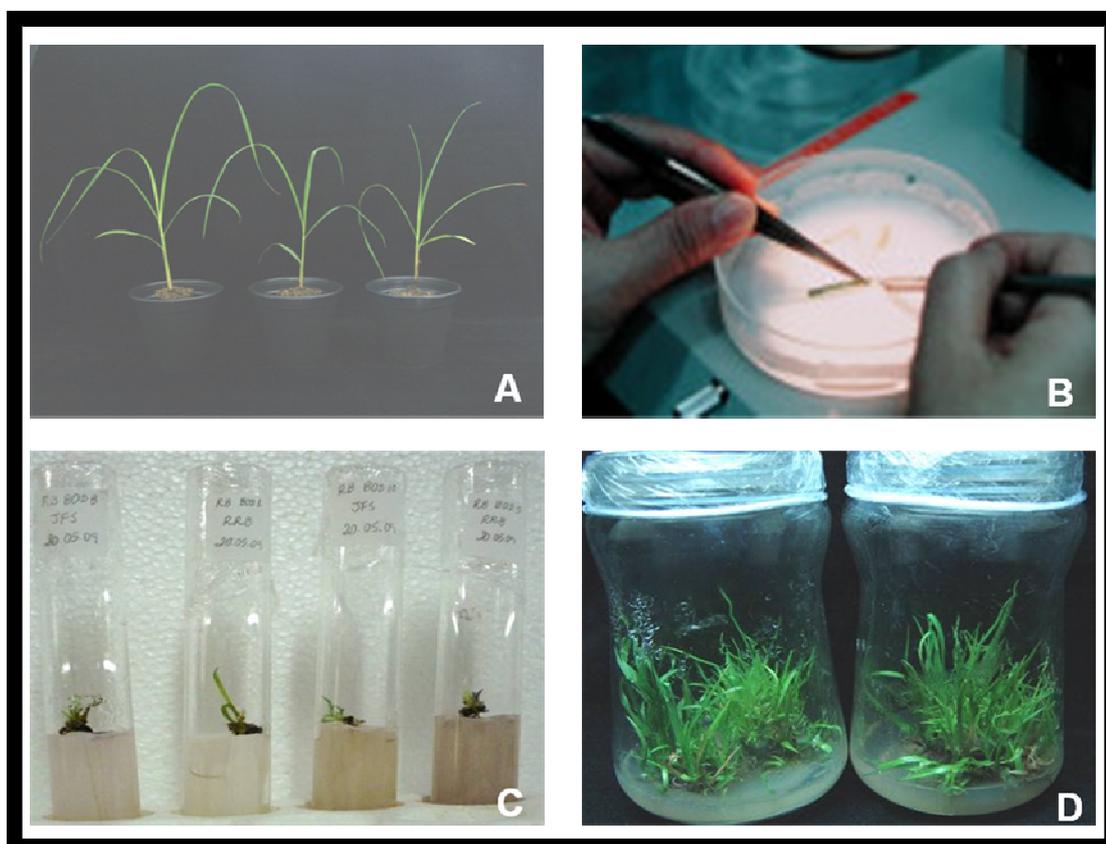


Figura 8 - Regeneração de plantas de cana-de-açúcar RB758540 por embriogênese somática direta. A) Plantas de cana-de-açúcar em casa de vegetação, após 30 dias. B) Retirada de explantes em fluxo laminar. C) Explantes em indução de embriogênese somática direta com 10 dias de cultivo D) Plântulas de cana-de-açúcar em meio MS em multiplicação.

5.2. Padronização das condições de inoculação “*in vitro*” de plântulas de cana-de-açúcar com *G. diazotrophicus*

Para que as inoculações de *G. diazotrophicus* em plântulas de cana-de-açúcar ocorressem de forma eficiente foi necessária a obtenção de um meio para a cultura *in vitro* que inibisse o crescimento excessivo de *G. diazotrophicus* na superfície da plântula.

Como se pode observar na Figura 9, a solução nutritiva Yoshida, utilizada

como meio de cultura, inibiu o crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, o que não era desejado para os ensaios, já que se buscava uma inibição parcial e não total do crescimento. A solução de Hoagland foi eficiente para diminuir o crescimento bacteriano, mas não permitiu um crescimento adequado das plântulas *in vitro*. No meio MS normal, houve um crescimento elevado de *G. diazotrophicus*, o que não foi observado no mesmo meio sem sacarose. De acordo com esses resultados, o meio MS sem sacarose foi o escolhido, nesse primeiro ensaio, para o processo de inoculação.

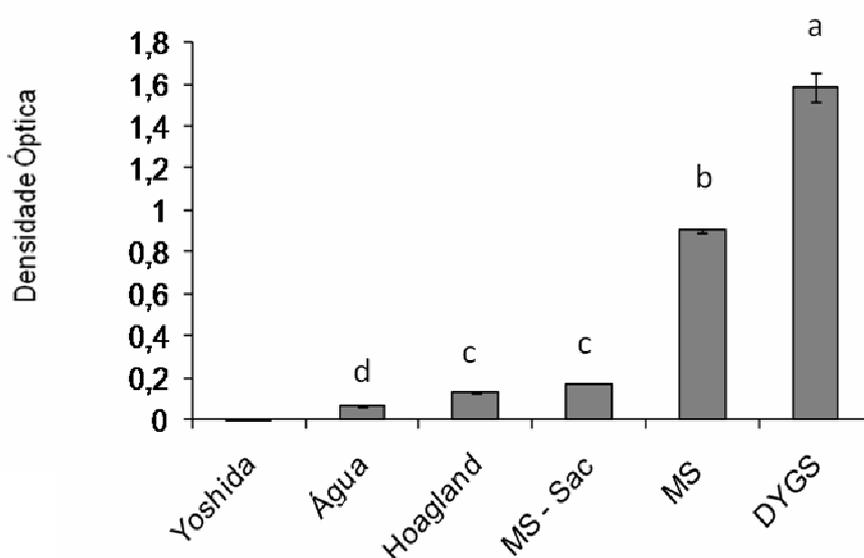


Figura 9 - Crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em diferentes meios de cultura. Inoculação a 2% e 24h de tempo de crescimento a 120 min^{-1} . Colunas representam a média de 3 repetições e as barras os desvios padrões das médias. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tratamentos (Teste *t* com 5% de probabilidade).

Em segunda análise, levou-se em consideração o fato de as plântulas *in vitro* já estarem estabilizadas em meio de enraizamento antes de serem inoculadas, e que este meio era de composição semelhante ao meio MS. Assim, da mesma forma que o ensaio anterior, foi testado o crescimento bacteriano no meio de enraizamento sem sacarose, para avaliar se este poderia ser utilizado durante a inoculação.

A partir dos resultados apresentados na Figura 10, foi possível observar que *G. diazotrophicus* apresentou reduzido crescimento no meio de enraizamento

sem sacarose. Desta forma, este meio foi escolhido como o meio padrão para o processo de inoculação das plântulas de cana-de-açúcar.

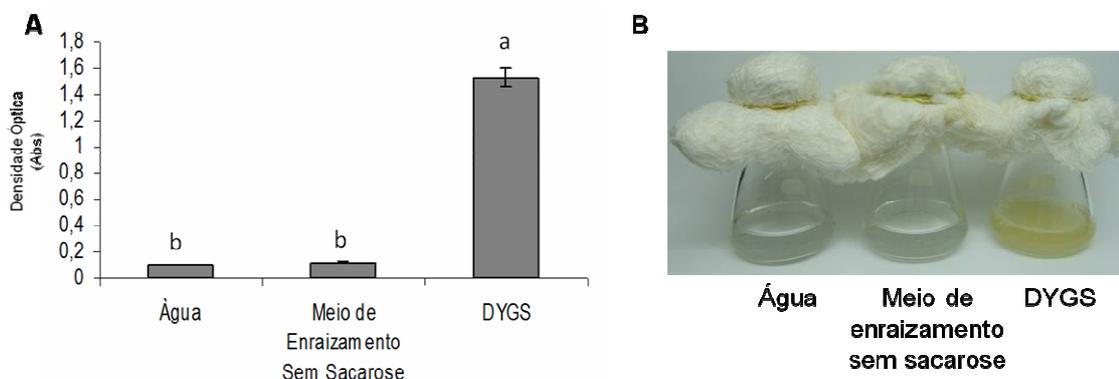


Figura 10 – Crescimento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em diferentes meios de cultura. (A) Inoculação a 2% e 24h de tempo de crescimento a 120min^{-1} . Colunas representam a média de 3 repetições e as barras os desvios padrões das médias. (B) Inóculos de *G. diazotrophicus* nos diferentes meios. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tratamentos (Teste *t* com 5% de probabilidade).

Em condições estéreis, as plântulas de cana-de-açúcar foram inoculadas com *G. diazotrophicus* e não apresentaram, visualmente, crescimento bacteriano excessivo no meio de cultura vegetal, como mostrado na Figura 11. A colonização das plântulas de cana-de-açúcar por *G. diazotrophicus* foi analisada por contagem a partir de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) (dados não apresentados). Os resultados demonstraram que o meio de enraizamento sem sacarose era o ideal para processos de inoculação *in vitro* de *G. diazotrophicus*.

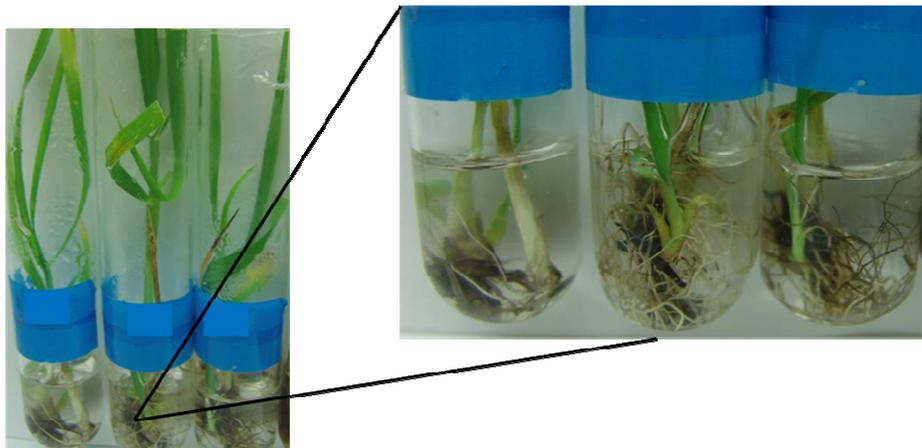


Figura 11 – Plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

5.3. Quantificação da taxa de emissão de etileno de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *Gluconacetobacter diazotrophicus*

As plantas frequentemente respondem a uma infecção com aumento na biossíntese de etileno (Abeles et al., 1992). Acredita-se que muitas bactérias e outros micro-organismos induzem, nas plantas, um aumento na síntese de etileno, ou se utilizam da emissão natural desse hormônio pelo sistema de defesa das plantas, para aumentar sua habilidade de colonizar os tecidos vegetais (Chague et al., 2006).

Com o intuito de analisarmos se *Gluconacetobacter diazotrophicus* se utiliza desse mecanismo para, possivelmente, colonizar de forma eficiente plantas de cana-de-açúcar, realizamos a quantificação dos níveis de emissão desse hormônio em plântulas de cana-de-açúcar controle e inoculadas com *G. diazotrophicus*. Para uma análise comparativa, com o objetivo de observar se ocorre emissão de etileno de forma semelhante em plântulas com estresse abiótico, foi quantificada a emissão de etileno de plântulas, sob estresse salino a 1,5% NaCl, por 48 horas.

Como é possível observar na Figura 12, a taxa de emissão de etileno em plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* e inoculadas submetidas ao estresse se

mostrou superior à das plantas controle. Comportamento semelhante foi apresentado pelas plantas submetidas somente ao estresse salino.

Segundo ANOVA, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o controle e os demais tratamentos. Plantas submetidas aos três tratamentos (estresse salino, inoculação, inoculação + estresse salino) não apresentaram diferenças significativas entre si ($p > 0,05$).

Os resultados indicam que a presença de *G. diazotrophicus* induz, nas plantas de cana-de-açúcar, um aumento na síntese de etileno semelhante ao que o estresse salino induz. Também se observa que o estresse salino e a inoculação provocam aumento na síntese de etileno de forma semelhante, individualmente e em conjunto, sem efeitos aditivos.

Tais dados mostram que o aumento da síntese de etileno provocado pela presença de *G. diazotrophicus* pode ser meramente por uma resposta de defesa vegetal, ou pode ser induzida por *G. diazotrophicus*, como um mecanismo necessário para sua eficiente colonização.

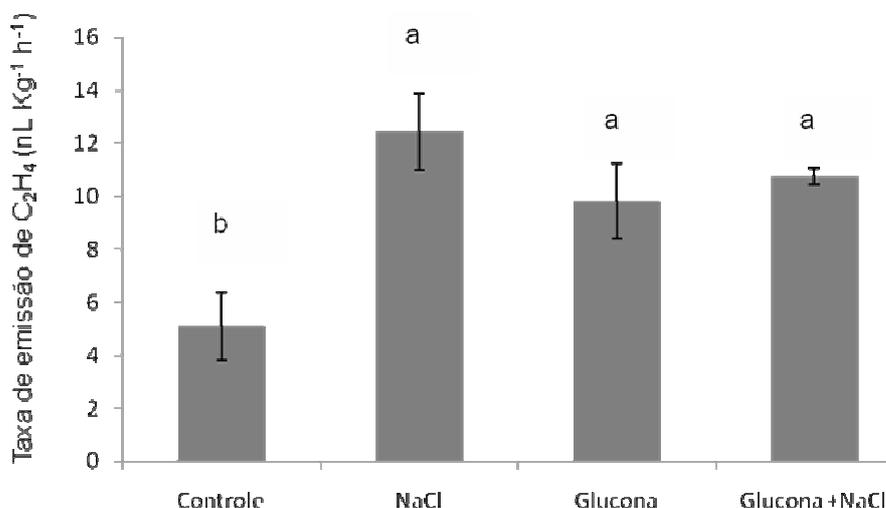


Figura 12 - Taxa de emissão de etileno de plântulas de cana-de-açúcar submetidas à inoculação com *G. diazotrophicus*, somente ao estresse salino (1,5% NaCl por 48h) e a inoculação com posterior estresse salino (1,5% NaCl por 48h). Colunas representam a média de 4 repetições e as barras o desvio-padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre tratamentos (Teste *t* com 5% de probabilidade).

5.4. Análise da resposta de defesa vegetal à inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Com o objetivo de analisar o efeito da presença de *G. diazotrophicus* nas respostas imune vegetal e a importância dos hormônios etileno, auxina e ácido salicílico, durante esse processo, foram utilizadas plantas defectivas para a produção ou percepção de: etileno (*ein2*, *ein2-1*, *ein2-5*, *ein3-1*, *etr1-3*) ácido salicílico (linhagem transgênica *NahG* e mutante *sid2-2*) e auxina (*aux1-7*).

Foram avaliados os efeitos decorrentes da colonização de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus* quanto à resposta relacionada com o teor de pigmentos fotossintéticos, teor de fenólicos vegetais (antocianinas e flavonóis), deposição de calose e morte celular.

5.4.1. Quantificação dos teores de pigmentos fotossintéticos

Os dados de clorofila *a* obtidos na Figura 13 A mostram que, em Col-0 e nos mutantes *ein3-1* e *etr1-3*, a inoculação com *P. syringae* promove maiores níveis de degradação de clorofila *a*. Já a inoculação com *G. diazotrophicus* promoveu níveis reduzidos de clorofila *a* apenas nos mutantes *ein3-1* e *etr1-3*, indicando que sua presença, de forma geral, não promove sintomas de doença nas plantas selvagens (Col-0) e nem nos mutantes defectivos para etileno, auxina e ácido salicílico.

Resultado semelhante foi obtido em relação à clorofila *b*, Figura 13 B. A inoculação com *P. syringae* promoveu redução dos níveis desta clorofila nas plantas selvagens (Col-0) e nos mutantes *ein 2-5*, *ein3-1*, *etr1-3*, *Sid 2-2* e *aux1-7*, indicando, portanto, a existência de degradação de pigmentos fotossintéticos. Nos outros mutantes, não há indício de redução. Já a presença de *G. diazotrophicus* reduziu os níveis de clorofila *b* em Col-0 e nos mutantes *ein3-1* e *etr1-3* e promoveu aumento nos mutantes *sid2-2* e *aux1-7*. Alterações não foram observadas nos outros mutantes, indicando que sua colonização não induz a degradação de clorofila *b*.

Plantas inoculadas com *P. syringae* só apresentaram redução dos níveis de carotenoides nos mutantes *ein 2*, *ein2-1* e *ein3-1*, sugerindo que estes foram os que apresentaram, em relação ao controle, os menores níveis de estresse pela

inoculação, Figura 13 C. A inoculação de *G. diazotrophicus* promoveu diferentes respostas nos mutantes, apresentando maiores níveis de carotenoides, em relação a seus controles, em Col-0 e no *sid2-2*, e menores em *ein 2*, *etr1-3* e *aux 1-7*, sendo este último o que apresentou a maior redução.

Tais resultados sugerem que os mutantes de etileno apresentam, embora em proporções diferentes, degradação de clorofila *a* e *b* em resposta à inoculação com *P. syringae*. Quando inoculados com *G. diazotrophicus*, apenas os mutantes *ein3-1* e *etr1-3* apresentam degradação das clorofilas. Pode-se destacar que, entre todos os mutantes, estes dois últimos foram os que responderam de forma semelhante às inoculações tanto de *P. syringae* como de *G. diazotrophicus*, com degradação de pigmentos fotossintéticos.

Entre os outros mutantes, somente o *aux 1-7* foi o que apresentou reduções mais significativas de suas clorofilas em presença de *P. syringae*, o que não foi observado em resposta à inoculação por *G. diazotrophicus*.

Os dados também sugerem que todos os mutantes de etileno, assim como os de ácido salicílico e auxina, respondem de forma heterogênea à inoculação de *P. syringae* e de *G. diazotrophicus*, com relação aos seus níveis de carotenoides. Conseqüentemente, a atividade antioxidante, exercida por este pigmento acessório, também se apresenta diferenciada entre eles em resposta às inoculações.

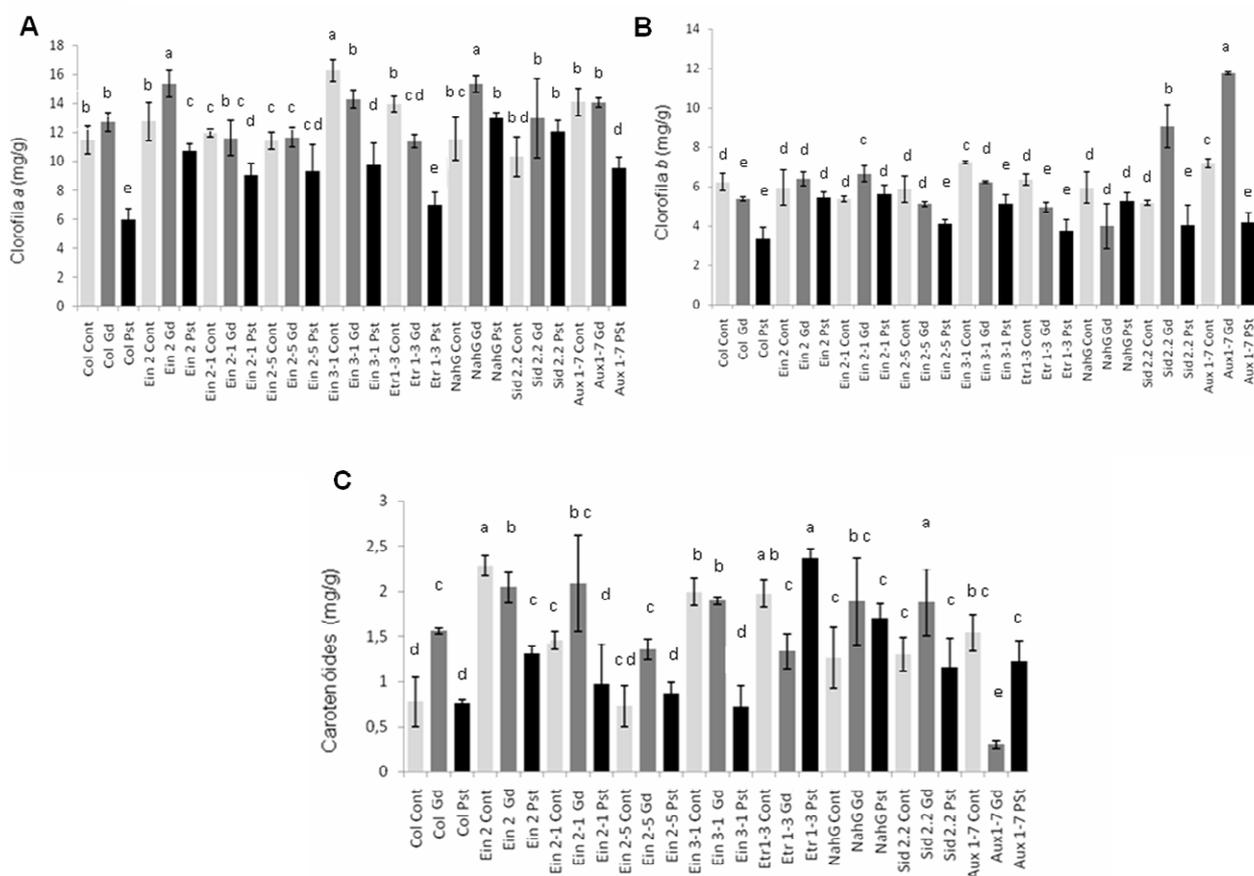


Figura 13 - Teores de pigmentos fotossintéticos em plantas de *A. thaliana* inoculadas e não-inoculadas com *P. syringae* DC3000 e *G. diazotrophicus*, após 4 dias. (A) Teores de clorofila *a*. (B) Teores de clorofila *b* e (C) Teores de carotenóides. (Cont- Controle/ Gd – *Gluconacetobacter diazotrophicus*/ Pst – *Pseudomonas syringae* DC3000). Colunas representam a média de cinco repetições e as barras o desvio-padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre teores de pigmentos (Teste *t* com 5% de probabilidade).

5.4.2. Quantificação dos teores de fenólicos vegetais

Como é possível observar nas Figuras 14 e 15, a resposta vegetal é diferenciada nos primeiros quatro dias da inoculação com *G. diazotrophicus* e após 10 dias. De acordo com a Figura 14, a presença de *G. diazotrophicus* promoveu aumento das taxas de antocianinas em Col-0, *ein 2*, *ein2-1* e *aux 1-7* e redução em *etr1-3*, após 4 dias. A concentração de flavonóis, em relação aos controles, foi reduzida em *ein2-5*, e foi superior em *ein2-1*, *ein3-1*, *nahG*, *sid 2-2* e

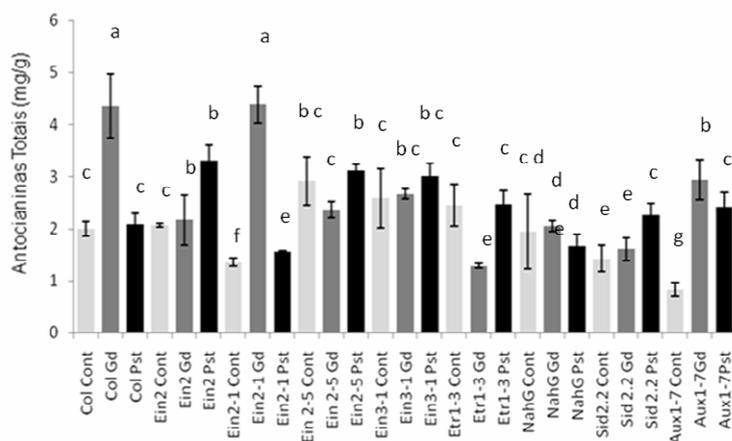
aux1-7, mostrando que a resposta à inoculação entre os mutantes é diferente. Em comparação à *G. diazotrophicus*, *P. syringae* provocou aumento dos teores de antocianinas em *ein 2*, *ein2-1*, *sid 2-2* e *aux 1-7*. Apresentou também redução dos níveis de flavonóis em *ein2-1*, e aumento em *ein3-1*, *sid 2-2* e *aux 1-7*. Entre todos os mutantes, o *aux1-7* foi o que apresentou respostas semelhantes às das inoculações em seus níveis de antocianinas e flavonóis, sugerindo que este pode ter apresentado maiores taxas de atividade antioxidante nos primeiros quatro dias.

Ao se analisar os dados, após 10 dias de inoculação, Figura 15, é possível observar que, nos mutantes de etileno, a inoculação de *G. diazotrophicus* não ocasiona grandes elevações nas taxas de antocianinas, apresentando aumento apenas no mutante *ein2-1* e redução em *ein 2-5* e *ein3-1*. Já os mutantes *sid 2-2* e *aux 1-7* apresentaram elevações nas suas taxas. Tais dados sugerem que a resposta tardia das antocianinas à inoculação talvez seja dependente da via de sinalização de etileno.

Resposta diferente foi observada ao se avaliar os níveis de flavonóis. Após 10 dias de inoculação, o ecótipo Col-0, *ein 2*, *ein2-5*, *ein3-1*, *etr1-3* apresentaram redução em suas taxas, indicando que nestes o nível de estresse vegetal, após 10 dias, possivelmente foi minimizado.

Os resultados obtidos sugerem que a síntese de flavonoides seja dependente da via sinalização de etileno, uma vez que a indução da biossíntese de antocianinas e flavonóis em resposta a *G. diazotrophicus* e a *P. syringae*, após 4 e 10 dias, foi mais evidente nos mutantes defectivos para ácido salicílico e auxina.

A



B

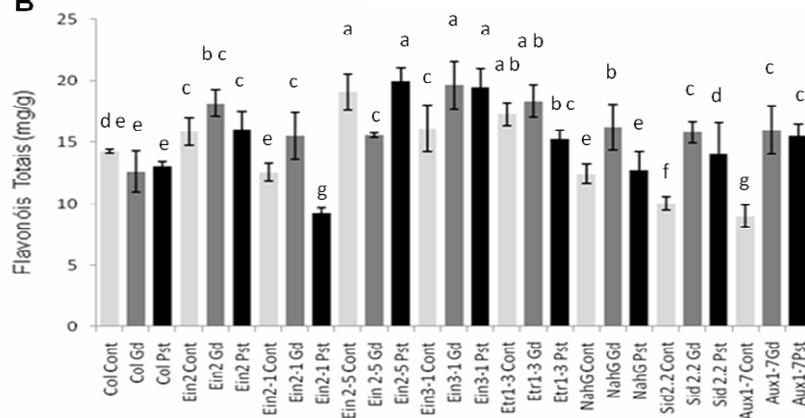


Figura 14 - Teores de fenólicos vegetais em plantas de *A. thaliana* inoculadas e não-inoculadas por *P. syringae* DC3000 e *G. diazotrophicus*, após 4 dias. (A) Teores de antocianinas. (B) Teores de flavonóis. Cont- Controle/ Gd – *Gluconacetobacter diazotrophicus*/ Pst – *Pseudomonas syringae* DC3000). Colunas representam a média de 5 repetições e as barras o desvio-padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre teores de pigmentos (Teste *t* com 5% de probabilidade).

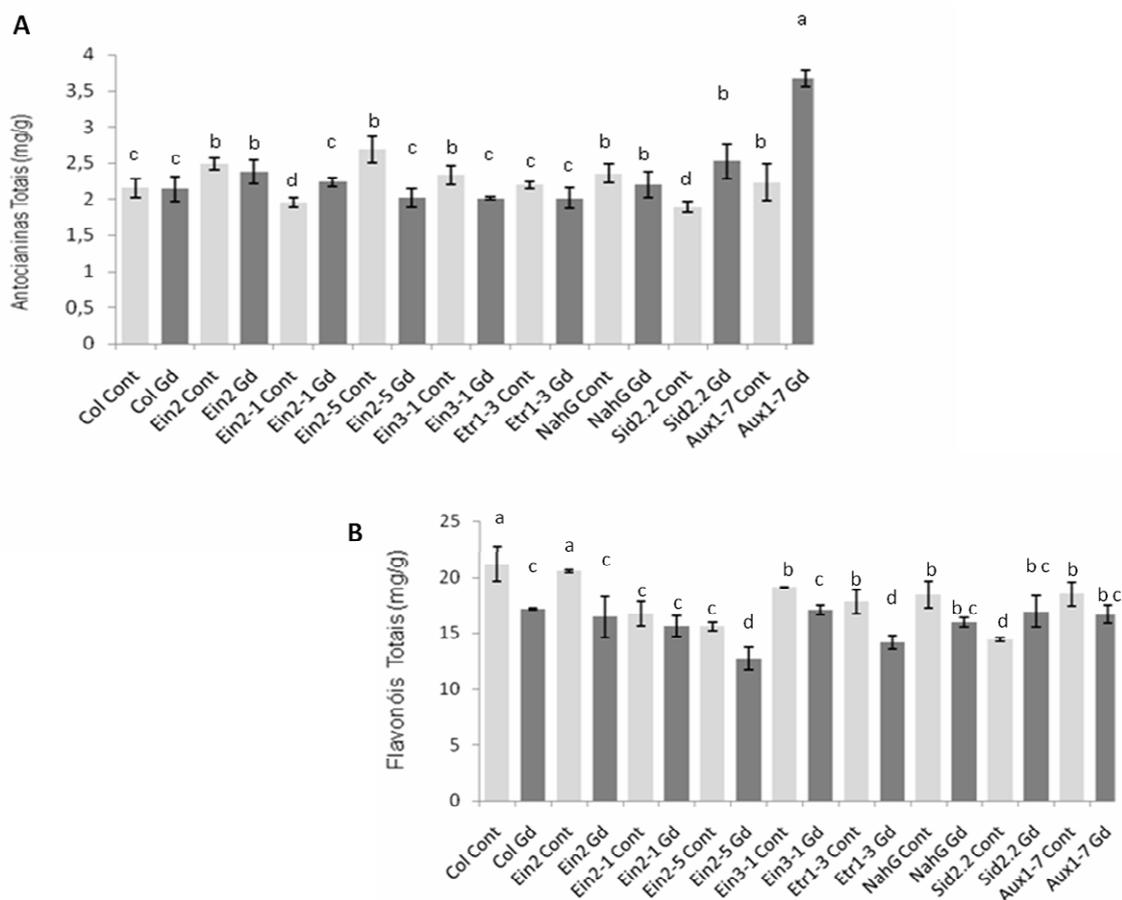


Figura 15 - Teores de fenólicos vegetais em plantas de *A. thaliana* inoculadas e não-inoculadas por *G. diazotrophicus*, após 10 dias. (A) Teores de antocianinas. (B) Teores de flavonóis. Cont- Controle/ Gd – *Gluconacetobacter diazotrophicus*). Colunas representam a média de cinco repetições e as barras o desvio-padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre teores de pigmentos (Teste *t* com 5% de probabilidade).

5.4.3. Análise do acúmulo de calose

As plantas empregam uma variedade de mecanismos de defesa para se prevenirem de doenças e de ataques de patógenos. Entre as respostas de defesa vegetal que ocorre de forma tardia em relação ao contato do patógeno com a planta hospedeira, é caracterizada pela fortificação das paredes celulares ou pela deposição de polímeros de glucano, como por exemplo, (1,3- β -glucano) calose (Abramovitch et al., 2006).

Como observado na Figura 16, a inoculação com *G. diazotrophicus*, provocou maior acúmulo de calose nas plantas mutantes de etileno, principalmente em *ein 2-1*. Nas plantas mutantes para ácido salicílico (transgênico *NahG* e *sid 2-2*) e para auxina, a deposição de calose foi semelhante à do controle. Tais dados sugerem que a resposta imune a *G. diazotrophicus*, associada à deposição de calose, é negativamente regulada pela via hormonal do etileno, mas talvez seja dependente de ácido salicílico e auxina.

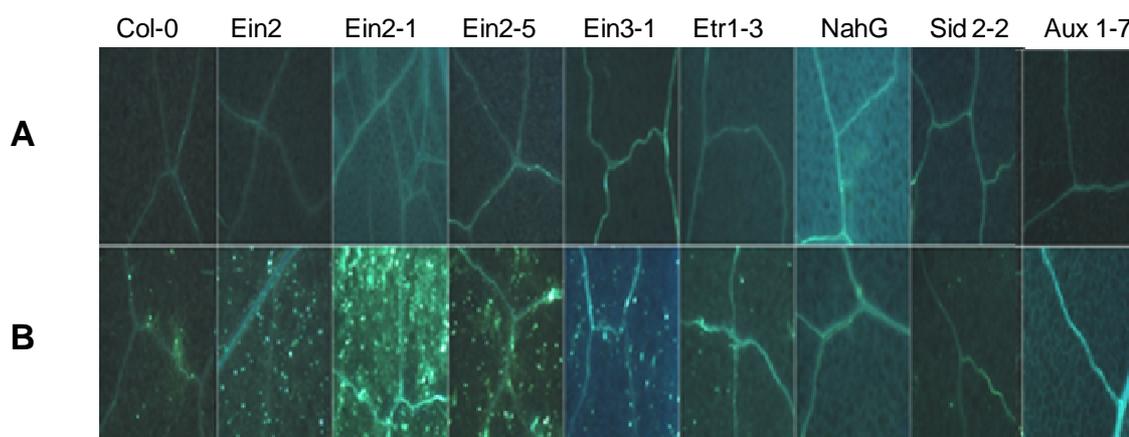


Figura 16 - Deposição de calose em folhas de *A. thaliana* inoculadas com *G. diazotrophicus* após 10 dias. (A) Controle. (B) Inoculadas com *G. diazotrophicus*.

5.4.4. Quantificação de morte celular

As plantas passam constantemente por diversas situações de estresses e conseguem modular suas respostas de defesa, para assim poder retomar ao metabolismo normal. Num evento de invasão de um patógeno, se a penetração ocorrer, o sistema de defesa é ativado e, entre outros, produz espécies reativas de oxigênio, espessamento de parede celular, síntese de metabólitos e uma resposta de hipersensibilidade seguida por morte celular programada. Juntos, esses sistemas, primeiramente, inibem e, depois, impedem o potencial colonizador (Boller e Felix, 2009).

De acordo com os dados observados na Figura 17, é possível constatar a indução de morte celular em todos os mutantes, exceto para o ecótipo Col-0 e para *ein2-5* e *etr1-3*, destacando-se os maiores níveis de morte celular observados nos mutantes de etileno *ein2* e *ein2-1*.

A partir dos resultados, é possível supor que, de forma geral, *G. diazotrophicus* induz, nos mutantes, uma resposta de hipersensibilidade que culmina na morte celular programada.

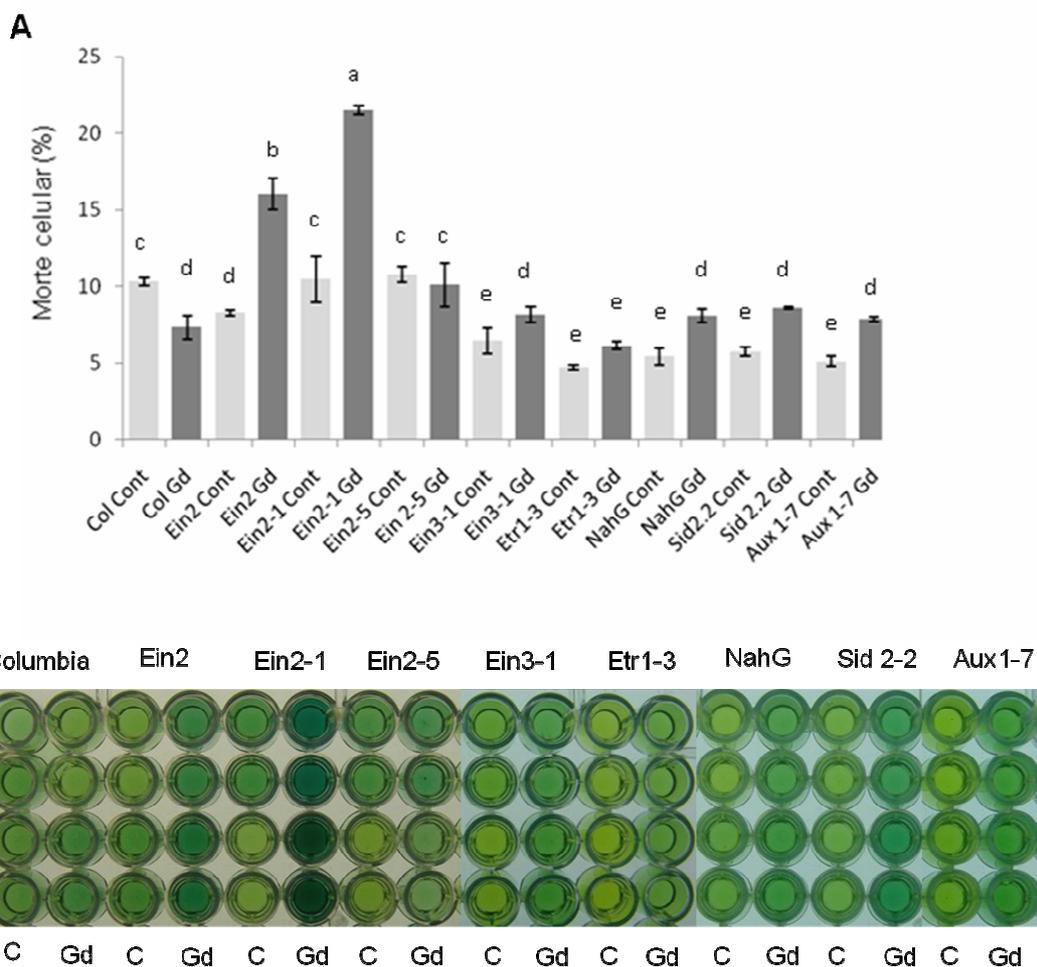


Figura 17 – Morte celular em plantas de *A. thaliana* inoculadas com *G. diazotrophicus* após 10 dias (A) Quantificação de morte celular em folhas de *A. thaliana* inoculadas *G. diazotrophicus* após 10 dias. Colunas representam a média de 6 repetições e as barras o desvio-padrão das médias. Cont- Controle/ Gd – *Gluconacetobacter diazotrophicus*). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si, comparação entre porcentagem de morte celular (Teste *t* com 5% de probabilidade). (B) Perfil colorimétrico de morte celular. C- Controle/ Gd- Inoculadas com *G. diazotrophicus*.

5.5. Análise dos níveis de colonização de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus*

Para uma análise da importância do hormônio etileno em relação à auxina e ácido salicílico para a colonização de *G. diazotrophicus*, foi realizada uma quantificação dos níveis de colonização desta bactéria em plantas mutantes para estes hormônios. Como padrão de comparação, em outras plantas destes mesmos materiais, foi quantificada a colonização de *P. syringae* (Figura 18).

Analisando-se a Figura 18 A e B, é possível observar que, após 4 dias, a resposta de colonização por *P. syringae* foi diferente entre os mutantes utilizados. Materiais defectivos, para a percepção do hormônio etileno, apresentaram uma taxa menor de colonização, enquanto os mutantes defectivos, para a produção ou percepção de auxina e ácido salicílico, permitiram maior multiplicação da bactéria. Entre os mutantes de etileno, podem-se destacar o *ein2-1*, *ein2-5* e *etr1-3* como os que apresentaram os menores níveis de colonização.

Quando a colonização desses mesmos mutantes por *G. diazotrophicus* foi analisada, Figura 18 B e C, foi possível constatar que, nos primeiros quatro dias, tanto os mutantes de etileno como os mutantes de ácido salicílico e auxina não apresentaram grandes acréscimos em suas colonizações, exceto para *sid 2-2*. Os mutantes de etileno apresentaram níveis menores de colonização se comparados aos do controle nos primeiros quatro dias. Após 10 dias, *G. diazotrophicus* consegue colonizar de uma forma mais eficiente os mutantes defectivos, para a produção ou percepção de ácido salicílico e auxina, podendo-se destacar, entre esses, o *aux 1-7* como apresentando o maior nível de colonização. Resposta distinta foi observada nos mutantes de etileno, que, mesmo após 10 dias, não apresentaram redução tão intensa de colonização por *G. diazotrophicus*, quanto à observada para *P. syringae*, destacando-se, entre esses, o *etr1-3* como o de menor taxa.

Os resultados indicam que o hormônio etileno é importante no processo de colonização e estabelecimento de *P. syringae*, levando-se em consideração que mutantes que não percebem este hormônio, diferentemente dos outros mutantes, apresentaram níveis menores de colonização por esta bactéria. Plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* não apresentaram, de forma geral, grandes alterações na sua colonização, se comparadas ao Col-0, em mutantes defectivos

para etileno, mostrando que este hormônio não é de fundamental importância para o processo de colonização de *G. diazotrophicus*.

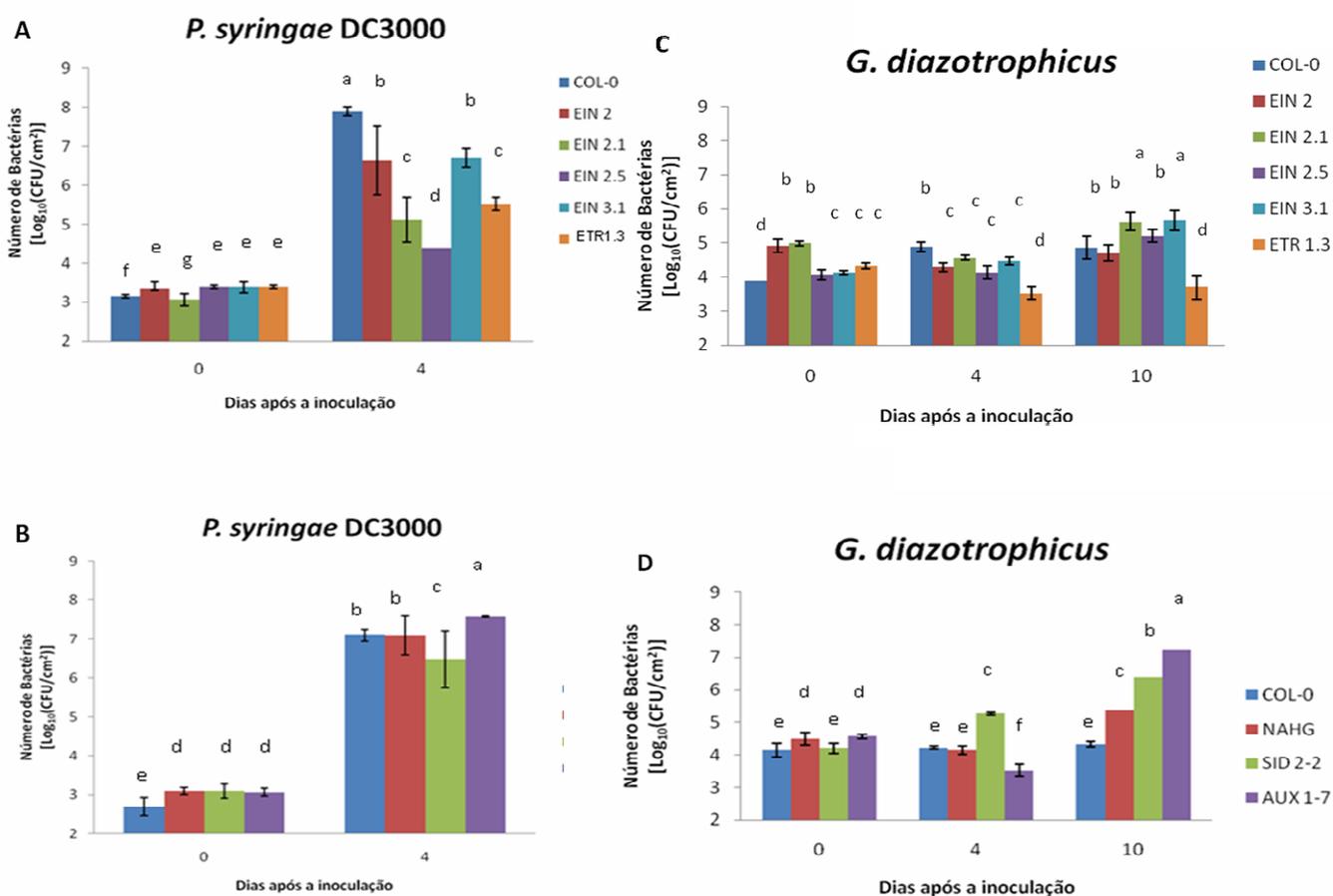


Figura 18 – Quantificação do nível de colonização de plantas de *A. thaliana* inoculadas com *G. diazotrophicus* e *P. syringae*. (A) Colonização dos mutantes de etileno por *P. syringae* após 4 dias. (B) Colonização dos mutantes de auxina e ácido salicílico por *P. syringae* após 4 dias. (C) Colonização dos mutantes de etileno por *G. diazotrophicus* após 4 e 10 dias. (D) Colonização dos mutantes de auxina e ácido salicílico após 4 e 10 dias. Colunas representam a média de 6 repetições e as barras o desvio-padrão das médias. Médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem estatisticamente entre si (Teste *t* com 5% de probabilidade).

6 - DISCUSSÃO

No processo de interação planta micro-organismo, o passo crucial, tanto para patogênese como para efeitos benéficos, é a colonização do tecido vegetal. Uma colonização bem sucedida envolve várias etapas: boa sobrevivência no interior dos tecidos, eficiente absorção de nutrientes em baixas concentrações e, finalmente, o enfraquecimento ou mesmo a destruição dos organismos competidores (Lee e Cooksey, 2000). As plantas, como os seres humanos e outros animais, desenvolveram uma sofisticada resposta de defesa contra os micro-organismos, baseada em uma combinação de respostas constitutiva e induzível, que pode ser localizada ou espalhada pelos órgãos e tecidos vegetais (Montesinos et al., 2002).

As vias de sinalização hormonal são um dos mecanismos que asseguram à planta o potencial de regulação eficaz e eficiente para se adaptarem às mudanças em seu ambiente e à invasão de organismos patogênicos (Reymond e Framer, 1998). Entretanto, ao mesmo tempo, estas vias permitem, aos patógenos e a outros micro-organismos, a manipulação da defesa para o seu benefício (de Torres-Zabala et al., 2007). Estudos recentes demonstraram que a estratégia-chave dos patógenos consiste em modificar os níveis hormonais vegetais para promover a patogenicidade e inibir o crescimento de outros micro-organismos competidores, utilizando-se, para isso, de proteínas efetoras. Outros micro-organismos se utilizam da sua capacidade de produzir hormônios como fator de

virulência para alterar a regulação hormonal vegetal e, dessa forma, colonizar os tecidos de forma mais eficiente (Chagué et al., 2006).

Em cana-de-açúcar, a presença da bactéria endofítica *Gluconacetobacter diazotrophicus* induz a expressão de genes relacionados às vias hormonais. Das análises descritas em literatura, genes relacionados à sinalização do etileno e da auxina foram diferencialmente expressos na presença de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. A auxina tem sido relatada como de fundamental importância na síntese de etileno, e estes dois hormônios estão envolvidos nas interações patogênicas (Arencibia et al., 2006).

Essa indução das vias de etileno, realizada por *Gluconacetobacter diazotrophicus*, pode ocasionar um aumento da síntese deste hormônio em cana-de-açúcar, conforme foi observado nas análises do presente trabalho (Figura 12). Entretanto, plantas submetidas ao estresse salino e à inoculação com posterior estresse apresentaram resposta similar à de indução da emissão de etileno. Tal fato é esperado, visto que plantas submetidas a estresses abióticos apresentam níveis maiores de emissão desse hormônio, como uma resposta de defesa (Pierik et al., 2006).

De acordo com Balaji et al. (2008), a presença do patógeno *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* induz, em tomate, o aumento na emissão de etileno. Os estudos revelaram que essa emissão seria importante durante os estágios iniciais de interação e desenvolvimento da doença por esta bactéria. Geraats et al. (2002) demonstraram que a falta de percepção do hormônio etileno, em algumas linhas transgênicas de tabaco, tornou impossibilitada a colonização de fungos não-patogênicos presentes no solo, os quais se utilizavam desse mecanismo hormonal para seu estabelecimento. Já Arencibia et al. (2006) revelaram que, em cana-de-açúcar, *Gluconacetobacter diazotrophicus* alterou os níveis de expressão de genes relacionados ao etileno quando em coinoculação com *Xanthomonas albilineans*. Essa alteração aumentaria a defesa vegetal contra patógenos como a *Xanthomonas*, diminuindo a competição entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* e bactérias patogênicas, aumentando sua chance de colonizar de forma mais eficiente plantas de cana-de-açúcar.

Levando-se em consideração que *Gluconacetobacter diazotrophicus* aumenta os níveis de expressão dos genes, relacionados com a via de sinalização de etileno, e que induz a emissão deste hormônio em plantas de

cana-de-açúcar, é possível supor que esta emissão ocorra por dois objetivos, ou meramente como uma resposta de defesa vegetal, visto que as plantas submetidas ao estresse salino apresentaram níveis semelhantes de emissão desse hormônio, ou como parte de mecanismo necessário para a eficiente colonização endofítica e não-patogênica de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Sendo o etileno um hormônio responsável pela clorose que ocorre em resposta a estresses bióticos e abióticos (Pierik et al., 2006), plantas insensíveis a esse hormônio apresentam tais sintomas de forma atenuada. A resistência sistêmica induzida por bactérias promotoras do crescimento vegetal, como *G. diazotrophicus*, por meio do aumento na expressão de genes relacionados ao etileno, não gera sintomas de doença na planta hospedeira (Arencibia et al., 2006). Recentemente, Boutrot et al. (2010) demonstraram que plantas mutantes de etileno se tornam mais tolerantes a patógenos, ou seja, não demonstram sintomas de clorose ou morte celular, apesar de elevada colonização bacteriana em seus tecidos.

A clorose, um dos sintomas típicos de doença, é caracterizada como a incapacidade de produzir clorofila pelo tecido vegetal (Taiz e Zeiger, 2004). A colonização por *P. syringae* DC3000 de *A. thaliana* causa sintomas típicos de extensiva clorose após 3 dias (Wang et al., 2005). Para confirmar a existência de degradação de pigmentos fotossintéticos, realizou-se a quantificação de clorofila *a*, clorofila *b* e de carotenoides. Nossos resultados (Figura 13) mostraram que a presença de *P. syringae* promoveu degradação de pigmentos fotossintéticos após 4 dias, na maioria dos mutantes. A inoculação de *G. diazotrophicus* não promoveu degradações significativas de seus pigmentos na maioria dos mutantes analisados.

De acordo com Todorova et al. (2002), plantas de *Arabidopsis thaliana* insensíveis ao hormônio etileno apresentam níveis semelhantes de clorofila *a* e *b* durante seu processo de senescência. Entretanto, os níveis de carotenoides foram totalmente distintos. A concentração de carotenoides, tanto na presença de *P. syringae* quanto na de *G. diazotrophicus*, apresentou níveis distintos, após 4 dias de inoculação, nos diferentes mutantes. Os resultados evidenciam que, mesmo nos mutantes que não apresentaram sintomas de doença, variações importantes nos níveis de antioxidantes foram observadas.

Outros pigmentos que também apresentam atividade antioxidante são as

antocianinas e flavonóis, pertencentes ao grupo dos flavonoides. Estes são facilmente e rapidamente produzidos quando as plantas são feridas ou durante o ataque de patógenos, condições estas que também alteram o transporte de auxina (Schwalm et al., 2003). Flavonoides também são relatados como tendo um papel chave durante a interação simbiótica de plantas e fungos micorrízicos, sendo importantes na sinalização entre eles (Shirley, 1996).

Após 4 dias de inoculação com *P. syringae* e *G. diazotrophicus* (Figura 14), a produção de antocianinas e flavonóis entre os mutantes foi distinta. Entretanto, foi possível destacar que a produção de antocianina e flavonóis no mutante *aux 1-7* apresentou acréscimos tanto na presença de *G. diazotrophicus*, quanto na de *P. syringae*.

Ao se analisarem os níveis de antocianinas, após 10 dias de inoculação com *G. diazotrophicus* (Figura 15 A), não se observa, para a maioria dos mutantes, grandes diferenças entre plantas-controle e as plantas inoculadas. Para o mutante defectivo para a percepção de auxina, entretanto, foi observado um aumento significativo nos níveis de antocianina em plantas inoculadas por *G. diazotrophicus*. Os dados de flavonóis também demonstraram, para a maioria dos mutantes, reduções de níveis em plantas inoculadas por *G. diazotrophicus*.

Tais respostas indicam que nos estádios iniciais (4 dias) de colonização, tanto por *P. syringae* quanto por *G. diazotrophicus*, que os sistemas de defesa vegetal respondem de forma mais intensa. Conforme descrito por Schwalm et al. (2003), os flavonoides exercem papel chave nesse processo, ao serem rapidamente produzidos em resposta ao ataque de patógenos e serem importantes durante a interação planta micro-organismo. Entretanto, cada um dos mutantes analisados responde de forma distinta à inoculação. Após os 10 dias de inoculação com *G. diazotrophicus*, o sistema de defesa baseado na produção de flavonoides é minimizado para a maioria dos mutantes avaliados.

Além da atividade antioxidante vegetal (Mittler, 2002), uma série de mecanismos de defesa vegetal tem sido relatada. Entre estes estão a secreção de compostos similares a ligninas, celulose, bem como a deposição de calose na parede celular, como mecanismo de restrição à infecção (Allison e Shalla, 1974). Em *Arabidopsis*, a deposição de calose é um dos mecanismos de defesa requeridos para a resistência a *Pseudomonas* (Kim et al., 2005).

De acordo com os resultados obtidos de deposição de calose (Figura 16),

plantas mutantes incapazes de desenvolver uma resposta imune sistêmica, baseada na produção e/ou acúmulo de ácido salicílico e de auxina, não apresentaram deposição de calose em suas paredes celulares quando inoculadas com *G. diazotrophicus*. Entretanto, em mutantes defectivos para a resposta ao etileno, destacando-se *ein2-1*, a deposição foi elevada. Resultados semelhantes foram obtidos por Chen et al. (2009) e Boutrot et al. (2010), que demonstraram que o mutante *ein 2-5* e o duplo mutante *ein3-1 eil1-1*, insensíveis ao etileno, apresentaram forte deposição de calose quando inoculados com flagelina (flg 22).

Com intuito de avaliar o desenvolvimento da reação de defesa nas plantas de *A. thaliana* após 10 dias de inoculação com *G. diazotrophicus*, a morte celular vegetal foi avaliada em todos os mutantes (Figura 17). A presença de *G. diazotrophicus* induziu a morte celular vegetal em todos os mutantes analisados, sendo mais evidente nos mutantes de etileno *ein2* e *ein2-1*.

A resposta de defesa, ocorrida após o reconhecimento de um patógeno, gera uma explosão oxidativa, com a produção de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio. As espécies reativas possuem diferentes funções na resposta de defesa vegetal. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser diretamente tóxico ao patógeno e está envolvido com o fortalecimento da parede celular, uma vez que o H_2O_2 é necessário para a biossíntese de lignina. Peróxido de hidrogênio atua também como mensageiro secundário, sendo responsável pela ativação da hidrolase do ácido benzoico, enzima responsável pela conversão deste em ácido salicílico. A ocorrência da resposta de defesa é dependente da cascata de sinalização derivada da explosão oxidativa, que, por sua vez, é um evento inicial na resposta da planta contra a invasão do patógeno (Resende et al., 2003).

Embora seja um evento inicial de resposta de defesa, muitos microorganismos, geralmente não patogênicos, disparam estes sinais depois de horas ou dias de seu contato inicial. A explosão oxidativa é necessária, mas não suficiente para disparar a morte celular (HR). Dados recentes indicam que o óxido nítrico coopera com as espécies reativas na ativação da resposta hipersensível (Resende et al., 2003).

A resposta disparada por *Gluconacetobacter diazotrophicus*, após 10 dias de inoculação, provavelmente, faz parte de uma resposta que culmina com a produção de espécies reativas de oxigênio, que, juntamente com o óxido nítrico,

são responsáveis pela morte celular programada. Tal fato se torna evidente ao se analisar que o mutante de etileno que apresentou a maior taxa de morte celular, *ein 2-1*, foi o que também disparou a maior deposição de calose. Sugere-se que a produção de peróxido de hidrogênio por este mutante tenha contribuído no fortalecimento da parede vegetal, com posterior deposição de calose.

Para uma análise comparativa das respostas de defesa vegetal com a capacidade de multiplicação, no interior dos tecidos, por *P. syringae* e *G. diazotrophicus*, foram realizados ensaios de colonização, após 4 e 10 dias (Figura 18). Os resultados mostraram que a colonização de *P. syringae* é afetada nos mutantes de etileno, destacando-se *ein2-1*, *ein2-5* e *etr1-3*. O mesmo não ocorre nos mutantes para ácido salicílico e auxina, que apresentaram colonização quase semelhante à do ecótipo selvagem Col-0. Tais resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Chen et al. (2009), que demonstraram a resistência dos mutantes *ein2-1* e *ein3-1* ao ataque patogênico de *P. syringae* e a susceptibilidade de *sid2-2* ao mesmo ataque.

Ao se analisar a colonização de *G. diazotrophicus*, constata-se que sua multiplicação não ocorre eficientemente nos quatro primeiros dias para todos os mutantes, exceto para *ein2-1*, *nahG* e *sid 2-2*. Entretanto, aos 10 dias, sua colonização se torna maior para os mutantes *nahG*, *sid 2-2* e *aux 1-7*, o que não é constatado nos mutantes de etileno. Estes apresentam uma colonização semelhante à do ecótipo selvagem Col-0, após 10 dias de inoculação, exceto para *etr1-3*, que, mesmo após 10 dias, não demonstra colonização eficiente, e para *ein3-1* e *ein2-1*, que apresentam uma colonização maior que a do Col-0, após 10 dias. Este último, embora tenha apresentado níveis maiores de deposição de calose e morte celular, não impediu o crescimento bacteriano de *G. diazotrophicus*.

Considerando-se que todos os mutantes defectivos para etileno, ácido salicílico e auxina são afetados em suas respostas de defesa vegetal, era de se esperar que todos apresentassem níveis de colonização elevados em relação aos controles. Respostas distintas foram obtidas, quando mutantes de etileno foram colonizados por estas bactérias. *P. syringae* não conseguiu uma colonização eficiente, após 4 dias, e a colonização por *G. diazotrophicus*, após 4 dias, atingiu níveis abaixo do controle e, após 10 dias, estes foram semelhantes ao de Col-0.

Chen et al. (2009) demonstraram que os genes *ein3* e *eil1* (afetados nos

mutantes *ein2-1* e *ein3-1*, respectivamente) são responsáveis por reprimir a síntese de ácido salicílico. Consequentemente, esses mutantes acumulam ácido salicílico e, dessa forma, exibem um aumento na resistência ao patógeno *P. syringae*. Segundo Boutrot et al. (2010), mutantes *ein 2-1* e *ein2-5*, quando inoculados com baixas concentrações de *P. syringae* (10^5 cfu/mL⁻¹), apresentaram níveis menores de colonização em comparação com os do ecótipo Col-0. Tais dados confirmam as presentes análises, nas quais mutantes de etileno foram menos colonizados por *P. syringae*, se comparados às plantas selvagens.

Nossas análises iniciais, nas quais *G. diazotrophicus* induziu a emissão de etileno em plantas de cana-de-açúcar, corroboram a suposição de que a inibição da defesa imune dependente de ácido salicílico, realizada pelo etileno, faça parte de um mecanismo necessário para a colonização endofítica desta bactéria.

Embora existam muitos estudos acerca da interação planta-micro-organismo, o envolvimento do balanço hormonal durante esses processos ainda é objeto de forte investigação. As alterações nos níveis de diferentes hormônios por plantas colonizadas por micro-organismos, a manipulação destas vias por patógenos, bem como a produção de fitormônios por diversos fungos e bactérias indicam uma clara importância destas vias durante a resposta imune vegetal. Os resultados obtidos no presente trabalho representam uma contribuição inicial para destacar a relevância destes mecanismos na interação endófito-planta. Futuros estudos dedicados a explorarem as semelhanças e as diferenças entre as vias hormonais, acionadas por patógenos e endófitos benéficos, poderão viabilizar abordagens que propiciem a elevação da eficiência de interações endofíticas.

7- CONCLUSÕES

- A colonização por *G. diazotrophicus* induz a produção de etileno em plantas de cana-de-açúcar;
- A inoculação por *G. diazotrophicus* ativou o sistema de defesa de plantas de *A. thaliana* relacionados ao acúmulo de flavonoides, à deposição de calose e à morte celular, sendo estes dois últimos mais evidentes em mutantes de etileno;
- A multiplicação e colonização de plantas de *A. thaliana* por *G. diazotrophicus* não se mostrou afetada em mutantes de etileno, apesar do acúmulo de ácido salicílico e do aumento da capacidade de defesa vegetal. *P.syringae* apresenta resposta distinta ao ter sua capacidade de colonização reduzida nos mutantes defectivos para etileno.
- As padronizações dos processos de inoculação de *G. diazotrophicus* em plantas “*in vitro*” de cana-de-açúcar, quantificação dos teores de fenólicos vegetais, morte celular e deposição de calose em plantas de *A. thaliana*, desenvolvidas neste trabalho, tornam-se ferramentas importantes em estudos futuros de interações planta-micro-organismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abeles, F.B., Morgan, P.W., Saltveit Jr, M.E. (1992) *Ethylene in plant biology*. 1.ed. New York: Academic Press, 130p.

Abramovitch, R.B., Anderson, J.C., Martin, N, G.B. (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7: 601–11.

Abreu, M.E. e Munné-Bosch, S. (2009) Salicylic acid deficiency in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 60: (4): 1261–1271.

Adams, M.D. et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287: (5461): 2185-2195.

Allison, A.V., Shalla, T.A. (1974) The ultrastructure of local lesions induced by potato virus X: a sequence of cytological events in the course of infection. *Phytopathology*, 64: 783-793.

Arabidopsis Home (2010) Disponível em <http://www.arabidopsis.org/info/aboutarabidopsis.jsp>. Acessado em: 05/11/2010.

Arabidopsis hormone e mutant database (2010) Disponível em: <http://ahd.cbi.pku.edu.cn/searchMutant.html>. Acessado em: 07/10/2010.

Arencibia, A.D., Vinagre, F., Estevez, Y., Bernal, A., Perez, J., Cavalcanti, J., Santana, I., Hemery, A.S. (2006) *Gluconacetobacter diazotrophicus* elicits a sugarcane response against a pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans*. *Plant Signaling and Behavior*, 5: 265-273.

Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsh, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., Manulis-Sasson, S., Rechavi, G., Barash, I., Sessa G. (2008) Tomato Transcriptional Changes in Response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Reveal a Role for Ethylene in Disease Development. *Plant Physiology*, 146: 1797–1809.

Baldani, J.I., Caruso, L., Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Döbereiner, J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29:(5-6):911-922.

Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Olivares, F.L., Döbereiner, J. (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*, 13:65-73.

Bari, R. e Jones, J.D.G. (2009) Role of plant hormones in plant defense responses. *Plant Molecular Biology*, 69: 473-488.

Bashan, Y. (1994) Symptom expression and ethylene production in leaf blight of cotton caused by *Alternaria macrospora* and *Alternaria alternata* alone and combined. *Canadian Journal of Botany*, 72:1574-1579.

Bastian, F., Cohem, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., Bottini, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A¹ and A³ by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically defined culture media. *Plant Growth Regulated*, 24:7-11.

Bellone, C.H., Debellone, S.D.V.C., Pedraza, R.O., Monzon, M.A. (1997) Cell colonization and infection threat formation in sugar cane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. *Functional Plant Biology*, 29:(5-6):965-967.

Benitez-Alonso, Y., Cilia, M., Romana, A. S., Thomas, C., Maule, A., Hearn, S., Jackson, D. (2009) Control of *Arabidopsis* meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 3615–3620.

Bertalan, M. et al. (2009) Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, 10:450.

Bevan, M. e Walsh, S. (2006) The *Arabidopsis* genome: a foundation for plant research. *Genome Research*, 12 (15): 1632-1642.

Boller, T. e Felix, G. (2009) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, 125: 749–760.

Boutrot, F., Segonzac, C., Chang, K.N., Qiao, H., Ecker, J.R., Zipfel, C., Rathjens, J.P. (2010) Direct transcriptional control of the *Arabidopsis* immune receptor FLS2 by the ethylene-dependent transcription factors EIN3 and EIL1. *PNAS*, 107: 32.

Cavalcante, J.J.V., Vargas, C., Nogueira, E.M., Vinagre, F., Schwarcz, K., Baldani, J.I., Ferreira, P.C.G., Hemery, A.S. (2007) Members of the ethylene signaling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. *Journal of Experimental Botany*, 58: 673–686.

Calvalcante, V.A. e Döbereiner, J. (1988) A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108:23-31.

Cavalini, F.C., Lima, L.B., Oviedo, V.R.S. (2004) Triagem de mutantes hormonais: citocina e etileno. Tese (Doutorado em Biologia) - Piracicaba – SP, Universidade de São Paulo – USP, 130p.

Cesnik, R. e Miocque, J. (2004) *Melhoramento da cana-de-açúcar*. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 307p.

Chagué, V., Danit, L., Siewers, V., Gronover, C.S., Tudzynski, P., Tudzynski, B., Sharon, A. (2006) Ethylene sensing and gene activation in *Botrytis cinerea*: a missing link in ethylene regulation of fungus–plant interactions? *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 19:33–42.

Chen H., Xue L., Chintamanani, S., Hugo Germain H., Lin, H., Cui H., Cai R., Zuo, J., Tang, X., Li, X., Guo H., Zhou, J. (2009) Ethylene insensitive3 and ethylene insensitive3-like repress salicylic acid induction deficient 2 expression to negatively regulate plant innate immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21:2527-2540.

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.

Cojho, E.H., Reis, V.M., Schenberg, A.C.G., Döbereiner, J. (1993) Interactions of *Acetobacter diazotrophics* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiology Letters*, 106(3):341-346.

Conab (2010) *Safra 2010/2011: Segundo Levantamento Agosto/2010*. Disponível em :<http://www.conab.gov.br/> . Acessado em: 07/10/2010.

Corné ,M.J., Pieterse, A., Van der Ent, S., Saskia C.M., Van Wees. (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5: 5.

Côte, F., Cheong, J.J., Alba, R., Hahn, M.G. (1995) Characterization of binding proteins that recognize oligoglucoside elicitors of phytoalexins in soybean. *Physiologia Plantarum*, 93:401-10.

D'Hont, A. e Glaszmann, J.C. (2001). Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. *International Society of Sugarcane Technologist*, 24: 556-559.

Davies, P.J. (1995) *The Plant hormones: their nature, occurrence and functions*. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. 2.ed. Alemanha: Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 70p.

de Torres-Zabala, M. et al. (2007) *Pseudomonas syringae* pv. tomato hijacks the *Arabidopsis* abscisic acid signalling pathway to cause disease. *EMBO Journal*, 26: 1434–1443.

De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R.M., Van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Mètraux, J.P., Van Loon, L.C., Dicke, M., Pieterse, C.M.J. (2005) Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 18: 923–937.

Delatorre, C.A. e da Silva, A.A. (2008) *Arabidopsis thaliana*: a small plant, a big role. *Revista de Ciências Agrárias*, 32: 25-28.

Dixon, R. e Kahn, D. (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2:621-31.

Dolan, L. e Roberts, K. (1995) The development of cell pattern cell types occupy the position over the ACCW. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 350:95–99.

Dong, X. (2004) *NPR1*, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 547–552.

Dong, Z., Mccully, M.E., Canny, M.J. (1997) Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. *Annual Botany London*, 80(2):147-158.

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(7):2804-2810.

FAO (2010). *Distribuição mundial de cana-de-açúcar*. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acessado em: 10/10/2010.

Fernandes, A.J. (1984). *Manual da cana-de-açúcar*, 1. ed. Piracicaba: Livroceles, 196 p.

Ferreira, F.P. (2002) *Promoção do crescimento de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de Saccharum) por bactérias diazotróficas endofíticas*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Campos dos Goytacazes- RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 68p.

Fuentes-Ramirez, L.E., Jimenez-Salgado, T., Abarca Ocampo, I.R., Caballero-Mellado, J. (1993) *Acetobacter diazotrophicus* in indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil*, 154:145-150.

Gazeta (2009). *Agronegócio: Energia sustentável movimentada canaviais*. Gazeta Mercantil. Disponível em: <http://www.gazetamercantil.com.br>. Acessado em: 16/01/09.

Geraats, B.P.J., Bakker, P.A.H.M., Van Loon, L.C. (2002) Ethylene insensitivity impairs resistance to soilborne pathogens in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant–Microbe Interaction*, 15: 1078–1085

Gohre, V. e Robatzek, S. (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual Review of Phytopathology*, 46: 189–215

Grant, M. e Lamb, C. (2006) Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 414-20.

Grierson, D. (1998) Manipulation of fruit ripening by genetic modification. *Transgenic Plant Research*, 109-124.

Hallmann, A., Quadt-Hallman, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43:895-914.

Harper, R.M., Stowe-Evans, E.L., Luesse, D.R., Muto, H., Tatematsu, K., Watahiki, M.K., Yamamoto, K., Liscum, E. (2000) The NPH4 locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *Plant Cell*, 12:757–770.

He, P., Shan, L., Lin, N., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nurberger, T., Sheen, J. (2006) Specific Bacterial Suppressors of MAMP Signaling Upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* Innate Immunity. *Cell*, 125: 563–575.

Hoagland, D.R. e Arnon, D.I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. *California Agriculture Station*, 347: 36-39.

Hollis, J.P. (1951) Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathology*, 41:350-367.

Hückelhoven, R. (2007) Cell wall associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review of Phytopathology*, 45: 101-127.

IBGE (2010) *Levantamento Sistemático da Produção Agrícola*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>. Acessado em 08/11/10.

Intorne, A.C. (2008). Identificação e caracterização de mutantes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* defectivos para a solubilização de zinco e fósforo. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Campos dos Goytacazes- RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF .

James, E.K., Reis, V.M., Olivares, F.L., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1994) Infection of sugar-cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *The Journal of Experimental Botany*, 45(275):757-766.

Kasan, K. e Manners, J.M. (2009) Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, 14(7): 373-382.

Kim, M.G., Cunha, L.D., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., Mackey, D. (2005) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell*, 121:749–759.

Knogge, W. (1996) Fungal infection of plants. *The Plant Cell*, 8: 1711-1722.

Lee, S.W. e Cooksey, D.A. (2000) Genes expressed in *Pseudomonas putida* during colonization of a plant-pathogenic fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2764-2772,

Lee, T.S.G. (1984) Micropropagação de cana-de-açúcar através de cultura de meristema apical. *Saccharum APC*, 7:36-39.

LeNoble, M.E., Spollen, W.G., Sharp, R.E. (2004) Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression. *Journal of Experimental Botany*, 55:237–245.

Lery, L.M.S., Coelho, A., Von kruger, W.M.A., Gonçalves, M.S.M., Santos, M.F., Valente, R.H., Santos, E.O., Rocha, S.L.G., Perales, J., Domont, G.B., Teixeira, K.R.S., Bisch, P.M. (2008) Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. *Proteomics*, 8:1631–1644.

Li, R., MacRae, I.C. (1991) Specific association of diazotrophic *Acetobacter* with sugarcane. *Soil Biology and Biochemistry*, 23:999-1002.

Lima, G.A. (1984) *Cultura da cana-de-açúcar*. 1. ed. Fortaleza: IOCE: 159p.

Magnani, G.S., Didonet, C.M., Cruz, L.M., Picheth, C.F., Pedrosa, F.O, Souza, E.M. (2010) Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. *Genetics and Molecular Research*, 9 (1): 250-258.

Meirelles, M.J. (2006) *Cana-de-açúcar (Saccharum híbridas)*. Disponível em <http://www.agrobyte.com.br> . Acessado em: 15/10/10.

Miller, C.O., Skoog, F., Von Saltza, M.H., Strong, F. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 77: 1392–1393.

Mirza, M.S., Latif, F., Bally, R., Ahmad, W., Haurat, J., Normand, P., Malik, K. A. (2001) Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant and Soil*, 237: 47-54.

Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 1(9):405-410.

Mithofer, A. (2002) Suppression of plant defence in *rhizobia-legume* symbiosis. *Trends in Plant Science*, 7:440 – 444.

Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., Francés, J., Alemany, J., Llorente I., Moragrega, C. (2002) Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *International Microbiology* , 5(4):169-175.

Mouradov, A., Cremer, F., Coupland, G. (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis of diversity. *Plant Cell* ,14: 111-130.

Murashige, T. e Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.

Muthukumarasamy, R., Govindarajan, M., Vadivelu, M., Revathi, G. (2006) N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. *Microbiological Research*, 161:238-245.

Muthukumarasamy, R., Cleenwerck, I., Revathi, G., Vadivelu, M., Jassens, D., Hoste, B., Kang U., Gum, P., Ki, D., Cho, Y.S., Tongmin, S., Caballero-Mellado, J. (2005) Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter* peroxydans with wetland rice. *Systematic Applied Microbiology*, 28:277-286.

Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Lakshminarasimhan, C. (1999) Diazotrophic associations in India and their role in cane cultivation. *Tropical Agriculture*, 76:171-178.

Nature (2000) *The multinational coordinated Arabidopsis thaliana functional genomics project*. Disponível em: <http://www.nsf.gov>. Acessado em: 10/11/2010.

Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lison, P., Nemri, A., Harberd, N.P., Jones, J.D. (2008) DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Current Biology*, 18: 650–655.

NCBI (2010) *Taxonomia de Arabidopsis thaliana*. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acessado em: 10/11/2010.

NCBI (2009) *Taxonomia da cana-de-açúcar*. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acessado em: 15/01/09.

Newman, D.K. e Banfield, J.F. (2002) Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. *Science*, 10(296):1071-1077.

Nogueira, E.M., Vinagre, F., Masuda, H.P., Vargas, C., de Paula, V.L.M., da Silva, F.R., dos Santos, R.V., Baldani, J.I., Ferreira, P.C.G., Hemerly, A.S. (2001) Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. *Genetics and Molecular Biology*, 24 (1-4): 199-206.

Nomura, K., Melotto, M., He, S.Y. (2005) Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 361-368.

Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., Reis, V.M., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum spp.* In root, stem and leaves predominantly of Graminae. *Biology and Fertility of Soils*, 21:197-200.

Pace, N.R. (1997) New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News*, 62:463-470.

Patten, C.L e Glick, B.R. (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:3795–3801.

Pierik, R., Tholen, D., Poorter, H., Visser, E.J.W., Voeselek, A.C.J. (2006) The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*, 11:4.

Pierik, R., Visser, E.J.W., de Kroon, H., Voeselek, A.C.J. (2003) Ethylene is required in tobacco to successfully compete with proximate neighbours. *Plant Cell Environment*, 26: 1229–1234.

Pilet, P.E. e Barlow, P.W. (1987) The role of abscisic acid in root growth and gravireaction: A critical review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 6:217-265.

Pinon, D., Casas, M., Blanch, M., Fontaniella, B.; Blanco, Y., Vicente, C., Solas, T., Legaz, M.E. (2002) *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane

endosymbiont, produces a bacteriocin against *Xanthomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. *Research in Microbiology*, 153:345–351.

Pitts, R.J., Cernac, A., Estelle, M. (1998) Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 16: 553–560.

Pleban, S., Ingel, F., Chet, I. (1995) Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 101: 665–672.

ProCana (2008). *A cana-de-açúcar, origem e influência*. Jornal Cana. Disponível em: <http://www.jornalcana.com.br>. Acessado em: 30/12/2008.

Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn (1996) *S.E. Biologia Vegetal*. 5ed. Rio de Janeiro: Ediora Guanabara Koogan, 728p.

Reis, V.M., Olivares, F.L., Döbereiner, J. (1994) Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its habitat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 10:101-104.

Resende, M.L.V., Salgado, S.M.L., Chaves, Z.M. (2003) Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, 28: 2.

Reymond, P. e Framer, E.E. (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion Plant Biology*, 1:404–411.

Rodrigues Neto, J., Malavolta Júnior, 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.

Rosenblueth, M. e Martinez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19:827-837.

Sánchez-Calderón, L., Lopez-Bucio, J., Chacón-López, A., Gutiérrez-Ortega, A., Hernández-Abreu, E., Herrera-Estrella, L. (2006) Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. *Plant Physiology*, 140 (3): 879-889.

Saravanan, V.S., Madhaiyan, M., Thangaraju, M. (2007) Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, 66: 1794–1798.

Shirley, B.W. (1996) Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends Plant Science*, 1:377–382.

Schwalm, K., Aloni, R., Langhans, M., Heller, W., Stich, S., Ullrich, C.I. (2003) Flavonoid-related regulation of auxin accumulation in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumors. *Planta*, 218: 163–178.

Smalle, J., Haegma, M., Kurepa, J., Montagu, M.V., Straeten, D.V.D. (1997) Ethylene can stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation in the light. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94: 2756–2761.

Soto, M.J., Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Mendoza, D., Sanjuán, J., Olivares, J. (2009) Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant–bacteria interactions. *Cellular Microbiology*, 11(3):381–388.

Sreenivasan, T.V., Ahloowalia, B.S., Heinz, D.J. (1987) Cytogenetics. *Sugarcane Improvement Through Breeding*, 211-253.

Stephan, M.P., Oliveira, M., Teixeira, K.R.S., Martínez-drets, G., Döbereiner, J. (1991) Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 77:67-72.

Strobel, G. e Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their

natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4):491-502.

Sturtz, A.V. (1995) The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil*, 175:257-263.

TAIR (2010) *The Arabidopsis Information Resource*. Disponível em: <http://www.arabidopsis.org>. Acessado em: 10/11/2010.

Taiz, L. e Zeiger, E. (2004). *Fisiologia Vegetal*. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed, 559p.

Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annual Review. Immunology*, 21:335–376.

Tejera, N.A., Ortega, E., González-López, J., Liuch, C. (2003) Effect of some abiotic factors on the biological activity of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5):28-35.

The C. elegans Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode C. Elegans: A platform for investigating biology. *Science*, 282 (5396): 2012-2046.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature*, 408 (8692): 796-815.

Todorova, D., Sergiev, I., Alexieva, V., Karanov, E. (2002) Rosette leaf senescence in wild type and ethylene insensitive mutant (eti 5) *arabidopsis thaliana* (L) Heynh during inflorescence and fruit development: I: changes in plastid pigments products of lipid and protein oxidation, and hydrogen peroxide levels. *Physiologie des plantes*. 55: 8.

Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44:135-62.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review Phytopathology*, 36:453-483.

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., Souza, G.M., da Silva, A.M., Ferro, M.I., Henrique-Silva, F., Giglioti, E.A., Lemos, M.V., Coutinho, L.L., Nobrega, M.P., Carrer, H., Franca, S.C., Bacci-Junior, M., Goldman, M.H., Gomes, S.L., Nunes, L.R., Camargo, L.E., Siqueira, W.J., Van Sluys, M.A., Thiemann, O.H., Kuramae, E.E., Santelli, R.V., Marino, C.L., Targon, M.L., Ferro, J.A., Silveira, H.C.; Marini, D.C., Lemos, E.G., Monteiro-Vitorello, C.B., Tambor, J.H., Carraro, D.M.; Roberto, P.G., Martins, V.G., Goldman, G.H., de Oliveira, R.C., Truffi, D., Colombo, C.A., Rossi, M., de Araujo, P.G., Sculaccio, S.A., Angella, A., Lima, M.M., de Rosa Junior, V.E., Siviero, F., Coscrato, V.E., Machado, M.A., Grivet, L., Di Mauro, S.M., Nobrega, F.G., Menck, C.F., Braga, M.D., Telles, G.P., Cara, F.A., Pedrosa, G., Meidanis, J., Arruda, P. (2003) Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Research*, 13: 2725-2735.

Visser, E.J.W., Cohen, J.D., Barendse, G.W.M., Blom, C.W.P.M., Voeselek, L.A.C.J. (1996) An ethylene-mediated increase in sensitivity to auxin induces adventitious root formation in flooded *Rumex palustris* Sm. *Plant Physiology*, 112:1687–1692.

Voeselek, L.A.C.J. e Van der Veen, R. (1994) The role of phytohormones in plant stress: too much or too little water. *Acta Botany Neerl*, 43:91–127.

Voeselek, L.A.C.J., Banga, M., Rijnders, J.H.G.M., Visser, E.J.W., Harren, F.J.M., Brailsford, R.W., Jackson, M.B., Blom, C.W.P.M. (1997) Laser-driven photoacoustic spectroscopy: what we can do with it in flooding research. *Annals of Botany*, 79: 57-65.

Wang, Y., Ohara, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S. (2005) Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 18: 385–396.

Weaver, R.J. (1972). *Plant growth substances in agriculture*. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 594p.

Weaver, R.J. (1976) *Reguladores Del crecimiento de las plantas n la Agricultura*. Mexico: Editorial Trillas, 622p.

Wellburn, A.R. (1994) The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144:307-313.

Winkel-Shirley, B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126: 485-493.

Xiong, L., Schumaker, K.S., Zhu, J.K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 14:165-183.

Yamada, Y., Hoshino, K., Ishkawa, T., (1997) The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61:1244–1251.

Yamaguchi, T. e Street, H.E. (1977) Stimulation of the growth of excised cultured roots of soybean by abscisic acid. *Annual of Botany*, 41(17):1129-1133.

Yang, S.F., Hoffman, N.E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35:155-189.

Yeh, C.C., Tsay, H.S., Yeh, J.H., Tsai, F.Y., Shih, C.Y., Kao, C.H. (1995) A

comparative study of the effects of methyl jasmonate and abscisic acid on some rice physiological process. *Journal of Plant Growth Regulation*, 14:23-28.

Yoshida, S., Feno, D.A., Cock, J.H., Gomes, K.A. (1972) *Laboratory manual for physiological studies of rice*. 3.ed. Phillippines: IRRI, 83p.

Zazimalova, E. e Napier, R.M. (2003) Points of regulation for auxin action. *Plant Cell Reports*, 21: 625-634.