

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

TAXONOMIA, ECOLOGIA E MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* sp. híbrido) POR BACTÉRIAS DIAZOTÓFICAS ENDOFÍTICAS DO GÊNERO *Herbaspirillum*.

FABIO LOPES OLIVARES

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO

1997

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

TAXONOMIA, ECOLOGIA E MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO E
COLONIZAÇÃO DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum* sp. híbrido)
POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS DO GÊNERO *Herbaspirillum*.

FABIO LOPES OLIVARES

ORIENTAÇÃO:

Dra. JOHANNA DÖBEREINER

Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do grau de
Philosophiae Doctor em Agronomia,
área de concentração em Ciência do Solo.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO
JUNHO DE 1997

TAXONOMIA, ECOLOGIA E MECANISMOS ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO E
COLONIZAÇÃO DE PLANTAS DE CANA DE AÇÚCAR (*Saccharum* sp. híbrido) POR
BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS DO GÊNERO *Herbaspirillum*.

AUTOR

FABIO LOPES OLIVARES

Aprovada em: 12/06/1997

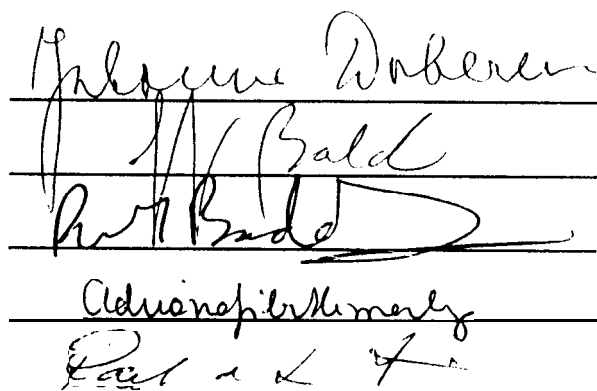
JOHANNA DÖBEREINER

JOSÉ IVO BALDANI

ROBERT MICHAEL BODDEY

ADRIANA SILVA HEMERLY

RAUL DE LUCENA DUARTE RIBEIRO



The image shows five handwritten signatures, each on a horizontal line. From top to bottom, the signatures are: Johanna Döbereiner, José Ivo Baldani, Robert Michael Boddey, Adriana Silva Hemerly, and Raul de Lucena Duarte Ribeiro. The signatures are written in dark ink and are somewhat stylized.

Dedico este trabalho

À Deus.

Aos meus pais, que talvez por serem tão diferentes um do outro, abrirão mão de suas concepções pessoais, misturaram suas percepções do mundo e nos educaram na direção mais provável do equilíbrio.

À minha companheira, Valéria, minha maior incentivadora.

À toda minha família, pelo incentivo constante e a convivência alegre.

À Dra Johanna Döbereiner que desde que cheguei na Embrapa, incentivou, ensinou, sugeriu, corrigiu, patrocinou e acreditou na minha capacidade de trabalhar em ciência.

À força espiritual de Pai Timbó, que me ilumina e ajuda a compreender as forças do universo.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Gramíneas do CNPAB, representado pelas minhas companheiras de trabalho Dra Verônica Massena Reis e Dra Vera Lúcia Divan Baldani e pôr meu camarada Geraldo Baeta da Cruz, “O homem de mil e uma utilidades.

Aos Doutores José Ivo Baldani, Robert Michael Boddey e Segundo Urquiaga pelos ensinamentos, apoio, incentivo, críticas, confiança e amizade.

Ao Dr Euan K. James, meu parceiro e um dos grandes impulsionadores da minha carreira científica.

Ao amigo e pesquisador José Antonio Ramos de Oliveira, sempre presente para acionar a trilogia “casa, comida e roupa lavada” nos momentos de aperto, estes não muito raros na vida de um bolsista.

Aos bolsistas da *Embrapa Agrobiologia*, responsáveis pelo estabelecimento de um dos ambientes de trabalho mais saudáveis do universo (talvez da galáxia!) e de onde tenho grandes amigos.

Aos pesquisadores e funcionários da *Embrapa Agrobiologia* pela troca, apoio e convivência.

A Embrapa Agrobiologia e a UFRRJ pela oportunidade de realizar meu trabalho.

Ao CNPq, órgão financiador das bolsas de aperfeiçoamento, mestrado, doutorado e agora recém doutor.

A todos que traídos pela minha memória não foram mencionados, mas colaboraram para realização deste trabalho.

Biografia do autor

Nascido à 31 de dezembro de 1967 no bairro da Gávea, cidade do Rio de Janeiro, RJ, filho de Agostinho Olivares Jr. e Cidnéa Lopes Olivares, diplomou-se em Engenharia Agrônômica pela Universidade Federal de Viçosa (Viçosa-MG) em Março de 1990. No mesmo mês, iniciou a atividade de bolsista de aperfeiçoamento científico (bolsa concedida pelo CNPq) na *Embrapa Agrobiologia* sob orientação da Dra. Johanna Döbereiner. Em março de 1991 iniciou o curso de Mestrado em Ciência do Solo pela UFRRJ, desenvolvendo seu projeto de pesquisa na Embrapa Agrobiologia. No dia 25 de novembro de 1993, através de exame de pré-qualificação, transformou seu mestrado em doutorado e desde então vem trabalhando no estudo da associação entre plantas da família das gramíneas e bactérias fixadoras de nitrogênio, sempre sob orientação da Dra. Johanna Döbereiner.

SUMÁRIO

	página
RESUMO GERAL.....	xx
GENERAL ABSTRACT	xxiii
INTRODUÇÃO GERAL	01
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10
 CAPÍTULO 1. Estudos comparativos entre <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> para fins taxonômicos.	
Resumo	16
Abstract	18
Revisão de Bibliográfica	20
• Métodos utilizados na definição do posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas	20
• A taxonomia do gênero <i>Herbaspirillum</i>	28
Objetivos	30
Material e Métodos	31
Resultados e Discussão	39
• Testes morfológicos, fisiológicos e bioquímicos	39
• Testes moleculares	53
• Testes imunológicos	57
Conclusões	60
Referências Bibliográficas	62

CAPÍTULO 2. Aspectos ecológicos: sobrevivência, crescimento, disseminação e distribuição de *Herbaspirillum* spp. no sistema solo-planta.

Resumo	72
Abstract	74
Revisão de Bibliográfica	76
. Evolução do conceito de microrganismos endofíticos	77
• Ocorrência de bactérias endofíticas	78
. Bactérias endofíticas: perspectivas de uso na agricultura	80
Objetivos	88
Material e Métodos	89
Resultados e Discussão	96
• Ocorrência de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i> no sistema solo-planta	96
• Sobrevivência e crescimento de <i>Herbaspirillum</i> no solo, solo da rizosfera e raízes da planta hospedeira	104
• Sobrevivência e crescimento de <i>Herbaspirillum</i> no interior de plântulas de cana-de-açúcar e resposta a inoculação	114
<i>Herbaspirillum</i> spp. é uma bactéria endofítica?	125
Conclusões	131
Referências Bibliográficas	133

CAPÍTULO 3. Vias de infecção e colonização de raízes de plantas de cana-de-açúcar por bactérias do gênero *Herbaspirillum*.

Resumo	148
Abstract	150
Revisão de Bibliográfica	152

▪ Adesão de bactérias à superfície das plantas	154
• 1.1. Adesão de <i>Rhizobium</i> à superfície dos pêlos radiculares	156
• 1.2. Adesão de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> a dicotiledôneas	157
• 1.3. Adesão de bactérias fixadoras de nitrogênio e rizo- bactérias promotoras de crescimento a superfície radicular	157
• 2. Vias de infecção de plantas por bactérias	160
• 2.1. Penetração através de aberturas naturais	160
• 2.1.1. Estômatos	160
• 2.1.2. Hidatódios	161
• 2.1.3. Nectários	161
• 2.1.4. Lenticelas	162
• 2.2. Penetração através de injúrias e feridas	162
• 2.2.1. Tricomas quebrados	162
• 2.2.2. Emergência de raízes laterais	163
• 2.2.3. Feridas	163
• 3. Estabelecimento de bactérias no interior da planta	164
• 3.1. Bactérias fitopatogênicas	164
• 3.2. Bactérias endofíticas	165
• 3.2.1. <i>Azospirillum</i> spp	166
• 3.2.2. <i>Azoarcus</i> sp.	167
• 3.2.3. <i>Acetobacter diazotrophicus</i>	168
• 3.2.4. <i>Herbaspirillum</i> spp.	169
• 3.2.5. <i>Burkholderia</i> sp.	170
• 3.2.6. Outras bactérias diazotróficas	170
Objetivos	172
Material e Métodos	173
Resultados e Discussão	186
• Caracterização dos anticorpos policlonais purificados	186

• Infecção e colonização de raízes de cana-de-açúcar por estirpes de <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i> : sistema “ <i>in vitro</i> ”.	195
• Meio de crescimento e contagem das bactérias na planta	196
• Estudo ao microscópio ótico e eletrônico das vias de infecção e modo de colonização das raízes de cana-de-açúcar	196
• Estudos de adesão radicular	196
• Infecção e colonização das raízes	203
Conclusões	221
Referências Bibliográficas	223

CAPÍTULO 4. Microscopia ótica e eletrônica da interação entre estirpes de *Herbaspirillum* spp. e genótipos de cana-de-açúcar e sorgo com diferentes graus de susceptibilidade a doença estria mosqueada.

Resumo	241
Abstract	243
Revisão de Bibliográfica	245
■ Mecanismos de resposta da planta ao ataque de bactérias fitopatogênicas	247
• 1.1. Reconhecimento de bactérias fitopatogênicas	248
• 1.2. Resposta hipersensível (RH)	248
• 1.3. Barreiras bioquímicas como mecanismo de resistência a fitopatógenos	249
• 1.3.1. Compostos pré-formados	250
• 1.3.2. Fitoalexinas	250
• 1.3.3. Lectinas	251
• 1.3.4. Acumulação de ácido salicílico	251
• 1.3.5. Síntese de proteínas PR “pathogenesis-related proteins”	252

• 1.3.6. Produção de radicais livres (estresse oxidativo)	254
1.4. Barreiras físicas como mecanismo de resistência a fitopatógenos.....	255
• 1.4.1. Síntese de géis e gomas em resposta a infecção vascular.....	255
• 1.4.2. Deposição de parede celular (cordões de infecção)	256
• 1.4.3. Papilas, lignificação e calose	256
• 1.4.4. Características anatômicas do vegetal	257
2. Estratégias de ataque desenvolvidas por fitopatógenos	257
• 2.1. Síntese de exopolissacarídeos (EPS)	258
• 2.2. Síntese de toxinas	259
• 2.3. Enzimas de degradação de parede celular	259
• 2.4. Produção de hormônios vegetais	260
• 3. Estria mosqueada da cana-de-açúcar	261
• 3.1. Histórico	261
• 3.2. Sintomatologia	261
• 3.3. Classificação e ocorrência do agente causal da estria mosqueada da cana-de-açúcar	262
Objetivos	263
Material e Métodos	264
Resultados e Discussão	269
• Reisolamento das bactérias e expressão dos sintomas da doença.....	269
• 1.1. Estria mosqueada da cana-de-açúcar	269
• 1.2. Estria vermelha em sorgo	274
• 2. Localização da bactéria e resposta de folhas de cana-de-açúcar e sorgo a infecção por estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	278
• 3. Localização da bactéria e resposta de folhas de cana-de-açúcar e sorgo a infecção por estirpes de <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	286
• 3.1. Colonização dos vasos do xilema de sorgo	286
• 3.2. Colonização dos vasos do xilema de cana-de-açúcar.....	290

• 3.3. Colonização do mesófilo foliar	297
• 4. Imunomarcacão comparativa nas variedades com diferentes graus de susceptibilidade, o papel do EPS	307
• 5. Imunomarcacão com ouro para a nitrogenase	311
Conclusões	314
Referências Bibliográficas	316

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	pagina
Tabela 1: Origem e designação das estirpes de <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i> utilizadas nos testes comparativos.....	32
Tabela 2: Testes comparativos envolvendo <i>H. seropedicae</i> (267, Z78 e HRC54) e <i>H. rubrisubalbicans</i> (M4, 175 e HCC103).....	44
Tabela 3: Crescimento dependente de N ₂ e atividade da nitrogenase de <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i> avaliado pela atividade de redução de acetileno (ARA) em meio com levedura ou isento de nitrogênio.....	45
Tabela 4: Efeito da sacarose e temperatura sobre a atividade da nitrogenase de <i>H. seropedicae</i> Z67 e <i>H. rubrisubalbicans</i> M4 avaliado pela ARA com 24 e 48 horas de crescimento.....	46
Tabela 5: Incorporação de ¹⁵ N ₂ por estirpes de <i>H. rubrisubalbicans</i> e <i>H. seropedicae</i> em meio JNFb semi-sólido.....	47
Tabela 6: Avaliação qualitativa da expressão dos sintomas da doença estria mosqueada em cana-de-açúcar, estria vermelha em sorgo e milho e estrias brancas em capim elefante aos 7 dias após a inoculação.....	49
Tabela 7: Avaliação do crescimento de quatro estirpes padrão de <i>Herbaspirillum</i> spp. sob diferentes fontes de carbono, em meio semi-sólido com ou sem nitrogênio.....	50
Tabela 8: Avaliação do crescimento de estirpes de <i>Herbaspirillum</i> spp. em 4 fontes de carbono selecionadas previamente como contrastantes.....	53
Tabela 9: Uso das fontes de carbono meso-eritritol e N-acetilglucosamina e hibridização com as sondas de oligonucleotídeos específicas para <i>H. seropedicae</i> (HS) e <i>H. rubrisubalbicans</i> (HR) por estirpes de <i>Herbaspirillum</i>	54
Tabela 10: Uso dos anticorpos policlonais produzidos contra <i>H. seropedicae</i> HRC54 e <i>H. rubrisubalbicans</i> HCC1 03.....	58

CAPÍTULO 2

Página

Tabela 1: Histórico das áreas destinadas a coleta de amostra de planta, visando o isolamento de <i>Herbaspirillum</i> spp.....	90
Tabela 2: Histórico dos solos utilizados no ensaio de sobrevivência, solo sob cultivo contínuo com cana (Solo Cana), e solo podzólico vermelho amarelo (Solo PVd).....	92
Tabela 3: Análise química dos solos utilizados no ensaio de sobrevivência.....	92
Tabela 4: Isolamento e diluição máxima isolada para <i>Herbaspirillum</i> em raízes e parte aérea de diversas plantas invasoras presentes em duas áreas cultivadas com gramíneas.....	97
Tabela 5: Ocorrência de <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i> em diferentes espécies de 8 famílias de plantas.....	102
Tabela 6: Identificação de diferentes isolados de <i>Herbaspirillum</i> ao nível de espécie, através do uso de meso-eritritol e N-acetil-glucosamina como fontes de carbono em meio JNFb semi-sólido.....	103
Tabela 7: Flutuação da população diazotrófica natural nos solos, PVd e Cana não inoculados (testemunha não inoculada) e mantidos nas mesmas condições de umidade e temperatura dos solos inoculados.....	106
Tabela 8: Peso de matéria fresca de raízes (PFr) e da parte aérea de (PFpa) de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar var. CB 45-3 inoculadas <i>H. seropedicae</i> (267 e HRC54), <i>H. rubrisubalbicans</i> (M4 e HCC103), uma estirpe não diazotrófica de <i>H. seropedicae</i> (M2), 12 d.a.i.....	119
Tabela 9: Peso de matéria fresca de raízes (PFr) e da parte aérea de (PFpa) de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar var. CB 45-3 inoculadas com estirpes de <i>H. seropedicae</i> (267 e HRC54), <i>H. rubrisubalbicans</i> (M4 e HCC103), uma estirpe não diazotrófica de <i>H. seropedicae</i> (M2), 24 d.a.i.....	120
Tabela 10: Peso de matéria fresca de raízes (PFr) e da parte aérea de (PFpa) de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar var. CB 45-3 inoculadas com estirpes de <i>H.</i>	

<i>seropedicae</i> (267 e HRC54), <i>H. rubrisubalbicans</i> (M4 e HCC103), uma estirpe não diazotrófica de <i>H. seropedicae</i> (M2), 64 dias após a inoculação.....	120
--	-----

Tabela 11: Comparações entre a média de todos os tratamentos inoculados com <i>Herbaspirillum</i> spp. (Herba fix ⁺ , estirpes diazotróficas), a média do tratamento inoculado com a estirpe de <i>Herbaspirillum</i> M2 (Herba fix ⁻) e o controle não inoculado (CNI) pelo teste t de student para $\alpha = 5\%$	124
---	-----

Tabela 12: Diferenças ecológicas e anato-fisiológicas na interação entre bactérias diazotróficas endofíticas, endosimbiontes e de rizosfera e plantas superiores.....	130
--	-----

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Reatividade cruzada dos anticorpos policlonais contra <i>H. seropedicae</i> HRC54 e Z67 e <i>H. rubrisubalbicans</i> HCC103, testados contra 40 estirpes de 13 gêneros diferentes.....	192
---	-----

Tabela 2: Composição do meio MS 1/10 em termos de macronutrientes.....	196
---	-----

Tabela 3: Comparação entre <i>Herbaspirillum seropedicae</i> , <i>H. rubrisubalbicans</i> e <i>Acetobacter diazotrophicus</i> quanto a adesão, vias de infecção e colonização endofítica de plantas de cana-de-açúcar.....	220
---	-----

CAPÍTULO 4

Tabela 1: Designação e origem das estirpes de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i> utilizadas no ensaio de fitopatogenicidade.....	265
---	-----

Tabela 2: Reisolamento de <i>Herbaspirillum</i> spp. de amostras de folhas próximas ao ponto de inoculação em meio JNFb semi-sólido aos 7 e 14 d.a.i. para sorgo e 7 e 20 d.a.i. para cana-de-açúcar.....	270
--	-----

Tabela 3: Avaliação dos sintomas da doença estria mosqueada/estria vermelha em plantas de cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de <i>Saccharum</i>) aos 20 dias após a	
---	--

inoculação e sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>) aos 14 dias após inoculação.....	271
Tabela 4: Efeito da infecção por <i>H. rubrisubalbicans</i> (M4) no número de cloroplastos presentes na bainha vascular de folhas de cana-de-açúcar das variedades B-4362 e SP 70-1143.....	309
Tabela 5: Número de partículas de ouro ligadas a bactéria <i>H. rubrisubalbicans</i> (M4) após imunomarcagem, colonizando os espaços intercelulares das células do mesófilo foliar de cana-de-açúcar das variedades B-4362 e SP 70-1143.....	309

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Dendrograma baseado nos valores de Tm(e) mostrando a posição do gênero <i>Herbaspirillum</i> dentro da rRNA III.....	40
Figura 2: Resultados da hibridização DNA:DNA entre estirpes de <i>Herbaspirillum</i> spp.....	41
Figura 3: Dendrograma derivado da análise do coeficiente de similaridade obtido pela comparação do resultado de 103 testes auxanográficos para estirpes de <i>Herbaspirillum</i>	42
Figura 4 A-F: Fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão (FMET) de diferentes estirpes de <i>Herbaspirillum</i> spp. após contrastação com acetato de uranila para visualização de flagelos.....	51
Figura 5: Fotografia de gel de agarose corado em brometo de etídio, mostrando o padrão de amplificação de bandas gerado por rep-PCR de diferentes estirpes de <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i>	56

CAPÍTULO 2

Figura 1: Sobrevivência de <i>H. seropedicae</i> Z67, <i>H. rubrisubalbicans</i> M4 e <i>Azospirillum</i> brasilense Sp 109 em dois tipos de

spp. a superfície das raízes de cana-de-açúcar var. SP 70-1143, 1 d.a.i., com as bactérias aderidas em monocamada, por meio de ataque apolar.....	200
Figs. 11 A-F: Fotomicrografias de raízes de cana-de-açúcar var. SP 70-1143 mostrando a zona de emergência de raízes laterais. Sítio de infecção nas raízes para <i>H. seropedicae</i> e <i>H. rubrisubalbicans</i>	204
Figs. 12A-D: FMO mostrando <i>Herbaspirillum</i> spp. aos 2 d.a.i. iniciando o processo de multiplicação nas junções radiculares. As bactérias foram imuno-marcadas com ouro e identificadas por deposição com prata coloidal (figs. 12 B e C).....	206
Figs. 13A-F: Fotomicrografias mostrando <i>H. seropedicae</i> HRC54 colonizando os espaços intercelulares e o interior das células do parênquima cortical de raízes de cana-de-açúcar var. SP 70-1143 aos 4 d.a.i.....	208
Figs. 14A-D: Fotomicrografias mostrando a colonização intracelular das células do parênquima cortical e dos vasos do xilema de raízes de cana-de-açúcar var. SP 70-1143 por <i>H. seropedicae</i> estirpe Z67 aos 7d.a.i.....	211
Figs. 15A-C: FMO de seções transversais de raízes de cana-de-açúcar var. SP 70-1143 aos 7 d.a.i. com <i>H. seropedicae</i> estirpe HRC54, mostrando as bactérias colonizando a região do tecido vascular.....	214
Figs. 16A-F: Fotomicrografias de seções de colmos e folhas de cana-de-açúcar var. SP 70-1143 aos 7 d.a.i. com <i>Herbaspirillum</i> spp., mostrando a colonização de células do parênquima ao feixe vascular, vasos do xilema, espaços intercelulares das células do mesófilo e abertura estomática.....	216
 CAPÍTULO 4	
Figs 1A-D: Fotografia de folhas de cana-de-açúcar var. B-4362, inoculadas com <i>H. rubrisubalbicans</i> , mostrando os sintomas típicos da doença estria mosqueada (figs 1A e 1 B) e FMO mostrando detalhes da colonização do tecido foliar pela bactéria durante o desenvolvimento da enfermidade (figs 1 C e D).....	272
Figs. 2 A-D: Fotografia de folhas de sorgo var. BR303 inoculadas com	

<i>H. rubrisubalbicans</i> , mostrando os sintomas de estria vermelha (figs 2A e 2C) comparada ao controle (fig 2B), e FMO de seção transversal do limbo mostrando o padrão de colonização dos vasos do xilema.....	275
Figs. 3A-E: Fotomicrografia da superfície do limbo foliar de cana-de-açúcar var. SP 70-1143 e seções longitudinais de folhas mostrando a reação hipersensível após a inoculação com <i>H. seropedicae</i> estirpe 267.....	279
Figs. 4A-D: FMO de seção transversal do limbo foliar de sorgo 5 dias após a inoculação com <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> . Seções imunomarcadas com ouro para identificação da bactéria e da enzima nitrogenase.....	282
Figs. 5A-D: FMET mostrando <i>Herbaspirillum</i> spp. colonizando os vasos do xilema de folhas de sorgo, 5 d.a.i.....	284
Figs. 6A-D: Fotomicrografias de seções de folhas de sorgo var. BR 303 tomadas da região de interface entre a presença e ausência de estria vermelha aos 14 d.a.i. com <i>H. rubrisubalbicans</i>	288
Figs. 7A-D: Fotomicrografia de seções longitudinais da região do limbo foliar de sorgo var BR 303 mostrando que o xilema, densamente colonizado por <i>H. rubrisubalbicans</i> aos 14 d.a.i.....	291
Figs. 8A-D: FMO de seção do feixe vascular de folhas de cana-de-açúcar var. B-4362 (figs 8A e 8B) e var. SP 70-1143 (figs 8C e 8D) aos 7 d.a.i. com <i>H. rubrisubalbicans</i>	294.
Figs. 9A-F: FMO de seções do mesófilo foliar de cana-de-açúcar var. B-4362 aos 20 d.a.i. com <i>H. rubrisubalbicans</i> colonizando a câmara sub-estomática e os meatos das células do mesófilo.....	299
Figs. 10A-F: FMET de <i>H. rubrisubalbicans</i> nos espaços intercelulares das células mesófilo foliar de cana-de-açúcar var. B-4362 em diferentes estágios da doença estria mosqueada.....	302
Figs. 11A-F: FMO de seção transversal de folha de cana-de-açúcar cv. SP 70-1143 aos 20 d.a.i. com <i>H. rubrisubalbicans</i> infectando a câmara sub-estomática, mostrando a eventos tardios de defesa da planta a invasão da bactéria.....	305

RESUMO GERAL

O gênero *Herbaspirillum* foi descrito como um grupo de bactérias diazotróficas associado às raízes de gramíneas, possuindo uma única espécie, *Herbaspirillum seropedicae*. Através da hibridização de RNA e DNA, foi proposta a reclassificação de "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, agente causal da estria mosqueada da cana-de-açúcar, como *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Na primeira parte deste trabalho foram conduzidos testes comparativos entre *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae*. Dentre as características testadas, as espécies diferenciaram-se entre si pelo uso das fontes de carbono meso-eritritol e N-acetilglucosamina, quanto a temperatura ótima de crescimento, padrão de flagelos e quanto a indução de estrias mosqueadas em cana-de-açúcar var.B-4362. Sondas de oligonucleotídeos espécie-específicas demonstraram uma correspondência total com os resultados dos testes de uso do meso-eritritol e N-acetilglucosamina na discriminação das espécies *Herbaspirillum*. Além disso, soros policlonais produzidos e a análise do polimorfismo de bandas geradas por Inter-LINE PCR mostraram-se como ferramentas adicionais na distinção de isolados ao nível de espécie. Na segunda parte deste trabalho foram avaliados aspectos da ecologia da bactéria. Foi observado que *H. seropedicae* ocorre naturalmente em raízes, colmos e folhas de diversas espécies de plantas, predominantemente membros da família das gramíneas. Já *H. rubrisubalbicans* foi isolada apenas de cana-de-açúcar e raízes de uma gramínea invasora (*Digitaria insularis*). *Herbaspirillum* não foi isolado de nove espécies de plantas distribuídas

em sete famílias, bem como de 10 amostras de solo não vegetado. A sobrevivência de *Herbaspirillum* spp. no solo foi baixa, atingindo números não detectáveis entre 3 a 4 semanas. A introdução da planta hospedeira elevou a persistência da bactéria no sistema solo-planta. Ademais, foi possível reisolar a bactéria após a introdução de sementes de sorgo em solo cuja população havia atingido números não detectáveis por mais de 6 semanas. Em experimentos de inoculação, demonstrou-se que a população de *Herbaspirillum* spp. no interior das raízes de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar caiu muito pouco, estabilizando-se em torno de 10^4 células. g^{-1} de raízes, enquanto que na parte aérea flutuações maiores foram observadas. Efeitos deletérios significativos ($\alpha = 5\%$) na acumulação de matéria fresca de raízes e da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar foram observados no tratamento nitrogenado, aos 12 e 24 d.a.i.. A partir de 64 d.a.i., o tratamento com nitrogênio aumentou significativamente ($\alpha = 5\%$) o acúmulo de matéria seca. Acúmulos significativos ($\alpha = 5\%$) de matéria fresca da parte aérea foram obtidos aos 24 d.a.i. com *H. seropedicae* estirpes Z67 e HRC54 comparadas ao controle e a testemunha nitrogenada. Na terceira parte do trabalho, a infecção e colonização de plântulas de cana-de-açúcar por *Herbaspirillum* foram investigados utilizando técnicas de microscopia. Demonstrou-se que 1 d.a.i., as bactérias encontravam-se aderidas a superfície das raízes por meio de ataque apolar em monocamada. *Herbaspirillum* infectou às raízes nas zonas de emergência de raízes laterais e regiões de ruptura de células da epiderme. A colonização do interior das raízes ocorreu pela multiplicação das bactérias nos espaços intercelulares das células do córtex. A colonização do interior do córtex foi seguida pela infecção do cilindro central, que ocorreu principalmente próxima as regiões de emissão de raízes laterais. No tecido vascular, *Herbaspirillum* colonizou os meatos celulares e o interior das células de parênquima vascular, invadindo os vasos do xilema. A aplicação da técnica de imuno-ouro, utilizando anticorpos policlonais contra *Herbaspirillum* spp. confirmaram a identidade das bactérias observadas ao microscópio. No quarto capítulo, avaliou-se a reação de duas variedades de cana-de-açúcar contrastantes quanto a sensibilidade a estria mosqueada, a inoculação com diferentes estirpes

de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, bem como a reação de sorgo. Embora todas as estirpes de *Herbaspirillum* tenham sido reisoladas próximas ao ponto de inoculação, apenas estirpes de *H. rubrisubalbicans* incitaram sintomas típicos da doença em sorgo e cana. *H. seropedicae* não incitou sintomas em nenhuma das plantas, induzindo uma resposta hipersensível em ambas variedades de cana-de-açúcar testadas. Observações ao microscópio revelaram um padrão bem distinto de colonização da planta que foi função da espécie de *Herbaspirillum*, da espécie de planta e do genótipo utilizado. No caso da var. B-4362 (susceptível), *H. rubrisubalbicans* colonizou e obstruiu o lúmen dos vasos do xilema. Em adição, invadiu e multiplicou-se nos espaços intercelulares das células do mesófilo. Diferente da var. SP 70-1143, onde *H. rubrisubalbicans* mesmo colonizando os vasos do xilema, formou dentro dos mesmos microcolônias em íntima associação com a parede secundária, jamais obstruindo o lúmen do vaso. O mesófilo da var. SP 70-1143 foi menos extensivamente colonizado, com menor densidade de bactérias e maior síntese e deposição de gomas, comparado com a var. B-4362. Imunomarcagem comparativa de *H. rubrisubalbicans* colonizando as duas variedades de cana sugeriu que no caso da interação com a variedade B-4362, *H. rubrisubalbicans* produziu maior quantidade de exopolissacarídeos (EPS). Esta maior produção pode estar envolvida com o estabelecimento da interação enferma. Com relação a plantas de sorgo, *H. rubrisubalbicans* permaneceu confinado ao interior dos vasos do protoxilema e do metaxilema. A densidade de colonização do vaso refletiu na maior ou menor expressão de sintomas com as bactérias colonizando completamente o lúmen dos vasos em algumas regiões mais avançadas da doença e havendo grande síntese de gomas e formação de microcolônias encapsuladas em regiões de transição entre tecido com e sem sintomas. *H. seropedicae* embora presente em íntima associação com os vasos, parece não ter eliciado nenhuma resposta de defesa na planta.

GENERAL ABSTRACT

The genus *Herbaspirillum* was originally described as a group of diazotrophic bacteria associated with gramineous roots, with only one specie, *Herbaspirillum seropedicae*. Bacterial taxonomists working in Belgium based on results from computer-assisted auxanographic tests and DNA/rRNA hybridisation established a very closed taxonomic relationship between the nitrogen fixing bacteria, *Herbaspirillum seropedicae* and a mild pathogen of sugar cane called "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*. After further analyses, including DNA:DNA hybridisation, "*P.* *rubrisubalbicans* has been proposed to be renamed *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. The first part of this thesis was a comparative study to establish phenotypic and genotypic differences between strains of *H. seropedicae* and *H. rubrisubalbicans*. As shown genotypically, *H. rubrisubalbicans* has phenotypic characteristics very similar to *H. seropedicae*. They differ only in the utilisation (as sole carbon source) of meso-erythritol and N-acetylglucosamine, optimum growth temperature, flagella pattern and induction of mottled stripe disease symptoms on the sugar cane variety B-4362 after artificial inoculation. Oligonucleotide probes based on partial sequences of the 23S rRNA of *H. seropedicae* and *H. rubrisubalbicans* were used as diagnostic probes, showing identical results for the carbon sources. Interspersed repetitive sequences used as oligonucleotide primer for polymerase chain reaction to generate genomic polymorphism (Inter-LINE PCR) was applied in some *Herbaspirillum* strains and the DNA fingerprint pattern was strain-specific. In addition, polyclonal antibodies

specific to both species were tested in ELISA assays against a large number of *Herbaspirillum* strains. In chapter 2 the results are presented of ecological studies on *Herbaspirillum*. The bacteria have been isolated from roots, stems and leaves of a large number of samples of more than 10 different species of the *Gramineae* family, but only exceptionally from other plants. *H. rubrisubalbicans* occurs in sugarcane and seems to be restricted to this crop. Inoculation of strains from both species into soil in high numbers resulted in a rapid decline in their numbers. In 3 to 4 weeks the population of *Herbaspirillum* spp. in soil decreased below detection limits. When sorghum was sown in soil inoculated with both *Herbaspirillum* spp. the bacteria were detected for a much longer period. When sorghum was planted in this soil, 8 weeks after no detection of the bacteria into the soil, the bacteria reappeared and multiplied within the plant tissues. The survival of *Herbaspirillum* spp. in inoculated micropropagated sugarcane plants was evaluated and all the *Herbaspirillum* strains were maintained stable in the sugarcane roots in numbers around 10^4 to 10^6 cells per g of root, 106 days after inoculation. In contrast, a wide range of the population numbers of *Herbaspirillum* spp. in the aerial part, with numbers around 10^2 to 10^3 at the end of the experiment (136 d.a.i.) In the same experiment, *Herbaspirillum* spp. inoculation caused a significant positive increase of the fresh weight of aerial parts in comparison to uninoculated controls at 24 d.a.i., while nitrogen caused a deleterious effect on roots and aerial parts at 12 and 24 d.a.i. In chapter 3, root infection and endophytic establishment in sugar cane plantlets were investigated in a monoxenic system. All the *Herbaspirillum* strains attached to the root surface one d.a.i., randomly over the entire surface, predominantly by apolar attachment in monolayer. Successful endophytic infection of sugar cane roots by *Herbaspirillum* spp. involves the attachment to the plant surface, proliferation of the bacteria mainly at the origin of secondary roots or wound sites, followed by penetration and spreading of the bacteria through the intercellular air space and vascular bundles with subsequent colonisation and establishment of the aerial part, probably into the xylem vessels. Immunogold-labelled root sections confirmed the presence of the inoculated bacteria. In chapter 4, leaves of a mottled stripe disease-susceptible var. B-4362 and of a mottled

stripe disease resistant var. SP 70-1143 of sugar cane were inoculated with *H. rubrisubalbicans* or *H. seropedicae* to compare plant reaction. *H. seropedicae* elicited a hypersensitive response in leaves of both cultivars. In contrast, *H. rubrisubalbicans* produced mottled stripe disease symptoms on the leaves of var. B-4362. Microscopic studies showed that the xylem-conducting elements of leaves were filled with bacteria and a gum, which stained blue-green with toluidine blue. Leaves of var. SP 70-1143 developed no typical symptoms and the infected xylem vessels were never seen to be completely full of bacteria, but were encapsulated in bacterial colonies surrounded by blue-green material. In var. B-4362, bacteria were abundant in the intercellular spaces of mesophyll adjacent to infected xylem, and also filled sub-stomatal cavities. Immunogold labelling using polyclonal antisera raised against *H. rubrisubalbicans* gave a weak signal with the bacteria in var. SP 70-1143, in contrast to the bacteria in var. B-4362, which reacted strongly with the antibody. Immunogold labelling using antibodies against nitrogenase component II showed that nitrogenase was expressed by bacteria in the early stages of infection of var. B-4362, but not in later stages nor by bacteria infecting var. SP 70-1143. Leaves of *Sorghum bicolor* were also examined after inoculation with *Herbaspirillum* spp.. *H. rubrisubalbicans* induced symptoms of red stripe disease and infected leaves showed dense colonisation by the bacteria within the vascular system, in particular, the protoxylem and associated lacunae, with some the later expressing nitrogenase. The bacteria were recognised using *H. rubrisubalbicans*-specific antibodies and immunogold labelling. At the edges of visible disease symptoms, plant gums filled the xylem; bacteria had formed distinct colonies within these gums, with some of the colonies associated with the xylem walls. Plants inoculated with *H. seropedicae* either did not express the disease or showed symptoms. Although, the bacteria were localised within xylem vessels, with the xylem vessels themselves remaining unoccluded and largely free of gums.

INTRODUÇÃO GERAL

1. ESTRATÉGIAS PARA A EXTENSÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO PARA NÃO LEGUMINOSAS.

A extensão da fixação biológica de nitrogênio (FBN) para culturas não leguminosas se constitui em um dos maiores desafios da pesquisa agrícola moderna. Aumentos relativamente pequenos no potencial de FBN de culturas estratégicas no combate a fome (p.ex. arroz) teriam impacto econômico e ecológico muito significativos. Para ser ter uma idéia, plantas de arroz produzindo em torno 3,5 toneladas de grãos por hectare acumulam 120 kg de N. ha⁻¹. Se consideramos que 20% do N incorporado à cultura seja via FBN, ou seja 24 kg. ha⁻¹, e os 80% restantes extraído do N nativo do solo e pela aplicação de adubos nitrogenados (LADHA & REDDY, 1995) melhoramento genético no sentido de aumentar no potencial de fixação para, por exemplo 50%, representariam uma economia adicional de mais 36 kg de N. ha⁻¹ para cada 3,5 tons produzidas. Diante destas perspectivas de impacto, durante as duas última décadas, inúmeras estratégias vem sendo aplicadas para extensão da FBN para gramíneas, algumas das quais um tanto exageradas como a transferência dos genes responsáveis pela FBN (genes nif) oriundos de bactérias de vida livre para plantas superiores, seguida da avaliação de sua expressão (DIXON et al. 1993). Outras estratégias incluem o estabelecimento de simbioses artificiais utilizando técnicas de cultura de tecido (VARGA et al., 1994), a indução de estruturas similares a nódulos em raízes tratadas com auxinas seguidas de inoculação com estirpes de rizóbio

(ZHIGO et al.,1994) ou bactérias diazotróficas mutantes para excreção de amônio (CHRISTIANSEN-WENIGER & VANDERLEYDEN, 1994). Entretanto, mesmo com resultados promissores, todas estas alternativas seriam difíceis de ser aplicadas em escala prática. Uma estratégia bastante viável baseia-se na seleção de genótipos da plantas mais promissores quanto à capacidade de obter nitrogênio através da FBN, associada a investigação das bactérias diazotróficas endofíticas naturalmente associadas a tais genótipos.

Embora muitos avanços no conhecimento sobre os genes envolvidos no processo de fixação biológica de N_2 tenham sido obtidos, parece claro que a transferência e a expressão da capacidade de FBN para células eucarióticas ainda seja assunto para o futuro. De acordo com LADHA & REDDY (1995) a transferência dos genes *nif* deve envolver a expressão da nitrogenase, proteção da enzima contra a inativação pelo oxigênio e suprimento de energia adequado ao processo de FBN, sem comprometimento da produtividade da cultura. Ainda de acordo com estes autores, as organelas mais adequadas para a introdução dos genes de fixação de N_2 em células eucarióticas seriam o núcleo, a mitocondria e o cloroplasto. Diferenças no mecanismo de controle da expressão de genes entre procariontes e eucariontes no núcleo e o fato de mitocôndrias não utilizarem o código genético universal para a transdução de proteínas, tornam o cloroplasto a organela mais apta para introdução e expressão dos genes *nif* (MERRICK & DIXON, 1984).

O estabelecimento de simbioses forçadas, outra estratégia citada acima, baseia-se no co-cultivo de células da planta (macrosimbionte) e da bactéria diazotrófica (microsimbionte) em condições de laboratório, e visa o estabelecimento de uma interdependência metabólica entre os microrganismos para sobrevivência mútua, de modo que a bactéria forneça o nitrogênio e a planta forneça o carbono essencial a bactéria. Se um dos organismos não desempenhar seu papel, o sistema para de funcionar. A seleção da fonte de carbono adicionada ao meio é fundamental para o estabelecimento da dependência mútua, de sorte que o crescimento bacteriano seja regulado pela atividade metabólica da célula

vegetal. Neste caso, a bactéria não deve ser capaz de utilizar a fonte de carbono adicionada ao meio. Um dos primeiros trabalhos dentro desta linha de pesquisa foi conduzido por BERG et al., (1979) que co-cultivaram células de cana-de-açúcar e *Azospirillum* em meio rico em sacarose, fonte de carbono não utilizada pela bactéria. Recentemente, VARGA et al., (1994) estabeleceram uma simbiose forçada entre a bactéria diazotrófica *Azotobacter zettuvii* e células de cenoura (*Daucus carota* L.) baseado neste modelo de indução de dependência da bactéria do carbono oriundo da atividade metabólica da célula vegetal. A associação simbiótica se manteve por 4 anos em meio MS isento de nitrogênio e contendo lactose, a qual não é utilizada por *A. zettuvii*. A atividade de redução de acetileno e o aumento do nitrogênio total em tecidos indiferenciados de cenoura (callus) comparado ao controle indicaram a capacidade da bactéria fixar nitrogênio associada aos espaços intercelulares, característica que foi mantida em plântulas diferenciadas. Este tipo de estratégia parece muito mais interessante sob o ponto de vista de modelagem no estudo de interações planta-bactéria, fornecendo um método prático para observação de alterações anatômicas e fisiológicas que porventura existam, bem como avaliação do grau de compatibilidade e persistência de diversas combinações macro e microsimbionte. Entretanto é bem aceito que simbioses pressupõem longo período de coevolução entre macro e microsimbiontes envolvendo ajustes genéticos complexos, algo difícil de ser conseguido em poucos anos de co-cultivo em placa.

Pesquisadores do mundo inteiro tem explorado a possibilidade de extensão da fixação simbiótica do N_2 para não leguminosas através de estratégias de indução de estruturas similares a nódulos (conhecidas como paranódulos) em raízes de arroz e outros cereais (KLUSH & BENNETT, 1992; KENNEDY & TCHAN, 1992; DE BRUIJIN et al., 1995). Dentre as gramíneas, trigo, milho e arroz desenvolveram para-nódulos em raízes, os quais foram colonizados por bactérias diazotróficas selvagens e mutantes excretoras de amônio (TCHAN & KENNEDY, 1989; RIDGE et al., 1993; CHRISTIANSEN-VENINGER, 1994). Neste caso, a indução das estruturas nas raízes ocorre na presença de enzimas de degradação

de parede celular ou fitohormônios, principalmente auxinas. CHRISTIANSEN-WENIGER & VANDERLEYDEN (1994) mostraram em condições estéreis que mutantes excretores de amônio de *Azospirillum brasilense* colonizaram paranódulos de milho induzidos por 2,4-D e que a atividade da nitrogenase dentro dos paranódulos foi menos sensível ao oxigênio do que em raízes normais. Estes autores sugeriram ainda que a indução de tumores radiculares pelo uso de fitohormônios se constitui em uma das formas para gerar um acesso direto de bactérias selvagens ou modificadas aos fotoassimilados da planta, estabelecendo desse modo uma interação endofítica. Outros autores optaram pela inoculação de paranódulos de arroz com *Azorhizobium caulinodans* (ZHIGUO et al., 1994), um rizóbio que nodula raízes e caules de *Sesbania rostrata*, sendo capaz de fixar nitrogênio em vida livre e possuindo nitrogenase menos sensível ao oxigênio. Porém os resultados não foram satisfatórios, já que foram observadas baixa densidade de bactérias e baixa atividade da nitrogenase nos paranódulos de arroz. JING et al., (1992) relataram a indução natural de nódulos por *Azorhizobium* nas raízes de arroz. De fato, a atividade de redução de acetileno e promoção do crescimento da planta foram observados, bem como proposta a presença de cordões de infecção e bacteróides nas estruturas infectadas. No entretanto, vários destes relatos são controvertidos, com estruturas sendo chamadas de nódulos sem um suporte experimental apropriado. Com relação a fixação de nitrogênio nestas estruturas, poucos relatos utilizaram ^{15}N e incluíram controles adequados. A análise ultraestrutural das células infectadas através de técnicas de microscopia é muita das vezes duvidosa, de forma que o citoplasma não pode ser visto intacto em muitas das fotomicrografias apresentadas, tornando difícil a distinção entre uma infecção saprofítica de células danificadas e a infecção e o estabelecimento intracelular de células intactas. A indução de paranódulos como estratégia para extensão da FBN para outras culturas esbarra em aspectos de aplicabilidade agrônômica e no perigo do uso do 2,4-D, bem como no questionamento geral levantado por LADHA et al., (1993) sobre real necessidade

da indução de estruturas similares a nódulos para se obter taxas de fixação simbiótica de nitrogênio significativas em gramíneas.

Diferentemente do estabelecimento de simbioses artificiais e a indução de estruturas similares a nódulos, o grupo de pesquisa liderado pela Dr. Johanna Döbereiner tem adotado uma linha de pesquisa em fixação biológica de nitrogênio baseado no isolamento, identificação e seleção de bactérias diazotróficas endofíticas de ocorrência natural nos tecidos da planta, associada a seleção de variedades mais promissoras quanto a capacidade de receber nitrogênio via FBN. Este tipo de estratégia sera discutido abaixo com maior profundidade, tomando como modelo a cultura da cana-de-açúcar.

A cultura da cana-de-açúcar é essencial no PROÁLCOOL, o qual é o maior programa de produção de combustível biológico do mundo (BODDEY, 1995a). Uma das razões para o sucesso do programa é o balanço energético positivo, justificado em parte pelo fato de no Brasil, a cana-de-açúcar ter sido melhorada em solos pobres em nitrogênio e por consequência ser cultivada com relativamente baixas quantidades de adubo nitrogenado, com média em torno de 60 kg N. ha^{-1} (RUSCHEL & VOSE, 1982; URQUIAGA et al., 1992; DÖBEREINER et al., 1995). O uso de baixas quantidades de fertilizante nitrogenado é ainda justificada por resultados obtidos em 135 experimentos de calibração de adubação nitrogenado em cana-planta, conduzido nas principais regiões canavieiras do país, no qual em apenas 19% dos experimentos houve resposta da cultura a aplicação de nitrogênio (AZEREDO et al., 1986). A cultura da cana-de-açúcar acumula entre 100 e 200 kg de N. ha^{-1} por estação de crescimento (SAMPAIO et al., 1984) e praticamente todo nitrogênio incorporado na planta é removido do campo de cultivo através da colheita dos colmos e pela queima da palha antes do corte. Desse modo, as extrações contínuas de nitrogênio a cada colheita, deveriam causar uma clara depleção dos níveis de nitrogênio total do solo, associada a queda na produtividade da cultura. Curiosamente, tal fato não tem sido observado, existindo muitas áreas sob cultivo contínuo com cana-de-açúcar por décadas sem quedas na produtividade e nos níveis de N do solo com

o tempo. Estas observações, a luz do conhecimento atual, sugerem que a cultura da cana-de-açúcar possa se beneficiar da fixação biológica de nitrogênio (FBN) associada à planta. De fato, muitas evidências tem sugerido que algumas variedades brasileiras podem fixar nitrogênio atmosférico como foi determinado pela incorporação de gás $^{15}\text{N}_2$ (RUSCHEL et al., 1975; MATSUI et al., 1981) e pela atividade de redução de acetileno (DÖBEREINER et al., 1972; PATRIQUIN et al., 1980). Estes resultados foram posteriormente confirmados na EMBRAPA Agrobiologia em experimentos de balanço de nitrogênio e através da técnica de diluição isotópica com aplicação de nitrogênio marcado ^{15}N em potes grandes (LIMA et al., 1987) e em tanques de concreto (URQUIAGA et al., 1992). Nestes experimentos ficou claro que a capacidade de FBN é fortemente dependente do genótipo, de sorte que os híbridos interespecíficos de *Saccharum* var. CB 45-3 e SP 70-1143 e a variedade Krakatau de *S. spontaneum* foram capazes de obter via FBN entre 60-70% do seu requerimento em nitrogênio, neste caso, em condições ideais de água e nutrientes (exceto nitrogênio). Extrapolações de campo sugerem que cerca de 150 kg de N. ha^{-1} foram incorporados aos tecidos da cana-de-açúcar via FBN (BODDEY et al. 1995b). A variabilidade genotípica na capacidade de fixar nitrogênio pela cultura da cana-de-açúcar foi igualmente demonstrada por SINGH (1994) que estimou a contribuição de FBN utilizando também a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , chegando a valores de 60% para *Saccharum spontaneum*, 54% para *S. sinense* e de 35% para *S. barberi* e anteriormente por RUSCHEL & RUSCHEL (1981) que ainda verificaram que a baixa capacidade de fixar nitrogênio biologicamente era uma característica parcialmente dominante. Interessante é o fato de que as variedades que se mostraram com os maiores potenciais de FBN, serem àquelas que foram melhoradas em solos pobres em nitrogênio, enquanto que variedades melhoradas para altos níveis de nitrogênio, receberam menos nitrogênio via FBN. Apesar de não responsivas a adubação nitrogenada, as variedades brasileiras respondem a aplicação de molibdênio (URQUIAGA et al., 1995), o que é uma característica

típica de culturas que se beneficiam da FBN, devido aos requerimentos de Mo como cofator enzimático na atividade da nitrogenase (JOHANSEN et al., 1977).

Apesar de URQUIAGA et al., (1992) sugerirem que *Acetobacter diazotrophicus* foi o responsável pelas taxas de FBN observadas em cana-de-açúcar, não existem atualmente evidências claras que demonstrem qual(s) o(s) microrganismos responsáveis pelas taxas de FBN observadas. Bactérias como *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. tem sido isoladas também de genótipos de baixo potencial de FBN (SILVA et al., 1995; REIS Jr., dados não publicados). Além do mais, a atividade da nitrogenase não tem sido demonstrada em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas com *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp., crescendo em condições de casa-de-vegetação e campo, bem como uma correlação entre o número de bactérias e FBN (SILVA et al., 1995; REIS Jr., dados não publicados). A complexidade da microflora diazotrófica endofítica se reflete em flutuações populacionais de acordo com a ontogenia, parte da planta e época do ano (COSTA & RUSCHEL, 1981; SILVA et al., 1995). Desse modo, a consideração pontual de que a bactéria responsável pela FBN em cana-de-açúcar seria àquela que se encontra em maior número pode não ser verdadeira. Atualmente, há uma tendência a se acreditar que microrganismos como *A. diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, *Azospirillum* spp. e outros não menos importantes ainda não descritos teriam uma contribuição importante em dado período do desenvolvimento da cultura, sob condições fisiológicas definidas, de forma que a contribuição individual de cada bactéria deva ser investigada, embora não se descarte a necessidade de inter-relação entre todos componentes da comunidade endofítica para atividade efetiva do sistema fixador.

Fica claro que muito trabalho tem que ser feito para confirmar se endófitos diazotróficos são responsáveis pela FBN em cana-de-açúcar e em outras gramíneas e quantificar tal contribuição. Uma das estratégias delineadas pelos pesquisadores do CNPAB-EMBRAPA, seria a investigação comparativa minuciosa dentro do sistema complexo e natural, envolvendo genótipos de cana-

de-açúcar contrastantes quanto a capacidade de receber nitrogênio fixado biologicamente. Embora tal estratégia já tenha sido anteriormente posta em prática, ocorreu de uma forma não muito ordenada e esbarrou em dificuldades metodológicas e no caráter errático dos dados. Atualmente, tem sido proposto trabalhar com o sistema natural em miniatura, ou seja toletes em processo de germinação. As justificativas para trabalhar com este sistema incluem primeiramente o fato de que toletes em germinação exibem elevada atividade da nitrogenase (Nase) e esta atividade ser variável com o genótipo, podendo ser mantida por mais de 2 meses a partir da germinação (RUSCHEL et al., 1975; RUSCHEL & RUSCHEL, 1977; PATRIQUIN et al., 1978); a segunda é que a fixação do nitrogênio observada em toletes em germinação é sem dúvida realizada por bactérias endofíticas, visto que toletes esterilizados superficialmente e postos a germinar em substrato estéril ou mesmo crescendo em solução nutritiva exibiram atividade da Nase (VOSE et al., 1981; COSTA & RUSCHEL, 1981). As ações envolvidas nesta estratégia envolveriam a caracterização qualitativa e quantitativa da microbiota endofítica em genótipos contrastantes, a avaliação da atividade da nitrogenase e estimativa do potencial varietal de fixação endofítica do nitrogênio, bem como estudos anatômicos da interação entre as bactérias endofíticas e os diferentes genótipos utilizando técnicas de microscopia e imunologia.

Uma segunda estratégia utilizada para estudar a FBN na cultura da cana-de-açúcar, está efetivamente em prática na Embrapa - Agrobiologia tem como premissa reduzir a complexidade natural do sistema, estudando de forma isolada os efeitos de cada bactéria no processo de FBN. Neste caso plântulas de cana-de-açúcar oriundas de micropropagação são cultivadas em condições esterilizadas e após diferenciação completa, inoculadas com a(s) bactéria(s) diazotrófica(s) que se deseja estudar os efeitos. Neste caso, o sistema fixador pode em tese ser construído pouco a pouco, ganhando em complexidade a medida que se avança no conhecimento. Este sistema, a parte do produto final que é o entendimento do processo como um todo, merece destaque por facilitar o

entendimento de processos mais básicos, que envolvem a interação de uma bactéria específica e a planta, tais como seu modo de infecção, colonização, estabelecimento endofítico e atividade em associação com a planta, existência das modificações anato-fisiológicas, bioquímicas e moleculares durante a interação. A análise conjunta das informações obtidas para as diversas interações planta-bactéria, irão gerar um conjunto de conhecimentos básicos sobre o relacionamento endofítico entre bactérias diazotróficas e a cana-de-açúcar que servirá, em última análise como modelo para extensão da FBN para outras culturas, ou mesmo para a introdução, ecologicamente mais segura, de endófitos modificados geneticamente, mais eficientes em fixar e excretar nitrogênio para ser utilizado pela planta, bem como a obtenção de indicadores biológicos, por exemplo a presença de genes ou proteínas envolvidos em etapas da interação endofítica, que possam facilitar uma seleção de genótipos mais promissores a associar-se e se beneficiar da fixação de nitrogênio por bactérias endofíticas.

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar aspectos ligados a taxonomia de bactérias do gênero *Herbaspirillum*, descrever os aspectos mais relevantes da ecologia da bactéria no sistema solo-planta, bem como caracterizar ao nível anatômico, a interação endofítica entre *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* e plantas de cana-de-açúcar, descrevendo os sítios de infecção, colonização e estabelecimento endofítico e as possíveis respostas da planta hospedeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- AZEREDO, D.F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, M. & VIEIRA, J.R. Nitrogênio em cana-planta, doses e fracionamento, **STAB**, São Paulo, v. 4, p. 26-33, 1986.
- BERG, R.M.; VASIL, V. & VASIL, I.K. The biology of *Azospirillum*-sugarcane association II. Ultrastructure. *Protoplasma*, New York, v. 101, p. 143-163, 1979.
- BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in sugar cane: a Key to energetically viable biofuel production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 14, p. 263-279, 1995a.
- BODDEY, R.M.; DE OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D. & DQBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Berlin, v. 174, p. 195-209, 1995b.
- BRUIJN, F.J. de; DAZZO, F.B.; SCHNEIDER, M.; JING, Y.; SO, R.; LADHA, J.K. & STOLTZFUS, J. Characterization of induced and natural endophytic relationships between soil bacteria and rice plants using molecular tools and microscopy. **Paper for First Group Meeting of the Frontier Project on Nitrogen Fixation in Rice**, IRRI, n. 5, 1995.
- CHRISTIANSEN-WENIGER C. & VANDERLEYDEN, J. Ammonia excreting *Azospirillum* sp. become intracellularly established in maize (*Zea mays*) para-nodules. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 17, p. 1-8, 1994.

- CHRISTIANSEN-WENIGER C. Para-nodule induction in maize with indole-acetic acid (IAA) and its infection with ammonia excreting *Azospirillum brasilense*. In: **Nitrogen Fixation with Non-legumes**, HEGAZI, N.A.; FAYEZ, M. & MONIB, M., eds., American University in Cairo Press, Cairo, Egito, p. 526-536, 1994.
- COSTA, J.M.T. & RUSCHEL, A.P. Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. In: **Associative N₂ - Fixation vol II**, VOSE, P.B. & RUSCHEL, A.P., eds. CRC Press, Boca Raton, p. 109-118, 1981.
- DIXON, R.; VANDERLEYDEN, J.; ROMERO, D.; BODDEY, R.M.; COKING, E.C.; DENARIE, J.; ELMERICH, C.; ROLFE, B.G. & SPRENT, J. Extension of nitrogen fixation to other crops. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. Eds. **New Horizons in Nitrogen Fixation**, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 765-768, p. 1993.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J. & DART, P.J. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. **Plant and Soil**, Berlin, v. 37, p. 191, 1972.
- DÖBEREINER, J.; URQUIAGA, S. & BODDEY, R.M. Alternatives for nitrogen nutrition of crops in tropical agriculture. **Fertilizer Research**, Dordrecht, v. 42, p. 339-346, 1995.
- JING, Y.; LI, G. & SHAN, X. Development of nodulelike structure on rice roots. In: KLUSH, G.S. & BENNETT, J. eds, **Nodulation and Nitrogen Fixation in Rice : Potential and Prospects**, Philippines, IRRI, v. 123-126, 1992.
- JOHANSEN, C.; KERRIDGE, P.C.; LUCK, P.E.; COOK, B.G.; LOWE, K.F. & OSTROWSKI, H. The residual effect of molybdenum fertilizer on tropical pasture legumes in a sub-tropical environment. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 17, p. 961-968, 1977.
- KENNEDY, I.R.; TCHAN, Y.T. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Recent advances. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 141, p. 467-476, 1992.

- KLUSH, G.S. & BENNETT, J. Nodulation and nitrogen fixation in rice: potencial and prospects. **International Rice Research Institute**, Los Banos, Philippines, 1992.
- LADHA, J.K. & REDDY, P.M. Extension of nitrogen fixation to rice- necessity and possibilities. **GeoJournal**, Dordrecht, v. 35, p. 363-372, 1995.
- LADHA, J.K.; TIROL-PADRE, A.; REDDY, C.K. & VENTURA, W. Prospects and problems of biological nitrogen fixation in rice production: A critical assessment. In: PALACIOS, R.; MORA, J. & NEWTON, W.E. eds, **New Horizons in Nitrogen Fixation**, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 677-682, 1993.
- LIMA, E.; BODDEY, R.M. AND DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ^{15}N -aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 24, p. 413-419, 1987.
- MATSUI, E.; VOSE, P.B.; RODRIGES, N.S.R. & RUSCHEL, A.P. Use of ^{15}N enriched gas to determine N_2 fixation by undisturbed sugar cane plant in the field. In: VOSE, P.B. & RUSCHEL, A.P., ed, **Associative N_2 fixation CRC Press**, Boca Raton, v. 2, p. 153-161, 1981.
- MERRICK, M. & DIXON, R. Why don't plants fix nitrogen? **Trends Biotechnology**, v. 2, p. 162-166, 1984.
- PATRIQUIN, D.; GRACIOLLI, L.A. & RUSCHEL, A.P. Nitrogenase activity and bacterial infection of germinated sugar cane stem cuttings, **Steenbock-Kettering International Symposium on Nitrogen Fixation**, Madison, 1978.
- PATRIQUIN, D.G.; GRACIOLI, L.A. & RUSCHEL, A.P. Nitrogenase activity of sugar cane propagated from stem cuttings in sterile vermiculite. **Soil Biology and Biochemistry** Exeter, v. 12, p. 413. 417, 1980.
- RIDGE, R.W.; RIDE, K.M. & ROLFE, B.G. Nodule-like structures induced on the roots of rice seedlings by addition of the synthetic auxin 2,4 dichlor-phenoxy-

acetic-acid. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne , v. 20, p. 705-717, 1993.

RUSCHEL, A.P. & RUSCHEL, R. Varietal differences affecting nitrogenase activity in rizosphere of sugar cane. **Proceedilings for International Society Sugar Cane Technology**, v. 2, 1977.

RUSCHEL, A.P. & VOSE, P.B. Nitrogen cycling in sugarcane. **Plant and Soil**, Berlin, v. 67, p. 139-146, 1982.

RUSCHEL, A.P.; HENIS, Y. & SALATI, E. Nitrogen-tracing of N-fixation with soil-grown sugar cane seedlings, **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 7, p. 181-182, 1975.

RUSCHEL, R. & RUSCHEL, A.P. Inheritance of N_2 - fixing ability in sugarcane. In: **Associative N_2 - Fixation vol II**, VOSE, P.B. & RUSCHEL, A.P., eds. CRC Press, Boca Raton, p. 133-144, 1981.

SAMPAIO, E.V.S.B.; SALGADO, I.H. & BETTANY, J. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I. Eficiência da utilização de uréia (^{15}N) em aplicação única ou parcelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 943-949, 1984.

SILVA, L.G.; REIS, V.M.; REIS Jr., F.B. & BODDEY, R.M. Ontogenic variation of diazotrophic bacteria in sugar cane (*Saccharum* spp.) tissues. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**, p. 234, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 1995.

SINGH, M. Estimation of nitrogen fixation in *Saccharum* spp. by ^{15}N dilution method. **Journal of Nuclear Agriculture and Biology**, New Delhi, v. 23, p. 1-5. 1994.

TCHAN, Y.T. & KENNEDY, I.R. Possible N_2 -fixing root nodules induced in non-legumes **Agricultural Science**, Melbourne, v. 2, p. 57-59, 1989.

- URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. & DÖBEREINER, J. The role of biological nitrogen fixation in biofuel production from sugar cane. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**, p. 62-63, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 1995.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S. & BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.
- VARGA, Sz.S.; KORÁNYI, P.; PREININGER, É. & GYURJÁN, I. Artificial associations between *Daucus* and nitrogen-fixing *Azotobacter* cells in vitro. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, p. 786-790, 1994.
- VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P.; VICTORIA, R.L. & MATSUI, E. Potential N_2 -fixation by sugar cane, *Saccharum* sp. in solution culture I. Effect of NH_4^+ vs. NO_3^- , variety and nitrogen level. In: **Associative N_2 - Fixation vol II**, VOSE, P.B. & RUSCHEL, A.P., eds. CRC Press, Boca Raton, p. 119-125, 1981.
- ZHIGO, M.; ZHIGANG, L. & QINGYUAN, X. On rice's induced nodulation and transfer of the nodule bacterium into the plant. In: YANFU, N.; KENNEDY, I.R. & TINGWEI, C. eds. **Biological Nitrogen Fixation - Novel Associations with Non-legume Crops**, Qingdao Ocean University Press, Qingdao, China, p. 53-58, 1994.

CAPÍTULO 1

**ESTUDOS COMPARATIVOS ENTRE *Herbaspirillum seropedicae* E
Herbaspirillum rubrisubalbicans PARA FINS TAXONÔMICOS.**

RESUMO

Com base na homologia do RNA e na análise numérica dos resultados de testes de assimilação de 147 fontes de carbono, GILLIS et al., (1990) demonstraram a existência de um relacionamento taxonômico estreito entre o agente causal da estria mosqueada em cana-de-açúcar "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans* e a bactéria fixadora de nitrogênio *Herbaspirillum seropedicae*. A partir dos dados de homologia de DNA, estes autores propuseram a inclusão deste fitopatógeno no gênero *Herbaspirillum*. que passaria a possuir duas espécies, *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. Com objetivo de estabelecer diferenças que pudessem subsidiar a separação do gênero *Herbaspirillum* nas duas espécies propostas, foram conduzidos ensaios fenotípicos comparativos. A proximidade genética entre estes microrganismos foi amplamente demonstrada pela semelhança em uma série de características, dentre as quais a habilidade de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* em fixar N₂ e o comportamento similar em uma série de testes morfológicos e bioquímicos. Dentre as características testadas, estabeleceram-se diferenças quanto ao uso de fontes de carbono (*H. seropedicae* utiliza N-acetilglucosamina e não meso-eritritol e *H. rubrisubalbicans* utiliza meso-eritritol na presença de amônio e não utiliza N-acetilglucosamina), temperatura ótima de crescimento (*H. seropedicae* 34 °C e *H. rubrisubalbicans* 30 °C, flagelação e patogenicidade a variedade de cana-de-açúcar B-4362 (susceptível a estria mosqueada). Sondas de oligonucleotídeos espécie-específica obtidas a partir do

sequenciamento parcial da sub-unidade 23S rRNA de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, testadas em ensaios de hibridização em membrana de nylon, confirmaram o agrupamento baseado no uso de fontes de carbono, o que possibilita seu uso como parâmetro taxonômico. Além disso, a aplicação da técnica de Inter-LINE PCR para *Herbaspirillum* (reação em cadeia da polimerase utilizando como sequência iniciadora uma sequência repetida derivada do genoma de mamíferos), produziu um padrão de amplificação de bandas bastante complexo, porém relativamente similar entre espécies, o que valida seu uso potencial como ferramenta na distinção das espécies de *Herbaspirillum*. Por fim, anticorpos policlonais produzidos contra *H. seropedicae* estirpe HRC54 e *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103, testados em ensaios imunoenzimáticos de ELISA, demonstraram-se espécie-específicos, correlacionando-se bem com os testes de fonte de carbono e uso de sondas de oligonucleotídeos.

ABSTRACT

Results from computer-assisted auxanographic tests and DNA/rRNA hybridisation have established a very close taxonomic relationship between the nitrogen fixing bacterium, *Herbaspirillum seropedicae* and a mild pathogen of sugar cane called "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*. After further analyses, including DNA:DNA hybridisation, "*P.*" *rubrisubalbicans* has been proposed to be renamed as *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. This comparative study was undertaken to establish phenotypic and genotypic differences between strains of *H. seropedicae* and *H. rubrisubalbicans*. As shown genotypically, *H. rubrisubalbicans* has phenotypic characteristics very similar to *H. seropedicae*, including the ability to fix molecular nitrogen and similar behaviour in biochemical and morphological tests and they differ only in the utilisation (as sole carbon source) of meso-erythritol by *H. rubrisubalbicans* and N-acetylglucosamine by *H. seropedicae*, by optimum growth temperatures (30 °C, *H. rubrisubalbicans*; 34 °C *H. seropedicae*), and by flagella pattern. In addition, *H. rubrisubalbicans* causes mottled stripe disease on the sensitive sugarcane variety B-4362. Oligonucleotide probes based on partial sequences of the 23S rRNA of *H. seropedicae* and *H. rubrisubalbicans* were constructed and used as diagnostic probes. Interspersed repetitive mammalian sequences used as oligonucleotide primer for polymerase chain reaction to generate genomic polymorphism (Inter-LINE PCR) were applied in some *Herbaspirillum* strains and the DNA fingerprint pattern was strain-specific.

However, by visual inspection it was possible distinguish strains belonging to each specie. In addition, polyclonal antibodies specific to both species were tested in ELISA assay against a large number of *Herbaspirillum* strains and a quite good correlation between ELISA results, utilisation of carbon sources and the oligonucleotide probes was obtained.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

MÉTODOS UTILIZADOS NA DEFINIÇÃO DO POSICIONAMENTO TAXONÔMICO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS

A classificação dos diversos organismos em níveis hierárquicos, dentro de grupos de similaridade, com definição de diferentes taxons e nomenclatura específica tem sido aplicada pelo ser humano a bastante tempo, sendo baseada principalmente em características morfo-anatômicas. Em se tratando do mundo microbiano, especialmente dentro do reino bacteriano, características morfológicas apresentam grau de discriminação muito baixo. Desse modo, ao longo deste século uma gama de testes fenotípicos foram desenvolvidos no intuito de classificar as bactérias, estabelecendo-se uma série de protocolos que levaram a definição de diferentes espécies bacterianas. Dentre as inúmeras características fenotípicas que podem ser avaliadas, encontram-se testes morfológicos e culturais, que avaliam a forma e outras características visuais particulares da célula e das colônias bacterianas, bem como presença de inclusões intracelulares, coloração de Gram e flagelos. Testes bioquímicos que caracterizam-se pela avaliação da presença de determinadas biomacromoléculas, principalmente enzimas, como por exemplo catalase, gelatinase, amilase, oxidase, nitrogenase, nitrato redutase, bem como testes de uso de diferentes fontes de carbono e testes de tolerância a diferentes compostos como sais ou antibióticos. Testes fisiológicos que avaliam a dinâmica de crescimento da

bactéria em diferentes condições físico-químicas como variações de temperatura, pH, aeração, também precisam ser usados.

Os estudos de filogenia renderam-se aos avanços da informática, incorporando programas de computador que armazenam e analisam os resultados de testes fenotípicos, gerando árvores taxonômicas baseados em agrupamentos por similaridade dentro das características testadas, o que é conhecido como análise numérica. Dados fenotípicos foram os primeiros a serem avaliados por meio de comparação numérica assistida por computador, permitindo assim a avaliação de um grande número de características e estirpes. Como resultado são geradas matrizes de dados mostrando a percentagem de similaridade entre pares de estirpes e agrupamentos resultando em dendrogramas que revelam a consistência das características fenotípicas (VANDAMME et al., 1996). Certamente, quanto maior o número de características fenotípicas, mais próximo este agrupamento tende a refletir as variações no genoma, assumindo assim grande relevância na classificação bacteriana. HU et al. (1991) trabalhando com o grupo filogeneticamente heterogêneo das pseudomonas fitopatogênicas não fluorescentes, realizaram a análise numérica do resultado de 57 testes bioquímicos e nutricionais, obtendo uma boa correspondência entre o arranjo proposto pela análise numérica e ensaios de homologia de RNA e DNA previamente realizados.

Mais recentemente, uma série de compostos químicos presentes na parede celular e no interior da célula bacteriana tem sido extraídos por métodos analíticos específicos e utilizados com sucesso em taxonomia bacteriana, sendo conhecidos como marcadores quimiotaxonômicos. O padrão de poliaminas tem sido considerado como um dos principais marcadores quimiotaxonômicos em bactérias Gram negativas (BUSSE & AULING, 1988), tendo sido usado com sucesso na rápida diferenciação de bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Xanthomonas* e constituindo-se também em uma ferramenta poderosa na rápida exclusão de estirpes mal classificadas de ambos os gêneros (AULING et

al., 1991). O perfil de ácidos graxos celulares é um marcador quimiotaxonômico igualmente importante. Estudos conduzidos por STEAD (1992) indicaram a existência de padrões característicos de ácidos graxos nos cinco sub-grupos r-RNA de *Pseudomonas* propostos por PALLERONI et al., (1984), mas particularmente os hidroxiácidos são de alto valor taxonômico. Outro composto quimiotaxonômico presente na membrana citoplasmática são quinonas isoprenoides, principalmente as menaquinonas, as quais apresentam uma variação no comprimento, nível de saturação e hidrogenação das cadeias laterais, podendo ser utilizadas para caracterizar bactérias em diferentes níveis taxonômicos (COLLINS & JONES, 1981).

Métodos fenotípicos ligados a tecnologia de proteínas são igualmente valiosos em sistemática microbiana. O'FARRELL (1975) estima que entre 1000 e 2000 genes no genoma dos procariontes são expressos como proteínas, o que obviamente sugere que tais proteínas quando separadas eletroforeticamente poderiam gerar padrões distintos e se usados comparativamente teriam grande utilidade na taxonomia bacteriana. A aplicação do padrão de proteínas totais em sistemática microbiana tem sido revisado por KERSTERS & DE LEY (1975). Os estudos incluem aplicação da análise numérica, correlação com hibridização DNA:DNA (OWEN & JACKMAN, 1982) e tipagem epidemiológica (HUDSON et al., 1976). O método clássico e mais amplamente estudado é a comparação do perfil de proteínas totais obtidos por meio de eletroforese com sódio dodecil sulfato em gel de poliacrilamida em uma dimensão (1 D-SDS-PAGE). Este método apresenta um potencial de discriminação taxonômico similar a hibridização DNA:DNA, sendo útil ao nível de espécie em muitos níveis taxonômicos, entretanto exige homogeneidade completa das condições experimentais para que resultados reproduzíveis e com valor de comparação sejam obtidos (JACKMAN, 1985). XIANG & HAYWARD (1994) utilizaram esta técnica para avaliar o relacionamento taxonômico entre as espécies de *Pseudomonas* pertencentes a superfamília rRNA II (PALLERONI et al., 1973) e as consideradas *pseudomonas* autênticas,

verificando que os agrupamentos envolviam estirpes de uma mesma espécie e que os membros da rRNA II apresentavam alto grau de divergência em relação ao gênero *Pseudomonas*, fato que já tinha sido observado por outros autores utilizando métodos genotípicos (STACKEBRANDT et al., 1988; YABUUCHI et al., 1992). Já MOREIRA (1991) comparou o perfil de proteínas totais (1 D-SDS-PAGE) de 169 estirpes de rizobio isoladas de diferentes leguminosas arbóreas, obtendo através da análise numérica dos valores de densitometria das bandas 17 grupos com níveis de similaridade acima de 84% e outras 28 estirpes ocupando posições isoladas no dendrograma. Neste trabalho a autora não obteve relações consistente entre os agrupamentos propostos e testes fenotípicos, origem geográfica das plantas ou mesmo com a filogenia de espécies de leguminosas e em muitos casos obteve perfis distintos de espécies e gêneros conhecidos. Provavelmente, neste caso específico tal técnica não foi tão adequada, já que se tratava de um grande número de estirpes e grupos tão diversos, sendo talvez mais recomendável uma seleção prévia de grupos por outros critérios taxonômicos como apontado por JACKMAN (1987). Uma variante da técnica com potencial de resolução superior é o SDS-PAGE bidimensional, porém este é considerado impraticável para um grande número de estirpes. Ademais, o elevado nível de discriminação do método (uma única proteína diferente pode ser detectada) pode não ser requerido para muitas das aplicações em sistemática, sendo mais adequado para tipificação de estirpes.

Igualmente sensível é o método de padrão de isoenzimas após separação eletroforética (SELANDER et al., 1986), na qual as formas isoenzimáticas de um grupo de enzimas são identificadas por mobilidade eletroforética diferencial, após adição de substrato específico e formação de cor. Este método possui sensibilidade infraespécie e tem sido utilizado em estudos de larga escala para estimar diversidade genética e a estrutura natural de populações em um grande número de bactérias, permitindo estabelecer um relacionamento genético entre diferentes estirpes de uma espécie e correlações

com características ecológicas como foi conduzido por CABALLERO-MELLADO & MARTINEZ-ROMERO (1994) para *Acetobacter diazotrophicus*, onde ficou demonstrada a limitada diversidade genética deste diazotrófico endofítico.

Anticorpos policlonais e monoclonais utilizados em técnicas imunológicas como imunoprecipitação ou reação imunológica de ELISA possuem valor taxonômico, no entanto as condições de testes devem ser bem definidas. O nível de distinção do soro é dependente de sua qualidade, podendo ser gênero, espécie ou estirpe específico, dependendo da natureza dos determinantes antigênicos alvos para os quais o soro foi produzido (SCHLOTTER et al., 1995).

Por mais completo que seja o conjunto de testes fenotípicos aplicados a taxonomia bacteriana, estes refletem sempre uma parte muito pequena do conjunto de informações contidas dentro do genoma bacteriano. Estas limitações só podem ser ultrapassadas quando avaliamos diretamente os ácidos nucleicos (DNA e RNA), cujos diferentes graus de similaridade na sequência das bases refletem diferentes graus de relacionamento filogenético entre organismos. Uma gama de métodos genotípicos foram desenvolvidas na última década, dominando indubitavelmente a taxonomia moderna. Aos métodos genotípicos clássicos e virtualmente exigidos em taxonomia bacteriana como mol % G +C, a hibridização DNA:rRNA e DNA:DNA, tem sido descritos novos métodos genotípicos tais como sequenciamento das sub-unidades 5S, 16S e 23S r-RNAs e diversos métodos de geração de polimorfismo baseados em padrões de amplificação e hibridização com genes específicos (VANDAME et al., 1996; AMANN et al., 1995). Estas técnicas tem promovido um grande aumento de sensibilidade na separação de microrganismos e distinção e reclassificação de novas espécies, ampliando e facilitando os estudos de taxonomia e filogenia.

A hibridização DNA:DNA é a técnica de referência na definição da espécie bacteriana, a qual inclui de acordo com WAYNE et al. (1987) todas as estirpes com grau de hibridização DNA:DNA igual ou superior a 70% e com 5 °C ou menos de variação na temperatura de dissociação das fitas de DNA padrão e

teste. Este critério de definição de espécie bacteriana, embora amplamente aceito, esbarra em problemas de ordem metodológica e prática, discutidos na revisão de VANDAMME et al., 1996, ficando o critério de 70% mais como indicativo do que propriamente como valor absoluto. Outro parâmetro genotípico classicamente utilizado em taxonomia bacteriana é a determinação da relação entre as bases do DNA, dado pela % em moles das bases G + C em relação ao total de bases. Geralmente, as variações observadas dentro da espécie são menores que 3% e não maiores que 10% ao nível de gênero (STACKEBRANDT & LIESACK, 1993).

A hibridização DNA:rRNA tem sido utilizada como ferramenta na discriminação do relacionamento de estirpes ao nível de gênero, porém tem sido gradualmente substituída por estudos de homologia baseados no sequenciamento de sub-unidades do ribossoma. O rRNA é a marca mais adequada para estudos de filogenia porque esta presente em todas bactérias, é funcionalmente constante e é composto de sequências altamente conservadas e regiões variáveis (STACKEBRANDT et al., 1985; OLSEN et al., 1986). O sequenciamento dos genes estruturais da sub-unidade 16S ou 23S rRNA é feito a partir da amplificação desta região com sondas com sequência complementar a regiões conservadas e posterior sequenciamento (LANE et al., 1985). As sequências obtidas são comparadas com outras presentes em bancos de dados e o relacionamento taxonômico obtido por percentagem de similaridade entre as sequências.

Além dos métodos envolvidos na discriminação de bactérias ao nível de gênero e espécie, durante os últimos anos, um número muito grande de técnicas moleculares intra-específicas foram desenvolvidas, com poder de discriminação ao nível de estirpe. A primeira geração de técnicas de tipagem do DNA incluíram a análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição ("restriction fragment length polymorphism-RFLP") e a análise do DNA plasmidial. No primeiro caso, o genoma total é extraído e digerido com enzimas de restrição, o conjunto

de fragmentos é separado eletroforéticamente em gel de agarose e os padrões são comparados. Em muitos casos um padrão muito complexo de fragmentos é obtido dificultando as análises. Uma variante da técnica utiliza enzimas de restrição com poucos sítios de restrição (“low frequency restriction fragments analysis-LFRFA”). Esta técnica gera um número menor de fragmentos, porém muito grandes e difíceis de separar em gel de agarose, necessitando de uma técnica de eletroforese especial (“pulsed-field gel electrophoreses-PFGE”). De forma alternativa, o padrão complexo do RFLP pode ser transferido para membrana de nitrocelulose, sendo hibridizado com sondas específicas. GÜNDISCH et al. (1993) fez uso desta combinação de técnicas (RFLP-PFGE e hibridização com sonda 23S rRNA) para estirpes de *Azospirillum brasilense* e *A. lipoferum*, obtendo no primeiro caso um padrão estirpe específico e no segundo caso um padrão espécie específico.

A introdução da reação em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction-PCR”) permitiu o desenvolvimento de uma gama de técnicas de identificação de estirpes. A rapidez, simplicidade e facilidade de aplicação da técnica de PCR, permite que novas aplicações sejam constantemente desenvolvidas e que a técnica seja uma das metodologias mais amplamente utilizadas. WILLIAMS et al., (1990) descreveram a técnica de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (“random amplified polymorphism DNA-RAPD”), utilizando sequências iniciadoras arbitrárias curtas em ensaios de PCR para gerar polimorfismo, sendo utilizadas como marcadores genéticos intra-espécie. Alternativamente, sequências complementares a regiões específicas no genoma das bactérias como é o caso dos locos gênicos ERIC (“enterobacterial repetitive intergeneric consensus”) e REP (“repetitive extragenic palindromic”), conhecidos como sequências repetidas dispersas no genoma de bactérias Gram positivas e negativas e cuja função é desconhecida, podem ser utilizadas como sequências iniciadoras em técnicas de PCR para geração de polimorfismo (DE BRUIJN, 1992; VERSALOVIC et al., 1994). Estas técnicas normalmente empregadas na

tipificação de estirpes de uma espécie, podem ter seu nível de discriminação alterado para diferenciar espécies dependendo das condições de estrigência da reação (VANDAMME et al.,1996). A combinação do PCR com RFLP gerou o método conhecido como análise do padrão de restrição de rDNA amplificado ("amplified-rDNA restriction analysis method-ARDRA"). Neste método, a sequência de genes estruturais da 16S e/ou 23S rDNA incluindo ou não as regiões intergênicas, é amplificado pelo uso de sondas universais complementares a domínios conservados do rRNA o produto do PCR é em seguida digerido com uma combinação de enzimas de restrição. Ao contrário dos métodos descritos acima, o ARDRA gera padrões espécie-específicos tendo em vista o caráter de conservação de grande parte das regiões dos genes estruturais do rRNA (GURTNER et al., 1991; VANEECHOUTTE et al., 1992). Já LAGUERRE et al.,(1996) por meio de PCR-RFLP dos genes 16S e 23S rRNA incluindo as sequências intergênicas, obteve poder discriminatório ao nível de estirpe. Outra combinação do PCR e RFLP produziu a técnica de polimorfismo de tamanho do fragmento amplificado ("amplified fragment length polymorphism-AFLP"). Esta baseia-se na análise do padrão de restrição (RFLP) com posterior amplificação por PCR de fragmentos de DNA selecionados do total de fragmentos obtidos por restrição. A restrição é conduzida utilizando duas enzimas que produzem fragmentos de DNA com terminações diferentes. A estas terminações de sequência conhecida, são acoplados oligonucleotídeos curtos ("adapters") que servirão de molde para o PCR. A amplificação seletiva é conduzida pelo uso de duas sequências iniciadoras complementares aos "adapters", acrescidas de algumas bases complementares as terminações de restrição. JASSEN et al. (1996) comprovaram a aplicabilidade da técnica AFLP como ferramenta taxonômica, estudando 147 estirpes distribuídas nos gêneros *Xanthomonas*, *Aeromonas*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, dentre outros, já extensivamente estudados por outros métodos genotípicos e quimiotaxonômicos, obtendo concordância perfeita com dados de homologia DNA:DNA.

A TAXONOMIA DO GÊNERO *HERBASPIRILLUM*

O gênero *Herbaspirillum* foi descrito por BALDANI et al. (1986) como um novo grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas às gramíneas, baseados em 119 isolados obtidos de solo de rizosfera, raízes lavadas e esterilizadas de arroz, sorgo e milho. Por apresentarem morfologia celular em bastões curvos com movimento espiriloíde, formação de película aerotática de crescimento em meio semi-sólido sem N e se associarem às raízes de cereais, os novos isolados foram inicialmente considerados como uma quarta espécie de *Azospirillum* (BALDANI et al.,1984). Entretanto, FALK et al. (1986) baseados em experimentos de hibridização de RNA:RNA eliminaram esta possibilidade. Resultados de ensaios de homologia de DNA:DNA entre 17 isolados de *Herbaspirillum* de várias origens com a estirpe padrão (267) mostraram valores entre 53 e 100%, enquanto que com *Azospirillum* spp. foi menor que 24% (BALDANI et al.,1986). Estes resultados aliados a comparação de *Herbaspirillum* com sete outros gêneros de bactérias fixadoras de N₂ em testes morfológicos e bioquímicos justificaram a criação do novo gênero *Herbaspirillum*, tendo como única espécie *Herbaspirillum seropedicae*. A descrição do gênero inclui bactérias em forma de bastonetes curvos, gram negativos, microaerobicos,vibrióides, móveis por 1 a 3 flagelos inseridos em 1 ou 2 pólos e desse modo foram incluídos na sessão 2 do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (KRIEG,1984).

Recentemente na Bélgica, em avaliação conjunta de testes de hibridização de DNA:rRNA e análise numérica de resultados de testes de assimilação de 147 fontes de carbono, *Herbaspirillum seropedicae* apresentou alta relação genética com "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, o agente causal da doença estria mosqueada em cana-de-açúcar descrito por CHRISTOPHER & EDGERTON (1932) e KRASILNIKOV (1949). A classificação desse microrganismo no gênero *Pseudomonas* foi primeiramente questionada por GOOR et al. (1986), baseados em ensaios de hibridização de DNA:rRNA com 35

estirpes. Desse modo, "*P. rubrisuba/bicans*" ocupava posição separada na Superfamília III rRNA e de acordo com GOOR et al. (1986) deveria provavelmente pertencer a um outro gênero ou ser constituinte de um novo gênero. Estudos conduzidos por STEAD (1992) trabalhando com o uso do padrão de ácidos graxos celulares como parâmetro taxonômico para classificação de *Pseudomonas* fitopatogênicas, confirmaram a posicionamento errôneo de "*P. rubrisubalbicans*".

Subsequentemente, o relacionamento taxonômico entre *H. seropedicae* e "*P. rubrisubalbicans*" foi avaliado pela homologia de DNA:DNA (GILLIS et al., 1990). Estes autores, com base nos resultados de homologia do RNA e DNA, e na análise numérica de testes de assimilação de fontes de carbono, concluíram que ambos microrganismos constituem um único sub-ramo rRNA dentro da Superfamília III rRNA e propuseram a inclusão de "*P. rubrisubalbicans*" no gênero *Herbaspirillum*, que assim passaria a possuir duas espécies, *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. A subdivisão foi justificada pela baixa % de ligação de DNA e pela existência de diferenças fenotípicas entre as espécies.

OBJETIVOS

Diante dos resultados obtidos por GILLIS et al. (1990), o presente capítulo teve como objetivo comparar estirpes padrão de *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* sin. “*Pseudomonas*” *rubrisubalbicans* por meio de testes fenotípicos e genotípicos com o intuito de estabelecer características diferenciadoras ao nível de espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

BACTÉRIAS:

Para obter o inóculo para os diferentes testes de comparação, estirpes de ambas espécies de *Herbaspirillum* foram crescidas em meio Líquido Caldo Nutriente suplementado com glicerol (10 g.l^{-1}) por 48 horas a 30°C e agitados a 130 rpm. A designação e origem dos isolados utilizados encontra-se na tabela 1.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E CULTURAIS:

As estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* (267, Z78 e HRC54) e *H. rubrisubalbicans* (M4, M1 e 175) foram comparadas quanto as características das colônias em 5 meios sólidos diferentes: meio JNFb (BALDANI et al.,1992 meio NFb (TARRAND et al.,1978), meio 79 (VINCENT, 1970) meio B de King (KING et al.,1954), meio batata (BALDANI & DÖBEREINER, 1983) e meio Caldo nutriente. A morfologia das células bacterianas foi avaliada ao microscópio ótico de contraste de fase, a partir do crescimento das bactérias em meio JNFb semi-sólido por 48 horas, quando crescendo com N_2 ou NH_4^+ como fonte de nitrogênio ou a partir de colônias obtidas em placas contendo meio batata sólido.

TABELA 1- Origem e designação das estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* utilizadas nos testes comparativos.

ESPÉCIE/ESTIRPE	DESIGNAÇÃO LMG ¹	DESIGNAÇÃO ATCC ²	ORIGEM DO ISOLADO
<i>H. seropedicae</i>			
Z67 ^T	6513	35892	RAÍZES DE ARROZ, BR
Z78	6514	35893	RAÍZES DE SORGO, BR
2176	6512		RAÍZES DE MILHO, BR
Z152	10660		RAÍZES DE MILHO, BR
HRC50	14778		RAÍZES DE CANA, BR
HRC54			RAÍZES DE CANA, BR
HRC80			RAÍZES DE CANA, BR
HAWAÍ			RAÍZES DE CANA, HAWAÍ
HRL digit.			RAÍZES DE DIGITÁRIA, BR
HRL brach.			RAÍZES DE BRAQUIÁRIA, BR
HRL gord.			RAÍZES DE C. GORDURA, BR
HCC100	14780		COLMOS DE CANA, BR
HCC101			COLMOS DE CANA, BR
HCC102	14781		COLMOS DE CANA, BR
HPD 5 ³	14784		RAÍZES DE PL. INVASORA, BR
ISOL 1			RAÍZES DE CANA, BR
M2 ⁴	2284		FOLHAS DE CANA, AUSTRÁLIA
<i>H. rubrisubalbicans</i>			
M4 ^T	2286	19308	FOLHAS DE CANA, USA
MI	1278		FOLHAS DE CANA, MAURITIUS
M5	6415		FOLHAS DE CANA, REUNION
M6	6420		FOLHAS DE CANA, JAMAICA
IBSBF 175	10462		FOLHAS DE CANA, MAURITIUS
IBSBF 198	10463		FOLHAS DE CANA, MAURITIUS
HRC51			RAÍZES DE CANA, BR
HCC103			COLMOS DE CANA, BR
B-4362	11128		FOLHAS DE CANA, BR
HPD 1 ³			RAÍZES DE PL. INVASORA, BR

¹ LMG: Culture Collection, Laboratory of Microbiology, Universiteit Gent, Ghent, Belgium.

² ATCC: American Type Culture Collection, Rockville.

³ HPD 5: raízes de planta daninha não identificada, HPD 1: raízes de *Digitaria insularis*.

⁴ M2: estirpe originalmente classificada como *P. rubrisubalbicans*, não fixa nitrogênio.

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO ATIVIDADE DE REDUÇÃO DE ACETILENO (ARA):

A atividade da nitrogenase de *H. seropedicae* (267 e 278) e *H. rubrisubalbicans* (M1, M4, M5, M6, 175 e 198) foi avaliada pelo método de redução de acetileno como descrito por BALDANI (1996) utilizando frascos de vidro (volume 15 ml) contendo 5 ml de meio NFb-malato semi-sólido (TARRAND et al., 1978) suplementado ou não com 0,005% de extrato de levedura, inoculados com 0,1 ml do inóculo e crescidos por 44 h a 30 °C. As estirpes padrão de *H. seropedicae* Z67 e de *H. rubrisubalbicans* M4 foram também testadas quanto a habilidade de crescer e fixar nitrogênio em meio NFb-malato semi-sólido contendo diferentes concentrações de sacarose (0, 50, 100 e 150 g. l⁻¹) e sob 4 temperaturas (30, 34, 38 e 41 °C). A atividade de redução de acetileno foi avaliada depois de 24 e 48 horas de crescimento, utilizando duas repetições por tratamento.

PRODUÇÃO E INCORPORAÇÃO DE ¹⁵N₂:

Para confirmar a capacidade de fixar N₂ de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, foi conduzido um ensaio sob condições de laboratório utilizando ¹⁵N₂. O gás marcado foi produzido a partir de 0,5 mg de sulfato de amônio com 10,6% de ¹⁵N em excesso, convertendo-se a amônia para gás N₂ por meio de oxidação com 1 ml de uma solução de hipobromito de lítio preparada de acordo com TRIVELIN et al. (1973). A reação de oxidação ocorreu no interior de uma seringa plástica de 50 ml e o gás formado impulsinado para outra seringa ligada a esta por meio de uma borracha. Foram utilizadas 5 estirpes de *H. rubrisubalbicans* e 3 estirpes de *H. seropedicae* crescidas em meio JNFb-malato semi-sólido (BALDANI et al., 1992) adicionados ou não de extrato de levedura (20 mg.l⁻¹) por 72 horas a 32 °C. Os frascos foram vedados com rolhas de borracha tipo suba-seal e 20% da fase gasosa foi substituída por ¹⁵N₂. Os frascos foram

incubados por 12 horas a 32 °C e analisados para N-total e enriquecimento de $^{15}\text{N}_2$ em excesso como descrito por BODDEY et al. (1983). O controle não fixador, constou de duas estirpes (267 e M4) crescendo em meio suplementado com 20 mM de cloreto de amônio e avaliados conforme descrito acima.

AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE:

O potencial fitopatogênico de algumas estirpes de *Herbaspirillum* spp. foi avaliado em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) variedades BR 303 e BR 005, capim elefante (*Pennisetum purpureum*), milho doce (*Zea mays*) var. BR400 e cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum*) variedades SP 70-1143 e B-4362. O ensaio foi conduzido em condições de casa de vegetação com quatro repetições por plantas utilizando potes plásticos preenchidos com 2 kg do horizonte superficial de um solo classificado como Pvd série Itaguaí, fertilizado com o correspondente a 20 kg.ha⁻¹ de N na forma de (NH₄⁺)₂SO₄, 200 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ como superfosfato simples e 100 kg.ha⁻¹ de K₂O como K₂SO₄. As estirpes foram crescidas em meio Caldo nutriente a 32 °C por 48 horas, ressuspendidas em solução salina 0,85% e preparadas para uma concentração final de 10⁸ células. ml⁻¹, que corresponde a 90% de transmitância lida em um colorímetro (ausJena) com 600 nm de comprimento de onda. Após a preparação das plantas (toallete), 0,5 ml da suspensão bacteriana foi inoculada por injeção com agulha descartável seguindo a metodologia proposta por EIRA (1972). As plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 h. A avaliação dos sintomas realizou-se 7 d.a.i., sendo para o propósito taxonômico, apenas qualitativa, atribuindo-se “+” para existência de sintomas e “-” para ausência. O controle constou de plantas inoculadas com solução salina estéril.

USO DE FONTES DE CARBONO:

O meio utilizado no ensaio foi o JNFb semi-sólido pH 6,0, substituindo o malato, pela fonte de carbono a ser testada (BALDANI et al., 1992), acrescido (N+) ou não (N-) de cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Todas as fontes de carbono foram dissolvidas em solução tampão fosfato 3mM pH 6,0, esterilizadas por filtração em milipore e preparadas para uma concentração final no meio de cultura de 0,5%. O inóculo foi obtido a partir d.a centrifugação de 5 ml do crescimento bacteriano, ressuspendido em solução salina. Em seguida, inoculou-se 100 µl da suspensão bacteriana em frascos de vidro contendo 5 ml do meio com as fontes a serem testadas, e incubou-se a 30 °C. As avaliações ocorreram 7 d.a.i., sendo considerado como crescimento positivo, aqueles tratamentos onde se formava uma grossa película de crescimento na superfície dos meios.

MOTILIDADE

A motilidade foi avaliada em placas de petri contendo meio caldo nutriente com 0,4% de ágar. Para tal inoculou-se 200 µl das estirpes (267, Z78, HRC54, MI, M4, M5, M6 e IBSBF175) crescidas em meio líquido caldo nutriente contendo 10 g.l⁻¹ de glicerol. As placas foram incubadas a 30 °C e o diâmetro do halo de crescimento observado aos 1, 2, 4 e 6 dias após a inoculação.

VISUALIZAÇÃO DE FLAGELOS AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO

A metodologia utilizada foi uma cortesia do Prof. Kitajima (Centro de Microscopia Eletrônica da ESALQ) com modificações introduzidas por Geraldo da Cruz Baeta (Laboratório de Gramíneas, EMBRAPA-CNPAB). *H. seropedicae* estirpes (267, Z78, HRC54, HCC100, HRC80, isol 1 e M2) e *H. rubrisubalbicans* estirpes (M1, M4, HCC103 e HRC51) foram crescidas em placas contendo meio batata por no máximo 48 ha 30 °C. Após este período, foram selecionadas colônias de cada estirpe e utilizando bastões de vidro oco e esterilizados, isolou-se cada colônia e adicionou-se 100 µl de água destilada estéril. Após 10 minutos,

tomou-se uma gota da suspensão de bactérias e depositou-se sobre uma placa de cera. Então, flutuou-se uma grade de cobre coberta com um filme de formvar (solução 0,5% em clorofórmio) sobre a suspensão bacteriana, deixando por 2 minutos, em seguida retirou-se o excesso de água com papel de filtro, lavou-se a grade por 2 minutos em uma gota de água destilada estéril, secou-se com papel de filtro e contrastou-se as bactérias utilizando uma solução aquosa de acetato de uranila 5%, deixando a grade flutuando nesta solução por 2 minutos. Ao final do processo, retirou-se o excesso de solução com papel de filtro deixando a grade secar por no mínimo 1 hora. As grades foram observadas em um microscópio eletrônico de transmissão modelo ZEISS EM900 com 80KV de voltagem.

MÉTODOS MOLECULARES

Os testes e análises moleculares fazem parte de um trabalho de colaboração com o grupo do Instituto GSF (Alemanha), sob coordenação do Dr. A. Hartmann e Dr. G. Kirchhof, onde foram sintetizadas e aplicadas as sondas de oligonucleotídeos, bem como os ensaios de PCR.

DESENVOLVIMENTO DE SONDAS ESPECÍFICAS PARA *Herbaspirillum* A PARTIR DA 23S-rRNA.

As sondas de oligonucleotídeos específicas para *H. seropedicae* (HS) e *H. rubrisubalbicans* (HR) foram obtidas como descrito por BALDANI et al. (1996). A sequência de nucleotídeos da sonda foi definida a partir do sequenciamento parcial da cadeia da 23S-rRNA de *H. seropedicae* Z67 e *H. rubrisubalbicans* M4 em região próxima a hélice 55-59, conhecida por sua alta variabilidade na composição de nucleotídeos (HÖPFL et al., 1989). Esta sequência foi comparada com a sequência da 23S-rRNA de outros microrganismos presentes em bancos de dados específicos. Através desta análise comparativa foi selecionada uma sequência compostas de 19 nucleotídeos complementares a cadeia da 23S-rRNA.

As sonda sintetizadas foram: Sonda HS: 5'- GTCCCGGTTTTTGCATCG A-3' e Sonda HR: 5'- TAG TCG GTT TTT GCA TCG A-3'.

AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DAS SONDAS

A especificidade das sondas HR e HS foi avaliada por meio de experimentos de hibridização em membrana de nylon (técnica de Dot-Blot), utilizando r-RNA de 80 bactérias de diferentes origens, incluindo bactérias do solo e associativas. O RNA das varias bactérias foi extraído com fenol quente e precipitado com etanol de acordo com QELMULLER et al. (1990) e transferido para membrana de nylon (Quiagen-plus; Diagen). A hibridização com a sonda radioativamente marcada com ^{32}P foi realizada de acordo com o método descrito por KIRCHHOF & HARTMANN (1992).

USO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Estirpes de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* foram comparadas quanto ao padrão de amplificação do DNA por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR). A sequência iniciadora utilizada foi recentemente desenvolvida por SMIDA et al. (1996), sendo complementar a uma região bastante conservada do genoma de mamíferos ("Long Interspersed Elements" LINEs), conhecida como sequência repetidas e cuja função no genoma é desconhecida. A sequência foi ligeiramente modificada e utilizada em um PCR arbitrário (KIRCHHOF et al.,1997). Para tal tomou-se 50 ml do extrato contendo DNA e RNA extraídos de acordo com QELMULLER et al. (1990) e adicionou-se 2 µl de RNase A. incubando-se por 1 a 2 horas a 37 °C. A seguir, adicionou-se 20 µl de acetato de potássio 3M, 130 µl de água e 500 µl de etanol 100% estocando a preparação em freezer durante a noite. A preparação foi centrifugada por 15 minutos a 13000 rpm, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 ml de álcool 70%. Centrifugou-se o extrato nas mesmas condições e a seguir eliminou-se o álcool, secando a amostra à vacuo por 30 minutos. Por fim a amostra foi ressuspensa em

água desmineralizada (50 µl) e a concentração de DNA obtida por leitura da densidade ótica em espectrofotômetro a 260 nm. Os componentes da mistura de reação foram adicionados ao microtubo na ordem seguinte: Água desmineralizada na quantidade suficiente para completar 50 µl; Tampão Taq (10 mM Tris-HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,05% Nonidet P40 v/v, 0,001 % gelatina p/v, 0,05% Tween-20 v/v, com o tampão diluído 10 vezes) --- 5 µl; $MgCl_2$ (50mM) --- 1,5 µl; dNTP --- 1,0 µl; sequência iniciadora --- 1,5 µl; DNA alvo --- 70 - 150 ng. Após uma rápida centrifugação para mistura dos componentes, adicionou-se a enzima Taq polimerase --- 0,3 µl e 2 gotas de parafina. Para controle do tempo e temperatura de reação foi utilizado um DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus). As condições de reação foram primeiramente uma temperatura de 93 °C por 6 minutos, em seguida 5 ciclos com 93 °C por 1 minutos e 30 segundos, 37 °C por 1 minuto e 30 segundos e 72 °C por 2 minutos, respectivamente para desnaturação do DNA, anelamento da sequência iniciadora e extensão da cadeia. A seguir 25 ciclos nas seguintes condições, 93 °C por 1 minuto, 52 °C por 1 minuto e 72 °C por 2 minutos e finalmente um ciclo de 72 °C por 10 minutos. Com o término da reação, alíquotas de 10 µl do produto do PCR das diferentes estirpes de *Herbaspirillum* spp. foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) e as bandas visualizadas após coloração com brometo de etídio. A sequência iniciadora é: 5'-GAG TTT GGC AAA GAC CC-3'.

MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

Anticorpos policlonais produzidos em coelhos contra *H. seropedicae* HRC54 e *H. rubrisubalbicans* HCC103 foram purificados em coluna contendo proteína A (material e métodos do capítulo 3) e testados em ensaios imunoenzimáticos de ELISA indireto (LEVANONY et al., 1987). Foram utilizadas 21 estirpes de *Herbaspirillum* spp. previamente discriminadas ao nível de espécie por homologia de DNA:DNA, hibridização com sondas de oligonucleotídeos específicas (sondas HS e HR) e assimilação de fontes de carbono.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

TESTES MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Baseados em ensaios de homologia de RNA (figura 1) e de DNA (figura 2) associados a análise auxanográfica da utilização de 147 fontes de carbono (figura 3) GILLIS et al. (1990) propuseram a transferência de estirpes mal classificadas de "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans* para o gênero *Herbaspirillum*. No presente trabalho foram realizados testes fenotípicos e genotípicos comparativos visando estabelecer diferenças que justificassem a separação do gênero *Herbaspirillum* em *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. As informações obtidas neste capítulo da tese, somados ao trabalho inicial de GILLIS et al. (1990) e os dados gerados pelos trabalhos de colaboração com Instituto GSF (Munique-Alemanha) resultaram na inclusão de "*P.*" *rubrisubalbicans* dentro do gênero *Herbaspirillum* como uma nova espécie, *H. rubrisubalbicans*, já validada pelo Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana (BALDANI et al., 1996).

A tabela 2 sintetiza algumas das características testadas nesta tese, associadas a dados obtidos por BALDANI et al., (1986) e CHRISTOPHER & EDGERTON (1932), dentre as quais não foram obtidas diferenças para os isolados testados. Como podemos observar nos testes morfológicos (tabela 2), a motilidade observada em placas de agar nutriente com baixa concentração de ágar (0,8%) para *H. seropedicae* (BALDANI et al., 1986), foi também demonstrada para todas as estirpes de "*P.*" *rubrisubalbicans* testadas (M4, M1, M5, M6,

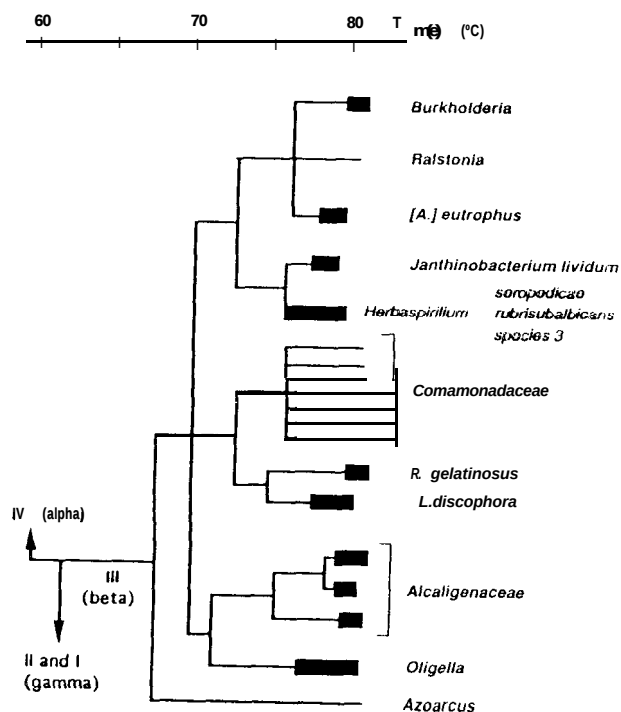


Figura 1- Dendrograma baseado nos valores de $T_{m(e)}$ (“melting temperature”) mostrando a posição do gênero *Herbaspirillum* dentro da superfamília rRNA III (sub-classe β). Além de: *A. Alcaligenes*; *L. Lepfothrix*; *R.*, *Rhodocychus*.

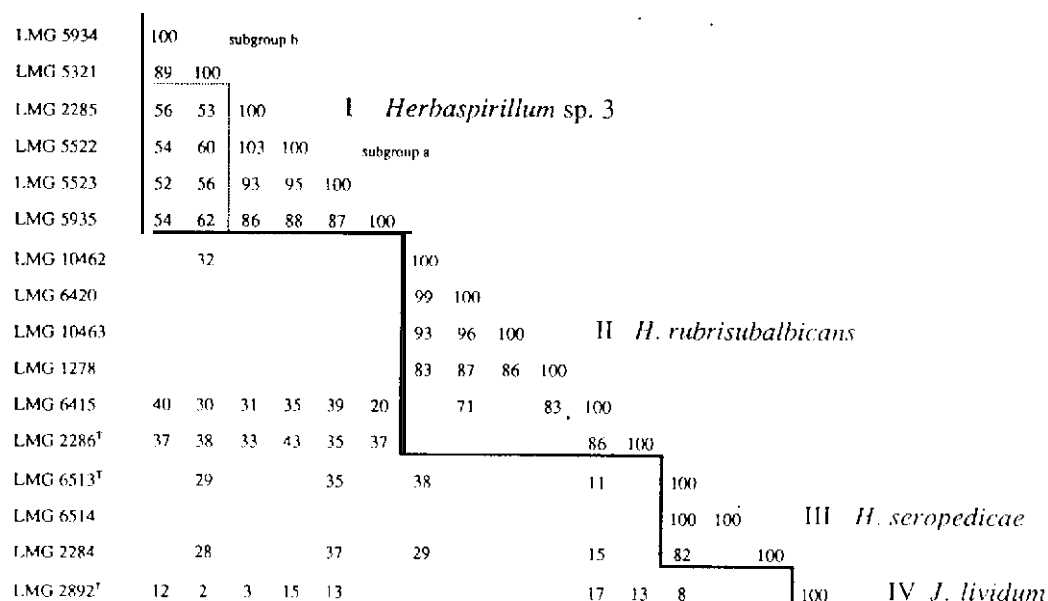


Figura 2- Resultados da hibridização DNA:DNA. Grupo II. *Herbaspirillum rubrisubalbicans* estirpes IBSBF 175 (LMG 10462), M6 (LMG 6429), IBSBF 198 (LMG 10463); M1 (LMG 1278); M5 (LMG 6415); M4^T (LMG 2286) e o Grupo III. *H. seropedicae* estirpes Z67^T (LMG 6513); Z78 (LMG 6514) e M2 (LMG 2284).

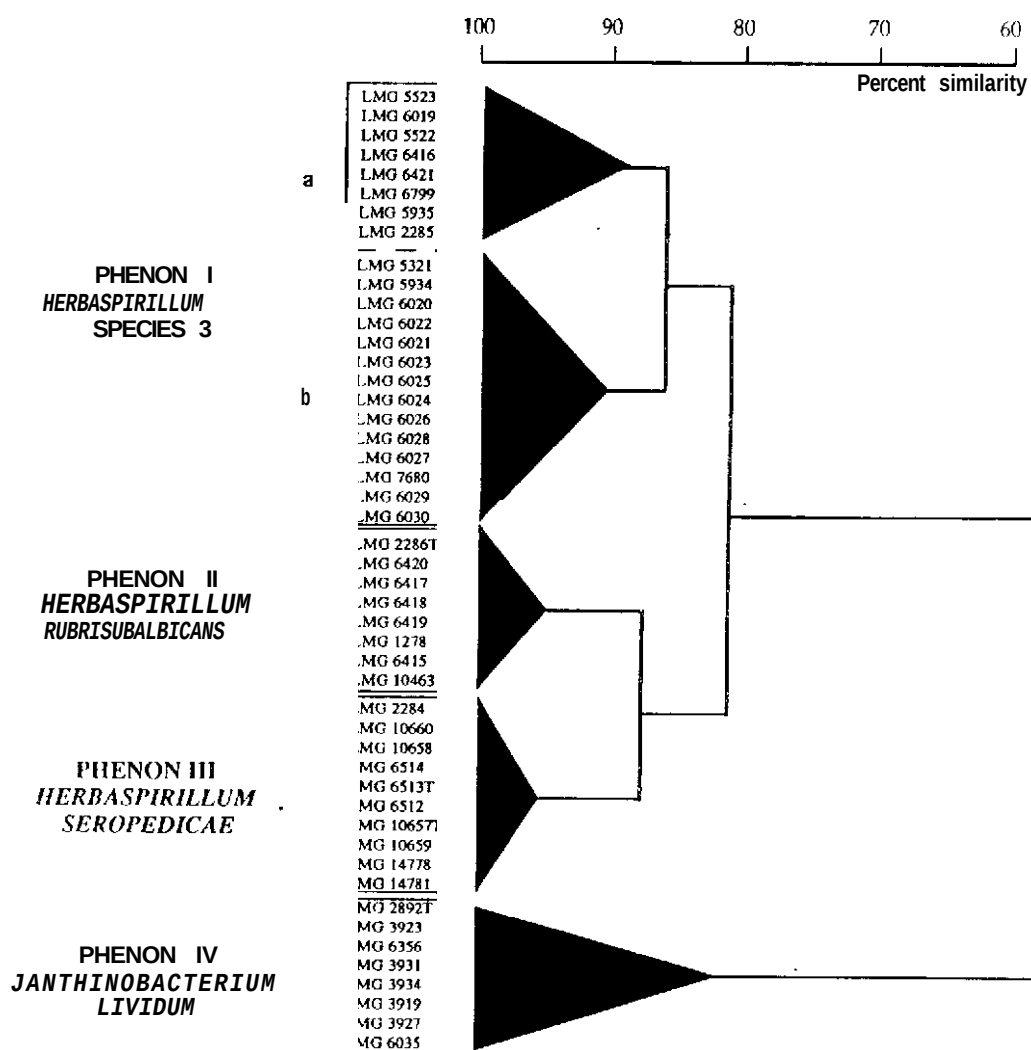


Figura 3 - Dendrograma derivado da análise do coeficiente de similaridade obtido pela comparação do resultado de 103 testes auxanográficos para estirpes pertencentes ao ramo rRNA de *Herbaspirillum*. Observar o elevado grau de similaridade entre *H. seropedicae* ("phenon III") e *H. rubrisuba/bicans* ("phenon II").

IBSBF175 e HCC103). Foi observado também o alongamento das células bacterianas em meio sólido e líquido suplementado com NH_4^+ , ou mesmo em meio semi-sólido suplementado com amônio e glucose (BALDANI et al., 1992). Tal fenômeno parece estar relacionado com a inibição da divisão celular causada por amônio (ROSZAK & COLWELL, 1987) *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* também não diferiram quanto as características de colônia em 5 meios testados.

Dentre as características bioquímicas testadas (tabela 2) não foram observadas diferenças entre as estirpes testadas. Ácido foi formado a partir de arabinose, glicose, manitol, glicerol e galactose quando a bactéria cresceu em meio semi-sólido com nitrogênio, porém fraca reação foi observada com arabinose, glucose, frutose e manitol, quando crescendo em meio isento de N e nula com glicerol. Todas as estirpes foram resistentes até 30 ppm de ácido nalidíxico (267, Z78, HRC54, M1, M4, 175, HCC1 03) reduziram azul de tetrazólio e foram hábeis em fixar N_2 atmosférico, bem como apresentaram reação positiva para catalase, oxidase e urease, sendo negativas para hidrólise de gelatina.

A capacidade de *H. rubrisubalbicans* em fixar nitrogênio foi avaliada pelo método de redução de acetileno (ARA). A estirpe padrão de *H. rubrisubalbicans* M4, isolada de cana-de-açúcar e 5 outras estirpes da espécie, cresceram em semi-sólido livre de N e mostraram atividade da nitrogenase, em taxas iguais ou maiores que aquelas obtidas para *H. seropedicae* (tabela 3).

O efeito da sacarose e da temperatura sobre a atividade da nitrogenase de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* pode ser notado na tabela 4. Os resultados evidenciam a tolerância de ambos microrganismos para crescer e fixar N_2 na presença de 10% de sacarose no meio. Esta característica também foi observada para o endófito obrigatório da cana-de-açúcar, *Acetobacter diazotrophicus* (GILLIS et al., 1989; REIS, 1991) e provavelmente é uma característica ecologicamente importante para bactérias que habitam os tecidos de plantas de cana-de-açúcar.

Tabela 2- Testes comparativos envolvendo *Herbaspirillum seropedicae* estirpes (267, Z78 e HRC54) e *H. rubrisubalbicans* estirpes (M4, IBSBF 175 e HCC103). (valores obtidos como média de três repetições).

TESTES MORFOLÓGICOS	<i>H. seropedicae</i>	<i>H. rubrisubalbicans</i>
Motilidade em placas de ágar 0,8%	+	+
Pleomorfismo na presença de NH_4Cl	+	+
Morfologia da célula bacteriana	bastões curvos	bastões curvos
Dimensões da célula crescendo em JNFb	1,5 x 0,6-0,7 μm	1,5 x 0,5-0,7 μm
Dimensões da célula no interior da planta	1,71 x 0,52 μm	2,12 x 0,45 μm
Aspecto colônia em meio batata, NFB, JNFb, 79, King B e Nutrient Broth	idênticas	idênticas
TESTES BIOQUÍMICOS	<i>H. seropedicae</i>	<i>H. rubrisubalbicans</i>
Oxidase ¹	+	+
Catalase ¹	+	+
Urease ¹	+	+
Hidrólise de gelatina ¹	-	-
Reação de Gram ¹	-	-
Redução de nitrato ¹	+	+
Produção de ácido em meio com N: manitol, glucose, arabinose, galactose e glicerol	+	+
Redução de azul de tetrazólio	+	+
Resistência a 30 ppm de ácido nalidíxico	+	+
Atividade de redução de acetileno	+	+
Incorporação de $^{15}\text{N}_2$ em NFB semi-sólido	+	+
TESTES FISIOLÓGICOS	<i>H. seropedicae</i>	<i>H. rubrisubalbicans</i>
Crescimento / fixação em meio 10% sacarose	+	+
Crescimento com N combinado a 41 °C	+	+
Fixação de nitrogênio acima de 38 °C	-	-
TESTES DE FITOPATOGENICIDADE	<i>H. seropedicae</i>	<i>H. rubrisubalbicans</i>
Estria mosqueada em cana var. SP 70-1143, CB 45-3 e NA 56-79	-	-
Sintomas em <i>Pennisetum purpureum</i>	+	+
Sintomas em <i>Zea mays</i> var. BR 400	-	-
Estria vermelha em <i>S. bicolor</i> var. BR 303	+/-	+

¹ características testadas por BALDANI et al., (1986) e CHRISTOPHER & EDGERTON (1932).

Tabela 3- Crescimento dependente de N₂ e atividade da nitrogenase de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* avaliado pela atividade de redução de acetileno (ARA) em meio NFb malato semi-sólido com 0,005% extrato de levedura ou isento de N, após 44 horas de crescimento.

Estirpe	ARA (nmoles. C ₂ H ₄ . h ⁻¹ . frasco) ^a	
	Meio sem nitrogênio	0,005% extrato de levedura
<i>H. rubrisubalbicans</i>		
M1	385	754
		967
M5	95	730
1%	426	1066
	34	90
198	266	1016
<i>H. seropedicae</i>		
		111
278	267	142
	34	

^a Média de três repetições

Com relação ao efeito da temperatura, verificamos ausência de crescimento a 38 °C e 41 °C quando sob fixação. Em meio suplementado com nitrogênio, observou-se crescimento mesmo a 41 °C (dados não mostrados), o que indica a sensibilidade da nitrogenase a temperaturas superiores a 38 °C. De acordo com os dados de atividade de redução de acetileno após 24 horas de incubação, e independente da concentração de sacarose, a temperatura ótima para crescimento de *H. seropedicae* foi de 34 °C e 30 °C para *H. rubrisubalbicans*. Tal resultado é similar ao obtidos por BALDANI et al., (1986) e HALE & WILKIE (1972a,b).

O caráter diazotrófico de estirpes de *H. rubrisubalbicans* foi confirmado através da incorporação de nitrogênio gasoso marcado (¹⁵N₂) em um experimento desenvolvido em condições de laboratório. Os resultados do ensaio confirmaram a capacidade diazotrófica do fitopatógeno "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans* (tabela 5). Com exceção dos relatos de RENNIE et al. (1982) que demonstraram a capacidade diazotrófica de *Erwinia herbicola*, baseado em

sua capacidade de crescer em meio semi-sólido e reduzir acetileno, e dos relatos de KANVIDE & SASTRY (1990) para *Agrobacterium tumefaciens* trabalhando com duas estirpes, a capacidade de fixar N_2 não tem sido demonstrada em patógenos de plantas. Este se constitui no terceiro relato na literatura de bactérias fitopatogênicas com capacidade diazotrófica, sendo o mais consistente.

Tabela 4- Efeito da sacarose e temperatura sobre a atividade da nitrogenase de *H. seropedicae* Z67 e *H. rubrisubalbicans* M4 avaliada pela atividade de redução de acetileno (ARA) em meio NFb-malato semi-sólido após 24 e 48 horas de crescimento.

Estirpe	Sacarose g . l ⁻¹)	ARA (nmoles. C ₂ H ₄ . h ⁻¹ . frasco) ^a							
		24 horas				48 horas			
		Temperatura (°C)							
		30	34	38	41	30	34	38	41
267	0	157	189	0	0	150	19	0	0
	50	36	155	0	0	126	2	0	0
	100	72	139	0	0	106	16	0	0
	150	12	1	0	0	4	2	0	0
M4	0	96	42	0	0	260	6	0	0
	50	80	30	0	0	15	12	0	0
	100	60	11	0	0	118	3	0	0
	150	2	4	0	0	16	2	0	0

^a média de duas repetições

De acordo com os resultados da tabela 5, verificou-se nos tratamentos com levedura os menores valores de % átomos de ¹⁵N em excesso. Este efeito esta relacionado ao rápido crescimento das bactérias, de modo que no momento de exposição ao gás marcado, as taxas de fixação estavam mais baixas, resultando em menor enriquecimento isotópico. As estirpes não fixadoras utilizadas como controle (M2 e M3), apresentaram enriquecimento isotópico no mínimo menor que dez vezes os valores apresentados pelas estirpes fixadoras de menor enriquecimento. Ressalta-se também que o meio semi-sólido com 20 mM

Tabela 5 - Incorporação de $^{15}\text{N}_2$ por estirpes de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* em meio JNFb semi-sólido.

Estirpes	N-total (μg)	% ^{15}N em excesso
A: Crescendo em meio semi-sólido sob condições de fixação de N_2		
<i>H. rubrisubalbicans</i>		
M1	220	0,2869
M3	0	0,0272
M4	348	0,3538
M5	425	0,4414
M6	330	0,5775
175	359	0,4769
<i>H. seropedicae</i>		
Z67	514	0,8569
Z78	518	0,6037
Z176	294	0,7779
M2	0	0,0266
B: Crescimento em meio semi-sólido com 20 mg.l^{-1} de extrato de levedura		
<i>H. rubrisubalbicans</i>		
M1	320	0,2891
M3	34	0,0255
M4	287	0,2416
M5	313	0,0626
M6	463	0,3181
175	258	0,2824
<i>H. seropedicae</i>		
Z67	408	0,3194
Z78	604	0,1741
Z176	605	0,4677
M2	47	0,0312
C: Crescimento em meio semi-sólido com 20 mM de NH_4Cl		
Z67	1742	0,085
M4	1373	0,0114

de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ inibiu completamente a síntese e atividade da nitrogenase durante o período experimental, constituindo-se em um controle eficaz.

Pela análise da tabela 6 referente a avaliação da patogenicidade de *Herbaspirillum*, concluiu-se que *H. seropedicae* estirpe Z67 foi patogênico a sorgo, caracterizado pela presença de estrias vermelhas no limbo foliar. Sintomas sobre o capim elefante caracterizaram-se como estrias branca na folha. A variedade de cana-de-açúcar B-4362, relatada como susceptível a estria mosqueada na literatura (TOKESHI, 1980) não manifestou sintomas quando inoculada com *Herbaspirillum seropedicae*. *H. rubrisubalbicans* desenvolveu sintomas idênticos em sorgo e capim elefante, diferenciando-se de *H. seropedicae* em dois aspectos, maior severidade de sintomas e patogenicidade sobre a variedade de cana-de-açúcar B-4362, já que sobre a variedade SP 70-1143 não foram observados sintomas em ambas as espécies. Os sintomas observados concordam com aqueles descritos por HALE & WILKIE (1972a,b) e TOKESHI (1980). A expressão de sintomas sobre a variedade de cana-de-açúcar B-4362 (35 a 45 dias após a germinação), quando inoculada pelo método de injeção no cartucho (EIRA, 1972) com aproximadamente 1 ml de uma suspensão bacteriana contendo 108 células por ml foi selecionada como parâmetro para diferenciação das duas espécies.

Na tabela 7 podemos observar o resultado da avaliação do uso de 21 fontes de carbono pelas estirpes Z67 e Z78 de *H. seropedicae* e estirpes M4 e 175 de *H. rubrisubalbicans*. Dentre as fontes de carbono testadas em meio semi-sólido com ou sem nitrogênio, foram selecionadas as fontes, raminose, mio-inositol, meso-eritritol (na presença de N-NH_4^+) e N-acetilglucosamina, que mostraram-se potencialmente ideais para diferenciação das espécies de *Herbaspirillum*. Estes resultados concordam com aqueles obtidos previamente por GILLIS et al., (1990), nos quais a capacidade de metabolização de diversas fontes de carbono foi avaliada em kites comerciais API.

Tabela 6 - Avaliação qualitativa da expressão dos sintomas da doença estria mosqueada (EM) em folhas de cana-de-açúcar, estria vermelha (EV) em folhas de sorgo e milho e estrias brancas (EB) em folhas de capim elefante aos 7 dias após a inoculação.

Estirpe	<i>Saccharum</i> spp. SP 70-1143 B-4362	<i>P. purpureum</i>	<i>S. bicolor</i>	<i>Z. mays</i>
<i>H. rubrisubalbicans</i>				
M4		+	+	+
M1		+	+	+
M5	nd ¹	nd	+	+
M6	nd	nd	+	+
175		+	+	+
198	nd	nd		
<i>H. seropedicae</i>				
Z67			+	+
Z78		nd	+	
Controle				

¹ não determinado

Entretanto, quando tais fontes de carbono foram testadas contra um número maior de estirpes de cada espécie, raminose e mio-inositol foram descartadas, já que apenas 54% e 57% das estirpes de *H. seropedicae*, respectivamente utilizaram esta fonte (tabela 8). Desse modo, apenas meso-eritritol e N-acetilglucosamina apresentaram resultados consistentes e foram selecionados como parâmetros diferenciadores ao nível de espécie (tabela 8). Com base nestes resultados, classificamos como *Herbaspirillum seropedicae* estirpes capazes de utilizar N-acetilglucosamina e não meso-eritritol como fonte única de carbono. De modo contrário, definimos como *H. rubrisubalbicans* aquelas que usam meso-eritritol e não N-acetilglucosamina.

As células de *H. seropedicae* estirpes (Z67, Z78, HRC54, HRC80, HCC100, isol1 e M2) e *H. rubrisubalbicans* estirpes (M4, M1, HRC51 e HCC103) foram avaliadas ao microscópio eletrônico de transmissão após contração positiva com acetato de uranila quanto a presença, número e posição de flagelos. Em *H. seropedicae*, diversos padrões de flagelação foram observados, mesmo

dentro de uma mesma estirpe, caracterizado por 1 a 3 flagelos inseridos em 1 ou 2 pólos em inserção polar (figuras 4A, 4B, 4C e 4D). Em contraste, estirpes de *H. rubrisubalbicans* apresentaram 1 a 5 flagelos inseridos em um único pólo (figuras 4E e 4F), também com variações dentro de cada estirpe, como por exemplo a estirpe HCC103, onde foram observados 1, 2 ou 4 flagelos inseridos em um pólo.

Tabela 7 - Avaliação do crescimento de quatro estirpes padrão de *Herbaspirillum* spp. sob diferentes fontes de carbono, em meio semi-sólido com e sem nitrogênio. (as avaliações constam de três repetições).

Fontes de carbono	<i>H. seropedicae</i> ⁽¹⁾		<i>H. rubrisubalbicans</i> ⁽²⁾	
	N+ ⁽³⁾	N- ⁽³⁾	N+	N-
Ácido málico	+(4)	+	+	+
Ácido cítrico	+	+	+	+
Ácido aconítico	+	+	+	+
Ácido aspártico	+	+	+	+
Ácido glicólico	-(4)			
Ácido glutárico	-	-		
Ácido maleico	nd ⁽⁴⁾	-	nd	
Glucose	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+
Xilose	+	+	+	+
Frutose	+		+	
Manose	nd		nd	
Resorcinol	nd		nd	
Suberato				
Ácido sebaico				
Raminose	+	+		
Mio-inositol	+	+		
N-acetilglucosamina	+	+		
Meso-eritritol			+	

¹ *H. seropedicae* estirpes Z67[†] e 278;

² *H. rubrisubalbicans* estirpes M4[†] e IBSBF 175;

³ Meio semi-sólido JNFb pH 6,0 suplementado com NH₄⁺(N+) ou sob FBN (N-);

⁴ + crescimento positivo em meio semi-sólido, - crescimento negativo e nd não determinado.

FIGURA 4

Figuras 4A-F: Fotomicrografias de microscopia eletrônica de transmissão (FMET) de diferentes estirpes de *Herbaspirillum* spp., após contrastação com acetato de uranila para visualização de flagelos.

Figura 4A: *H. seropedicae* estirpe M2 apresentando 1 flagelo inserido em um pólo, barra = 0,09 μm .

Figura 4B: *H. seropedicae* estirpe isol 1 apresentando 2 flagelos inserido em um pólo, barra = 0,09 μm .

Figura 4C: *H. seropedicae* estirpe HCC100 apresentando 3 flagelos e 2 flagelos inserido em dois pólos opostos, barra = 0,4 μm .

Figura 4D: *H. seropedicae* estirpe M2 apresentando 1 e 1 flagelo inserido em pólos opostos, barra = 0,4 μm .

Figura 4E: *H. rubrisubalbicans* HCC103 apresentando 1 flagelo inserido em um pólo, barra = 0,15 μm .

Figura 4F: *H. rubrisubalbicans* M4 apresentando 4 flagelos inserido em um pólo, barra = 0,04 μm .

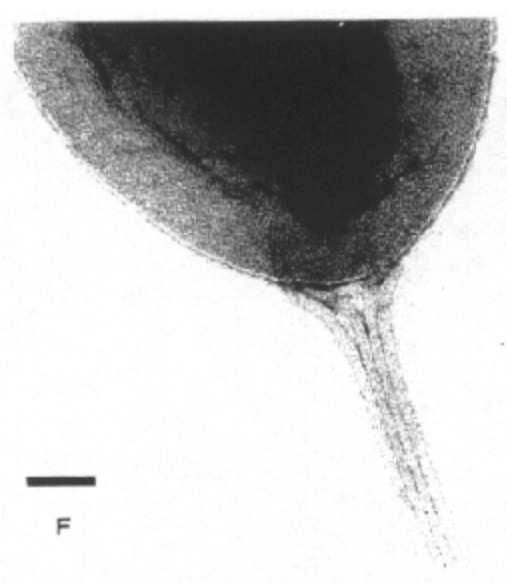
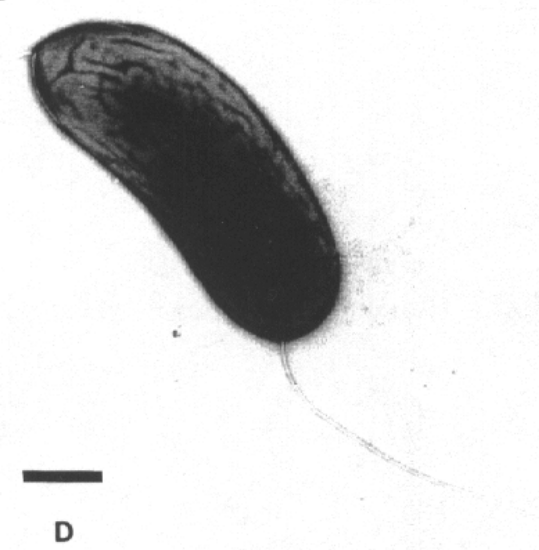
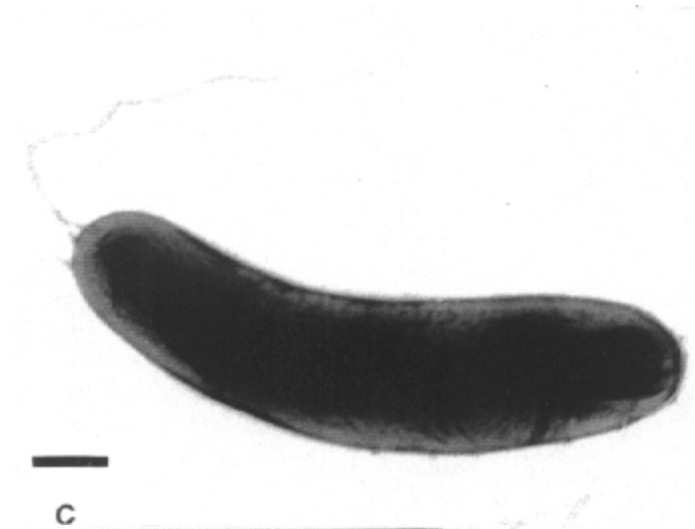
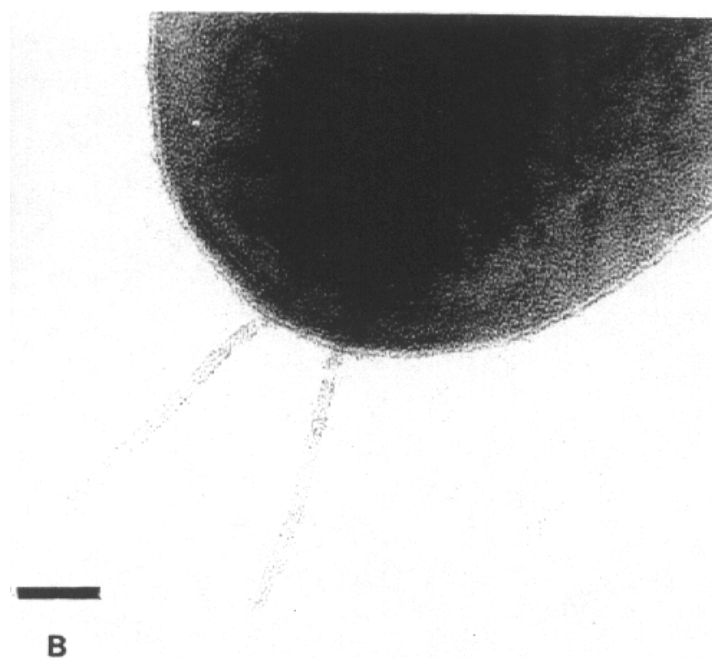
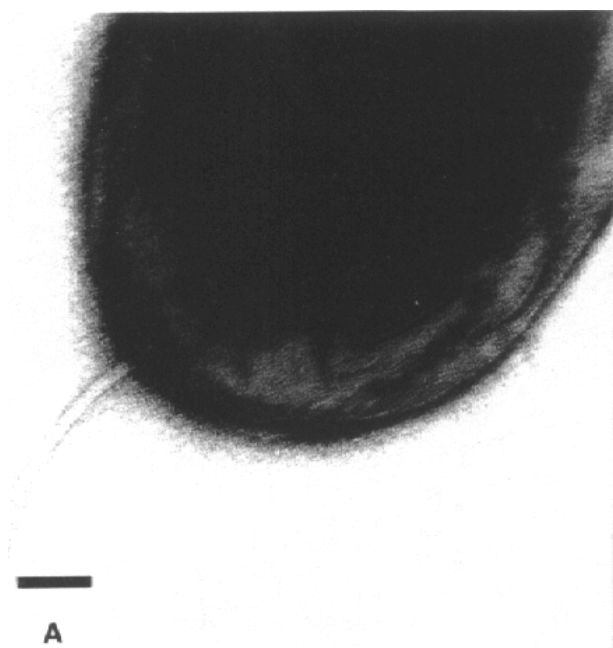


Tabela 8- Avaliação do crescimento de estirpes de *Herbaspirillum* spp. sob quatro fontes de carbono selecionadas previamente como contrastantes (os valores representam a percentagem de estirpes que utilizaram a fonte de carbono em relação ao total testado).

Fontes de carbono	<i>H. seropedicae</i> (n=20) ¹	<i>H. rubrisubalbicans</i> (n=11)
Raminose	54%	0%
Mio-inositol	57%	0 %
Meso-eritritol ²	0 %	100%
N-acetilglucosamina	100%	0 %

¹ número de estirpes testadas

² meio suplementado com NH_4^+

TESTES MOLECULARES

Sondas de oligonucleotídeos específicas para *H. seropedicae* (HS) e para *H. rubrisubalbicans* (HR), construídas a partir do sequenciamento parcial da sub-unidade ribossômica 23S rRNA na Alemanha, foram testadas em ensaios de hibridização em membrana de nylon utilizando 30 estirpes de *Herbaspirillum* spp. previamente agrupadas por homologia de DNA ou uso de fontes de carbono selecionadas como espécie-discriminadoras. A especificidade das sondas para *Herbaspirillum* foi previamente avaliada pela Dr. Gudrun Kirchhof (GSF Institute-Munich-Alemanha) utilizando o rRNA de 111 estirpes bacterianas distribuídas em 22 gêneros e 46 espécies (dados não mostrados). Na tabela 9 podemos observar os resultados da utilização das sondas de nucleotídeos HS e HR, comparados aos resultados de assimilação de meso-eritritol e N-acetilglucosamina. Observou-se uma concordância perfeita entre os dois métodos de diferenciação ao nível de espécie, de sorte que a sonda para *H. seropedicae* (HS) identificou todas as estirpes que utilizaram N-acetilglucosamina como *H. seropedicae*, enquanto que a sonda para *H. rubrisubalbicans* (HR) identificou

todas as estirpes que utilizaram meso-eritritol como *H. rubrisubalbicans*, credenciando ambos testes como ferramentas para identificação de novos isolados.

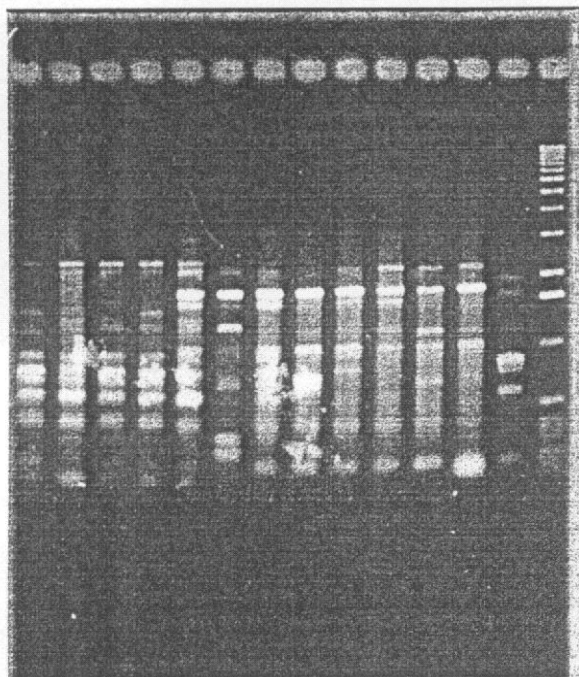
Tabela 9- Uso das fontes de carbono meso-eritritol e N-acetilglucosamina e hibridização com as sondas de oligonucleotídeos HS (*H. seropedicae*) e HR (*H. rubrisubalbicans*) por estirpes de *Herbaspirillum*.

Estirpe	Fonte de Carbono.		Hibridização com sonda	
	Meso ¹	N-acetil ²	HR	HS
<i>H. seropedicae</i>				
Z67T	-	+	-	+
Z78	-	+	-	+
Z152	-	+	-	+
HRC50	-	+	-	+
HRC54	-	+	-	+
HCC100	-	+	-	+
HCC102	-	+	-	+
HCC105	-	+	-	+
HPD5	-	+	-	+
HRL brach.	-	+	-	+
HRL digt.	-	+	-	+
HRL gord.	-	+	-	+
Sorgo RE(3)	-	+	-	+
HRC80	-	+	-	+
Isol1	-	+	-	+
SR gord.	-	+	-	+
HCC101	-	+	-	+
M2	-	+	-	+
<i>H. rubrisubalbicans</i>				
M4 ^T	+	-	+	-
HRC51	+	-	+	-
HCC103	+	-	+	-
HPD1	+	-	+	-
M1	+	-	+	-
M5	+	-	+	-
M6	+	-	+	-
IBSBF175	+	-	+	-
IBSBF198	+	-	+	-
B-4362	+	-	+	-

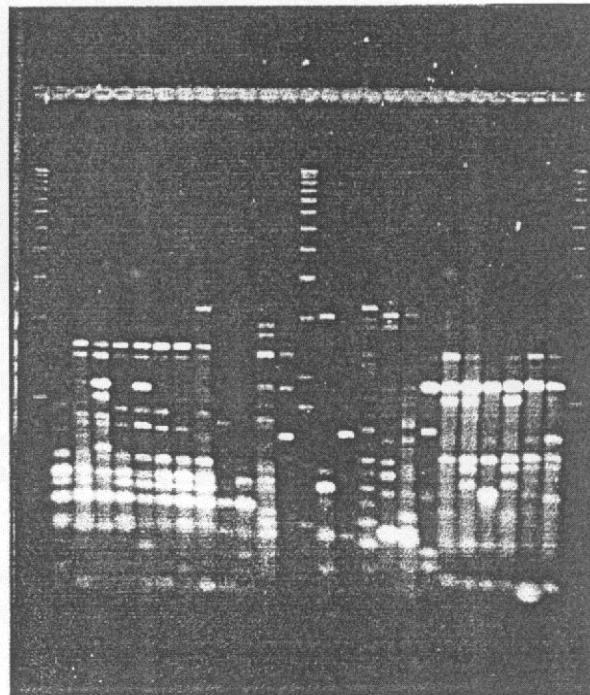
¹ Meso-eritritol em meio com amônio; ² N-acetilglucosamina em meio isento de N

Alguns isolados de *Herbaspirillum* spp. foram ainda caracterizados por meio de PCR utilizando como sequência iniciadora uma sonda de oligonucleotídeos complementar a sequências longas repetidas derivadas de mamíferos (LINEs), um método de tipagem do DNA similar ao REP-PCR (VERSALOVIC et al.,1991). Como podemos observar na figura 5A, um padrão de amplificação com muitas bandas foi obtido, gerando um polimorfismo de bandas complexo. Porém, a despeito desta complexidade, foi possível observar a existência de um perfil característico para os isolados de *H. seropedicae* testados (HRL brach, HRL gord, Z67, HCC100, HCC101 , isol1, Z78 e HRC54), com pelo menos 8 bandas conservadas. Este padrão foi facilmente distinguido daquele produzido pelas estirpes de *H. rubrisubalbicans* (M4, HCC103, 64362, M6, HRC51, M1 e IBSBF 175). Dentre os isolados de *H. rubrisubalbicans* verificou-se também um padrão de polimorfismo característico com pelo menos 5 bandas conservadas, exceto para estirpe M4, cujo padrao de amplificação apresentou problemas em função da presença menor quantidade de DNA alvo no meio de reação em relação às outras estirpes testadas, o que pode afetar os resultados obtidos (VERSALOVIC et al., 1994). Apenas pela inspeção visual do gel corado com brometo de etídio, podemos perceber que este método de avaliação do genoma gera perfis estirpe específicos, porém através de avaliação dos padrões de amplificação assistida pelo computador poderíamos obter uma estimativa relativa do grau de similaridade entre os isolados. Na figura 5B, além das estirpes já testadas, foram incluídas outras onze estirpes e avaliadas quanto ao padrão de amplificação. Dentre as estirpes de *H. seropedicae* testadas, HRC 80, Isol1, HCCIOI e SRgord geraram um polimorfismo idêntico, enquanto que os outros sete isolados incluídos no teste geraram padrões bastante distintos. Estes isolados foram classificados como *H. seropedicae* baseado em testes morfológicos e bioquímicos, devendo ser realizado uma caracterização molecular para validar ou não este método de PCR para distinção das espécies de *Herbaspirillum*.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



(A)



(B)

Figura 5 - Fotografia de gel de agarose mostrando o padrão de amplificação do DNA de 24 isolados de *Herbaspirillum*. As bandas geradas como produto da reação de PCR utilizando uma sequência repetida como “primer” coradas com brometo de etídio. Sequência do gel:

(A): 1) HRLbrach; 2) Z67; 3) HCC100; 4) Z78; 5) HRC54; 6) M4; 7) HCC103; 8) B-4362; 9) M6; 10) HRC51; 11) M1; 12) 175; 13) *A. diazotrophicus* PR2; 14) PM.

(B): 1) Marcador molecular (PM); 2) HRC80; 3) Z67; 4) HRC54; 5) 278; 6) isol1; 7) HCC101; 8) HCC100; 9) SRgord; 10) HRC80; 11) HRG05; 12) HPD05; 13)Hawaii; 14) PM; 15) Sorgo RE5; 16) isol8; 17) HRM01; 18) isol9; 19) isol6; 20) M4; 21) HRC51; 22) M6; 23) B-4362; 24) HCC103; 25) 175; 26) M1; 27) PM.

Sequências repetidas estão presentes no genoma de procariontes e eucariontes, interespaçando genes. Muitas destas regiões dispersas no genoma tem sido sequenciadas e utilizadas como sítios de ligação para geração de polimorfismo genômico, como é o caso das sequências ERIC (HULTON et al., 1991) e REP (VERSALOVIC et al., 1991). Embora estes elementos repetidos sejam originalmente descritos em bactérias entéricas Gram negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*), são conservados em muitas bactérias (VERSALOVIC et al., 1991, DE BRUIJN et al., 1992) e podem ser aplicados em ensaios de PCR, para uma gama de microrganismos. De acordo com VERSALOVIC et al., (1994), ERIC e rep-PCR são métodos com discriminação ao nível de estirpe, já que as sequências repetidas podem variar em número e com relação a distância entre as mesma no genoma, gerando fragmentos de DNA variáveis em número e tamanho. No presente estudo, o DNA de 15 isolados de *Herbaspirillum* foi utilizado para geração de polimorfismo por meio do ERIC-PCR, onde verificou-se como citado por VERSALOVIC et al., (1994) a geração de perfis característicos para cada estirpe. Entretanto, a geração de padrões bem característicos entre isolados pertencentes a *H. seropedicae* ou *H. rubrisubalbicans*, sugerem que tal método poderia ser utilizado na discriminação das espécies de *Herbaspirillum*, embora um maior número de isolados de estirpes deva ser testado.

TESTES IMUNOLÓGICOS

Na tabela 10 são apresentados os resultados obtidos pelo uso dos anticorpos policlonais SORO HRC54 (produzido contra *H. seropedicae* estirpe HRC54) e SORO HCC103 (produzido contra *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103) para identificação de estirpes de *Herbaspirillum* de posição taxonômica já definida ao nível de espécie. Como podemos perceber, os soros produzidos contra as estirpes HRC54 e HCC103 foram espécie específicos. Tais resultados estimulam a utilização destes soros em método ELISA, como ferramenta taxonômica para

definição de espécies dentro do gênero *Herbaspirillum*. Porém, ressalta-se que a estirpe HPD1, um isolado de raízes lavadas de *Digitaria insularis* classificada como *H. rubrisuba/bicans* de acordo com BALDANI et al., (1996) não foi reconhecida pelo SORO HCC103, sendo parcialmente reconhecida pelo SORO HRC54. Outro problema de detecção envolveu a estirpes M1 e M5 de *H. rubrisubalbicans* (isoladas de folhas de cana-de-açúcar), que foram fracamente reconhecidas pelo soro específico.

Tabela 10 - Uso dos anticorpos policlonais produzidos contra *H. seropedicae* HRC54 (SORO HRC54) e contra *H. rubtisubalbicans* HCC103 (SORO HCC103) (os dados foram obtidos baseados em 3 repetições).

ESTIRPE	SORO HRC 54	SORO HCC103
<i>H. seropedicae</i> Z67	+ ¹	- ²
<i>H. seropedicae</i> Z78	+	-
<i>H. seropedicae</i> Z176	+	-
<i>H. seropedicae</i> HRC 52	+	-
<i>H. seropedicae</i> HRC 54	+	-
<i>H. seropedicae</i> HRC 55	+	-
<i>H. seropedicae</i> HRC 80	+	-
<i>H. seropedicae</i> HCC 100	+	-
<i>H. seropedicae</i> HCC 102	+	-
<i>H. seropedicae</i> SR gord (3)	+	-
<i>H. seropedicae</i> RL gord (3)	+	-
<i>H. seropedicae</i> RL digit. (3)	+	-
<i>H. seropedicae</i> SR digit.(3)	+	-
<i>H. seropedicae</i> ISOL1	+	-
<i>H. rubrisubalbicans</i> M4	-	+
<i>H. rubrisubalbicans</i> 84362	-	+
<i>H. rubrisubalbicans</i> HCC103	-	+
<i>H. rubrisubalbicans</i> HRC51	-	+
<i>H. rubrisubalbicans</i> IBSBF175	-	+
<i>H. rubrisubalbicans</i> HPD1	+/- ³	-
<i>H. rubrisubalbicans</i> M5	-	+/-
<i>H. rubrisubalbicans</i> M1	-	+/-

¹ "+" significa reação positiva.

² "-" significa reação negativa.

³ "+/-" significa reação fraca, porém positiva.

A utilização de anticorpos policlonais em taxonomia bacteriana deve ser avaliada com critério, pois embora o método ELISA seja bastante rápido, fácil e permita análise de um grande número de amostras, a reprodutibilidade dos resultados é fortemente dependente da padronização de todas as etapas do método, bem como função do lote de antisoro utilizado. Um lote de soro identificado como ideal para ensaios de classificação de bactérias, deve ser preservado apenas para tal fim. A utilização de um novo lote (por exemplo: nova coleta) implica em retestes e definição de novas condições de ensaio. Os antisoros produzidos se prestaram para classificação de isolados ao nível de gênero *Herbaspirillum*, uma vez que a reação cruzada para outros gêneros foi consideravelmente baixa tendendo a nula (ver resultados do capítulo 3) e na grande maioria dos casos diferenciou isolados entre as espécies de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. Neste último caso seria sempre interessante confrontar os resultados obtidos com os testes de diferenciação de fontes de carbono e posteriormente com ferramentas de biologia molecular (BALDANI et al., 1996).

CONCLUSÕES

1. A proximidade genética entre *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* foi confirmada pela semelhança entre as estirpes testadas em diferentes ensaios fenotípicos;
2. Isolados que utilizam N-acetilglucosamina como fonte de carbono e não utilizam meso-eritritol, possuem temperatura ótima de crescimento de 34 °C apresentam de 1 a 3 flagelos inseridos em 1 ou 2 polos e não induzem sintomas da doença estria mosqueada em cana-de-açúcar var. B-4362 após a inoculação artificial foram identificados como pertencentes a espécie *Herbaspirillum seropedicae*;
3. Isolados que utilizam meso-eritritol na presença de amônio e não N-acetilglucosamina como fonte de carbono, possuem temperatura ótima de crescimento de 30 °C, apresentam de 1 a 5 flagelos inseridos em 1 polo e induzem sintomas da doença estria mosqueada em cana-de-açúcar var. B-4362 após a inoculação artificial, foram identificados como pertencentes a espécie *Herbaspirillum rubrisubalbicans*;

4. Sondas de oligonucleotídeos espécie-específicas obtidas a partir da subunidade 23S do RNA ribossômico e testadas em ensaio de hibridização em membrana de nylon, foram utilizadas com sucesso na discriminação de um grande número de isolados de *Herbaspirillum* ao nível de espécie;

5. Anticorpos policlonais produzidos contra *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* testados em ensaios imunoenzimáticos de ELISA e análise do padrão de amplificação gerado por REP-PCR se constituem em ferramentas auxiliares na discriminação de isolados de *Herbaspirillum* ao nível de espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.I.; LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143-169, 1995.
- AULING, G.; BUSSE, J.; PILZ, F.; WEBB, L.; KNEIFEL, H. & CLAUS, D. Rapid differentiation, by polyamine analysis, of *Xanthomonas* strains from phytopathogenic pseudomonads and other members of the class Proteobacteria interacting with plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, n. 2, p. 223-228, 1991.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M. & DÖBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 56, p.365, 1984.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L. & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium, **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HORSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M. & DÖBEREINER, J. Inclusion of "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, within the genus *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, p. 802-810, 1996.

- BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Seropédica, UFRRJ, 1996, 234 p. **Tese de Doutorado.**
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 869-881, 1983.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. & DÖBEREINER, J. Identification and Ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*, **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R.L. & DÖBEREINER, J. The ^{15}N isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. batatais in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 15, p. 25-32, 1983.
- BUSSE, J. & AULING, G. Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the Proteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 11, p. 1-8, 1988.
- CABALLERO-MELLADO, J. & MARTINEZ-ROMERO, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 1532-1537, 1994.
- CHRISTOPHER, W.N. & EDGERTON, C.W. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. **Journal Agricultural Research**, Queensland, v. 41, p. 259, 1932.
- COLLINS, M.D. & JONES, D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 45, p. 316-354, 1981.
- DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic element and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti*

and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 2180-2187, 1992.

EIRA, A.P. Fatores que influem na triagem das variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) ao *Fusarium moliniforme* Sheldon, agente causal do "Pokkah Boeng". F.C.M.B.B., Botucatu, Sao Paulo, 66 p, 1972, **Tese Doutor em Ciência**.

FALK, E.C.; JOHNSON, J.L.; DGBEREINER, J. & KRIEG, N.R. Deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid homology studies of genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 36, p. 80-85, 1986.

GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B. & KERSTERS, K. Taxonomic Relationships between *{P.seudomonas} rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF GROUP 1), *Herbaspirillum seropedicae* and *{Aquaspirillum} autotrophicum*. In: **International Symposium on Nitrogen Fixation with non-Legumes, 5**, 1990, Florence. Abstracts.. Florence, 1990.

GILLIS, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPEENSTEDT, R.M.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R. do S.; DGBEREINER, J. & DE LEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 39, p. 361-364, 1989.

GOOR, M.; FALSEN, E.; POT, E.; GILLIS, M.; KERSTERS, K & DE-LEY, J. Taxonomy position of the phytopathogen *Pseudomonas rubrisubalbicans* and related clinical isolates. **XIV International Congress of Microbiology**, Wanchester, England (Abstracts), 1986.

GÜNDISCH, C.; KIRCHHOF, G.; BAUR, M.; BODE, W. & HARTMANN, A. Identification of *Azospirillum* species by RFLP and pulsed-field gel electrophoresis. **Microbiological Releases**, v. 2, p. 41-45, 1993.

GURTLE, V.; WILSON, V.A. & MAYALL, B.C. Classification of medically important clostridia using restriction endonucleases site differences of PCR-

- amplified 16s rDNA. **Journal of General Microbiology**, London, v. 137, p. 2673-2679, 1991.
- HALE, C.N. & WILKIE, J.P. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum, **New Zeland Journal of Agricultural Research**, Queensland, v. 15, p. 448-456, 1972a.
- HALE, C.N. & WILKIE, J.P. Bacterial leaf stripe of sorghum in New Zealand, **New Zeland Journal of Agricultural Research**, Queensland, v. 15, p. 457-460, 1972b.
- HÖPFL, P.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. & LARSEN, N. The 23S ribossomal RNA high-order structure of *Pseudomonas cepacia* and other prokaryotes. **European Journal of Biochemistry**, v. 185, p. 355-364, 1989.
- HU, F.P.; YOUNG, J.M. & TRIGGS, C.M. Numerical analysis and determinative test for non-fluorescent plant-pathogenic *Pseudomonas* spp. and genomic analysis and reclassification of species related to *P. avenae* Manns 1909. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, p. 516-525, 1991.
- HUDSON, B.W.; QUAN, T.J. & BAILEY, R.E. Electrophoretic studies of the geographic distribution of *Yersinia pestis* protein variants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 26, n. 1, p. 1-16, 1976.
- HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F. & SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genome of *Escherichia Coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 825-834, 1991.
- JACKMAN, P.J.H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: **Chemical Methods in Bacterial Systematics** M. GOODFELLOW & D. MINNIKIN, (eds.), p. 115-129. Academic Press, Florida, 1985.
- JACKMAN, P.J.H. Microbial systematics based on eletrophoretic whole-cell protein patterns. **Methods in Microbiology**, v. 19, p. 209- 225, 1987.

- JANSSEN, P.; COOPMAN, R.; HUYS, G.; SWINGS, J.; BLEEKER, M.; VOS, P.; ZABEAU, M. & KERTERS, K. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. **Microbiology**, v. 142, p. 1881-1893, 1996.
- KANVIDE, L. & SASTRY, G.R.K. *Agrobacterium tumefaciens* is a diazotrophic bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 2087-2092, 1990.
- KERSTERS, K. & DE LEY, J. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. **Journal of General Microbiology**, London, v. 87, p. 333-342, 1975.
- KING, E.O.; WARD, M.K. & RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.
- KIRCHHOF, G. & HARTMANN, A. Development of gene probes for *Azospirillum* based on 23S-rRNA sequences. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 27-35, 1992.
- KIRCHHOF, G.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; ECKERT, B.; DÖBEREINER, J. & HARTMANN. Occurrence, physiological and molecular analysis of endophytic diazotrophic bacteria in gramineous energy plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 45-55, 1997.
- KLEMENT, Z. Rapid detection of the pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. **Nature**, London, v. 199, p. 299-300, 1963.
- KRASILNIKOV, N.A. Guide to the bacteria and actinomycetes. **Akademiia Nauk. S. S. R.**, Moscow, 830 p. 1949.
- KRIEG, N.R. Aerobic/microaerophilic motile helical/vibroid gram negative bacteria, section 2.p. 71-90. In: Krieg, N. R. and Holt, J. G. (ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol.1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.

- LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.R.; CHARNAY, M.P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.I.; RIGOTTIER-GOIS, L. & AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2029-2036, 1996.
- LANE, D.J.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D.A.; SOGIN, M.L. & PACE, N.R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. **Proceedings to the National Academy of Sciences, USA**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y. & KAHANA, Z. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd in cereal roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 358-364, 1987.
- MOREIRA, F.M.S. Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de diferentes espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de leguminosas introduzidas ou nativas da amazônia e mata atlântica. Rio de Janeiro, UFRRJ, 160 p., 1991, **Tese de Mestrado**.
- O'FARRELL, P.H. High resolution of two dimensional electrophoresis of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 4007-4021, 1975.
- OLSEN, G.J.; LANE, D.J.; GIOVANNONI, S.J. & PACE, N.R. Microbiol ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 40, p. 337-365, 1986.
- ÖELMULLER, U.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. & FRIEDRICH, C.G. Isolation of prokaryotic RNA and detection of specific mRNA with biotinylated probes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 11. p. 73-84. 1990.
- OWEN, R.J. & JACKMAN, P.J.H. The similarities between *Pseudomonas paucimobilis* and allied bacteria derived from analysis of deoxyribonucleic acids and electrophoretic protein patterns. **Journal of General Microbiology**, London, v. 128, p. 2945-2954, 1982.

- PALLERONI, N.J.; KUNISAWA, R.; CONTOPOULOU, R. & DOUDOROFF, M. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 23, n. 3, p. 333-339, 1973.
- PALLERONI, N.J. Genus I *Pseudomonas* Migula 1894, 237^{AL}, p. 141-199. In: N. R. KRIEG & J. G. HOLT (ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol I, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
- REIS, V.M. Aspectos ecológicos e fisiológicos da bactéria fixadora de N₂ *Acetobacter diazotrophicus*. Seropédica, UFRRJ, Rio de Janeiro, 1991, 119 p. **Tese de Mestrado**.
- RENNIE, R.J.; FREITAS, J.R.; RUSCHEL, A.P. & VOSE, P.B. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 28, p. 462-467, 1982.
- ROSZAK, D.B. & COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the environment. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, p. 365-379, 1987.
- SCHLOTTER, M.; ARMUS, B. & HARTMANN, A. The use of immunological methods to detect and identify bacteria in the environmental. **Biotechnology Advances**, v. 13, p. 75-90, 1995.
- SELANDER, R.K.; CAUGENT, D.A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J.M.; GILMOUR, M.N. & WHITTAM, T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 873-884, 1986.
- SMIDA, J.; LEIBHARD, S.; NICKEL, A.M.; ECKARDT-SCHUPP, F. & HIEBER, L. Application of repetitive sequence-based PCR (Inter-LINE PCR) for the analysis of genomic rearrangements and for the genome characterization on different taxonomic levels. **General Analysis**, (Biomolecular Engineering), in press.

- STACKEBRANDT, E. & LIESACK, W. Nucleic acids and classification, p. 151-194. In: M. Goodfellow and A. G. O'DONNELL (ed.), **Handbook of new bacterial systematics**, Academic Press Ltd., London, 1993.
- STACKEBRANDT, E.; LUDWIG, W. & FOX, G.E. 16S ribosomal RNA oligonucleotide cataloguing. **Methods in Microbiology**, v. 18, p. 75-107, 1985.
- STACKEBRANDT, E.; MURRAY, R.G.E. & TRUPER, H.G. (1988) Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon including the "purple bacteria and their relatives". **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 38, n. 3, p. 321-325, 1988.
- STEAD, D.E. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 42, n. 2, p. 281-295, 1992.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R. & DÖBEREINER, J. A taxonomy study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov., **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 967-980, 1978.
- TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F.; CARVALHO, P.C.T.; TOKESHI, H.; BALMER, F.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.; SALGADO, CL.; KRUGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N. & BERGAMIN, F.A. **Manual de Fitopatologia** : Doenças de plantas cultivadas, Ed. Agronômica Ceres, 2^a ed., vol.2, São Paulo, 1980.
- TRIVELIN, P.C.O.; SALATI, E. & MATSUI, E. Preparo de amostras para análise de ¹⁵N₂ por espectrometria de massa. **Boletim Técnico**, Piracicaba, nº 002, p. 1-8, 1973.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K. & SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 60, p. 407-438, 1996.

- VANNECHOUTTE, M.; ROSSAU, R.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; JANSSENS, D.; PAEPE, N.; DE ROUCK, A.; FIERIS, T.; CLAEYS, G. & KERSTERS, K. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 93, p. 227-234, 1992.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T. & LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genome. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19. p. 6823-6831, 1991.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J. & LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.
- VINCENT, J.M. A manual for practical study of the root-nodule bacteria. **Blackwell Scientific** Publication, Oxford, 1970.
- WAYNE, L.G.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; GRIMONT, P.A.D.; KANDLER, P.; KRICHEVSKY, M.I.; MOORE, L.H.; MOORE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M.P. & TRÜPER, H.G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, p. 463-464. 1987.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIC, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- XIANG, L. & HAYWARD, A.C. Bacterial whole cell protein profiles of the rRNA group II pseudomonads. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v. 77, p. 308-318, 1994.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T. & ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (PALLERONI & HOLMES, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, v. 36, p. 1251-1275. 1992.

CAPÍTULO 2

SOBREVIVÊNCIA, CRESCIMENTO, DISSEMINAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE *Herbaspirillum* spp. NO SISTEMA SOLO-PLANTA

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae foi originalmente isolado de arroz, milho e sorgo. Após sua descrição, poucos estudos foram publicados sobre *Herbaspirillum*, e muito pouco se conhecia de sua ecologia. No presente estudo, foi demonstrada a ocorrência natural de *H. seropedicae* em raízes, colmos e folhas da planta, predominantemente espécies da família das gramíneas. Em contraste, *H. rubrisubalbicans* se mostrou mais restrito quanto ao espectro de hospedeiros, ocorrendo apenas em cana-de-açúcar. Amostras de plantas daninhas das famílias *Leguminosae*, *Molluginaceae*, *Sterculiaceae*, *Cyperaceae*, *Portulacaceae*, *Compositae* e *Curcubitaceae*, foram todas negativas para a presença de *Herbaspirillum* spp. Também não foi possível isolar *Herbaspirillum* spp. de amostras de solo não vegetado das áreas de ocorrência positiva da bactéria. A baixa capacidade de *Herbaspirillum* spp. sobreviver no solo foi demonstrada pela inoculação de 10^8 células. g⁻¹ de solo, com a população bactéria atingindo níveis não detectáveis entre 3 e 4 semanas. Porém, quando sorgo foi plantado imediatamente depois da inoculação da bactéria no solo, os números de *Herbaspirillum* no solo da rizosfera declinaram dentro de 4 e 5 semanas, e os números nas raízes lavadas e esterilizadas permaneceram em torno de 10^4 células. g⁻¹ raiz durante as 9 semanas do experimento. Fato interessante resultou do reisolamento de *Herbaspirillum* spp. do solo da rizosfera e raízes de sorgo, após a introdução de sementes esterilizadas em solo mantido

sem planta por até 77 dias após a inoculação. Em estudos de avaliação da sobrevivência de *Herbaspirillum* spp. no interior de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, observou-se números em torno de 10^4 a 10^6 células g^{-1} de raízes aos 106 d.a.i. e números ao redor de 10^2 a 10^3 células g^{-1} de parte aérea aos 136 d.a.i.. Neste experimento observou-se ainda um efeito positivo e significativo ($p = 0,0037$) da inoculação com *Herbaspirillum* spp. no incremento de matéria seca da parte aérea comparada ao controle não inoculado aos 24 d.a.i., bem como um efeito negativo e significativo ($p = 0,05\%$) da aplicação de nitrogênio na acumulação de matéria seca das raízes e da parte aérea das plantas aos 12 e 24 d.a.i., o que já não ocorreu a partir dos 64 d.a.i., quando o tratamento nitrogenado passou a ser superior aos demais. Baseado nas características ecológicas de *Herbaspirillum* spp., isto é ocorrência natural no interior de raízes, colmos e folhas de plantas aparentemente saudáveis, ausência ou não detecção em solo não vegetado, associado a sua baixa persistência no solo, contrastada com o aumento de sua longevidade na presença da planta hospedeira e baseado na definição de endófitos, podemos sugerir que se estabeleça uma interação do tipo endofítica entre *Herbaspirillum* spp. e plantas da família das gramíneas.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae was originally isolated in Brazil from rhizosphere soil, washed roots and sterilized roots of maize, sorghum and rice. Since the first description of *Herbaspirillum*, few data have been published on this diazotroph, and less on its ecology. In the present study we found that *Herbaspirillum seropedicae* has been isolated from roots, stems and leaves of a large number of samples of more than 10 different species of the Gramineae family, but only exceptionally from other plants. *H. rubrisubalbicans* occurs in roots, stems and leaves of sugarcane and seems to be restricted to this crop. Inoculation of strains from both species into soil in high numbers resulted in a rapid decline in their numbers. After 3 to 4 weeks the population of *Herbaspirillum* spp. in soil decreased below detection limits (less than 100 cels. g⁻¹). When sorghum was sown in soil inoculated with both *Herbaspirillum* spp. the bacteria were detected for a much longer period in roots (64 days after inoculation) in numbers around 10⁴ cells per g of fresh weight root. When sorghum was planted in this soil, 8 weeks after no detection of the bacteria in the soil, the bacteria reappeared and multiplied within the plant tissues. In addition, an experiment in controlled conditions was carried out to evaluate the survival of *Herbaspirillum* spp. in micropropagated sugarcane plants. All the *Herbaspirillum* strains were maintained stable in the sugarcane roots in numbers around 10⁴ to 10⁶ cells per g of root, 106 days after inoculation. In contrast, a wide range of the population numbers of *Herbaspirillum* spp. in the aerial part of sugarcane was observed, with

numbers around 10^2 to 10^3 at the end of the experiment (136 d.a.i.). In the same experiment, *Herbaspirillum* spp. inoculation caused a significant positive increase of the fresh weight of aerial parts in comparison to uninoculated controls at 24 d.a.i., while nitrogen caused a deleterious effect on roots and aerial parts at 12 and 24 d.a.i. The ecological characteristics of *Herbaspirillum* spp. such as its natural occurrence inside the plant without any apparent pathogenic effect, unsuccessful isolation from uncropped soils, low persistence after soil inoculation in contrast with the highest persistence inside the plant tissue suggest an endophytic behaviour of *Herbaspirillum* spp. in association with gramineous plants.

REVISÃO DE LITERATURA

Herbaspirillum seropedicae foi descrito por BALDANI et al., (1986) como um novo gênero de bactéria fixadora de N₂ associada as raízes de cereais. Após sua caracterização, poucos estudos pertinentes a significância ecológica ou grau de associação com a planta foram realizados. Baseado em sua capacidade de crescer em meio NFb semi-sólido e associar-se as raízes de gramíneas, inicialmente foi postulado que *H. seropedicae* possuía nicho ecológico semelhante a *Azospirillum* (BALDANI et al., 1984). A proposição para a inclusão do fitopatógeno foliar "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans* no gênero *Herbaspirillum* (GILLIS et al., 1990) e a confirmação de sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico (PIMENTEL et al., 1991) motivaram o aprofundamento dos estudos ecológicos envolvendo ambas espécies deste gênero. Nos primeiros estudos, conduzidos por BALDANI et al. (1992) e OLIVARES et al. (1993b), a ausência de *Herbaspirillum* spp. em solo não vegetado, a baixa frequência de isolamento no solo da rizosfera, bem como a presença de *Herbaspirillum*, não só em raízes como também no interior de colmos e folhas de gramíneas, constituíram-se em características ecológicas distintivas entre *Herbaspirillum* e *Azospirillum*. Paralelamente, PIMENTEL et al. (1991) avaliaram a patogenicidade desses microrganismos, concluindo que estirpes virulentas de *H. rubrisubalbicans* incluindo a estirpe padrão, quando inoculadas artificialmente em variedades de cana-de-açúcar comercialmente utilizadas no Brasil, não induziram sintomas da

doença estria mosqueada. Esta enfermidade é relatada como de pouca importância econômica e segundo EDGERTON (1955), seu agente causal está disseminado por todas as regiões canavieiras do mundo. No Brasil, existe um único relato da presença dessa doença, incidindo sobre a variedade de cana-de-açúcar B-4362, em Pernambuco (TOKESHI et al., 1980). A ocorrência natural de *Herbaspirillum* no interior da planta hospedeira aparentemente sadia, bem como sua associação preferencial com gramíneas como inicialmente demonstrado por BALDANI et al. (1992) ou mesmo por ROBBS et al. (1981), que enquadraram "*P*". *rubrisubalbicans* no grupo de "*Pseudomonas graminicolas*", em função de seu espectro de hospedeiros, levaram a formulação de uma hipótese de trabalho para direcionar os estudos ecológicos: "*Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* são bactérias fixadoras de nitrogênio que desenvolveram mecanismos para habitar o interior dos tecidos de plantas de cana-de-açúcar e outras plantas da família das gramíneas, estabelecendo uma interação endofítica".

EVOLUÇÃO DO CONCEITO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

O termo endófito foi primeiramente definido por BARY (1866) citado por STONE (1986) referindo-se à flora micótica que habita o interior dos tecidos de plantas. CARROLL (1986) restringiu a definição anterior, considerando fungos endófitos apenas os colonizadores assintomáticos, ou seja aqueles que não causam danos nem benefícios, excluindo desse modo fungos fitopatogênicos e fungos simbióticos tais como os fungos micorrízicos arbusculares. PETRINI (1991) propôs uma definição mais geral, que inclui todos microrganismos que habitando a superfície da planta, fossem capazes de colonizar, pelo menos por algum período de seu ciclo de vida, os tecidos internos da planta, sem causar dano aparente ao hospedeiro. Esta definição, inclui microrganismos endofíticos que possuem uma fase epífita, e também microrganismos patogênicos latentes, que podem viver sem incitar sintomas no

seu hospedeiro por algum período em sua vida. Tratando especificamente de bactérias, KADO, (1992) definiu bactérias endofíticas como àquelas que habitam os tecidos das plantas sem causar danos ou receber benefícios, que não residência na planta. Ainda de acordo com KADO (1992), bactérias endofíticas podem passar a ser consideradas como endosimbiontes, uma vez que seja demonstrada a capacidade da bactéria em contribuir para o crescimento da planta hospedeira e em retorno, a bactéria adquira certos benefícios no nicho planta, ou seja, a endosimbiose é uma interação endofítica na qual o microrganismo esta ativo no fornecimento de nutrientes ao hospedeiro, estabelecendo-se um fluxo bidirecional entre os simbioses (KADO, 1992; QUISPEL, 1992). Neste caso o papel da bactéria no interior da planta é bem conhecido e estruturas simbióticas típicas são visíveis. Microrganismos classificados como endosimbiontes diferenciam-se de endófitos pelos benefícios mútuos da associação, no entanto as etapas que antecedem o estabelecimento dessa interface de troca podem ser definidas como uma interação endofítica. Desse modo fica claro perceber que todo endosimbionte é um endófito, mas nem todo endófito é um endosimbionte. Evolucionariamente falando, endófitos podem tornar-se endosimbiontes através de mecanismos de coevolução, o valor de uma associação interespecífica ou simbiose, pode ser medido por quanto ela aumenta ou diminui a probabilidade de sobrevivência dos associados ou simbioses. Este valor varia com a constituição genética, com ajustes ecológicos e outras condições. Desse modo, simbioses podem beneficiar-se, ser danosos ou não afetar a associação. Neste sentido, as associações simbióticas podem ser divididas em três sub-categorias, simbioses mutualísticas (endosimbiontes), simbioses comensais (endófitos) e simbioses parasitas (patógenos).

OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.

Bactérias endofíticas tem sido reconhecidas por mais de 50 anos (SCHANDERL, 1940; SANFORD, 1948; TERVET & HOLLIS, 1948). Muitos

autores, já naquela época, combatiam os conceitos rígidos de que plantas saudáveis, são plantas isentas de microrganismos dentro de seus tecidos. Um dos trabalhos pioneiros no estudo da localização de bactérias endofíticas foi realizado por COLOMBO (1978) que relatou a ocorrência de bactérias endofíticas no interior de vacúolos, próximos aos cloroplastos, presentes em talo de algas, entre os sífios e dentro dos filamentos cenocíticos, sugerindo ainda a existência de um equilíbrio fisiológico entre a bactéria e o hospedeiro. Dentro das duas últimas décadas, intensificaram-se os relatos demonstrando que plantas podem ser colonizadas por bactérias, estabelecendo relações não necessariamente parasitárias. SAMICH et al. (1963) demonstraram que fruteiras e olerícolas são hospedeiras de bactérias endofíticas. JACOBS et al. (1985) trabalhando com técnicas de imunomarcagem com ferretina e utilizando microscopia eletrônica de varredura, enumeraram, localizaram e caracterizaram bactérias endofíticas associadas às raízes de beterraba (*Beta vulgaris* L.). Dentre os isolados mais frequentemente encontrados estavam *Bacillus subtilis*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Corynebacterium* sp., *Lactobacillus* sp. e *Xanthomonas* sp., que se distribuíram nos tecidos da planta não uniformemente. Grande número de bactérias foi observada nas zonas de emergência de raízes laterais, colonizando os vacúolos de células do parênquima cortical e elementos do xilema. Já nos tecidos mais internos das raízes de beterraba um número menor e maior estabilidade populacional bacteriana foi observada, porém muitas das bactérias habitavam as células intracelularmente. JACOBS et al., (1985) ainda discute que apesar de grande número de bactérias colonizar esta região, não foram observados danos aparentes aos tecidos da planta hospedeira. MISAGHI & DOMNDELINGER (1990) trabalhando com plantas de algodoeiro crescidas em casa de vegetação e em condições de campo, isolaram *Erwinia* sp., *Bacillus* spp., *Clavibacter* sp. e *Xanthomonas* sp. de raízes esterilizadas superficialmente, caules e botões florais. McINROY & KLOEPPER (1991) mostraram que a população de bactérias endofíticas em colmos de milho

variou inicialmente de 1×10^{10} para 1×10^3 bactérias por grama de colmo, depois de 10 semanas. FISHER et al. (1992), trabalhando também com a cultura do milho, isolaram de amostras de colmo, *Pseudomonas fluorescens*, *P. marginalis*, *P. corrugata*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella terrigena*, *Vibrio* sp, e observaram uma maior densidade de bactérias em amostras de colmos basais quando comparadas a amostras de colmo próximas do topo da planta.

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS: PERSPECTIVAS DE USO NA AGRICULTURA

A despeito da grande quantidade de relatos de ocorrência de comunidades endofíticas em tecidos vegetais saudáveis, ainda muito pouco se conhece sobre o papel da microflora endofítica nos tecidos da planta hospedeira. A expansão das pesquisas nesta área é em parte justificada pela necessidade atual de busca de tecnologias alternativas para o incremento da produtividade e proteção vegetal, e em parte pela mudança gradual de mentalidade dos cientistas trabalhando em fitopatologia, de que plantas saudáveis, seriam plantas isentas de microrganismo em seu interior. Hoje, é bem evidente que um grande número de bactérias encontram-se comumente associadas com plantas. Estas incluem, não só patógenos, mas também bactérias que existem como epífitas, ectosimbiontes, endófitos e endosimbiontes. Cada uma destas classes de bactérias tem evoluído para sobreviver melhor dentro ou sobre a superfície da planta.

MISAGHI & DONDELINGER (1990) especularam que bactérias endofíticas desenvolveram, ao longo do período de coevolução com a planta hospedeira, uma relação íntima e podem influenciar a fisiologia da planta de uma forma não elucidada. Alguns autores sugerem que a presença dessa microflora endofítica natural seria preponderante na regulação da população de patógenos. Qualquer estímulo externo que venha a reduzir ou eliminar essa microflora endofítica, resultará no aumento da população do patógeno, e

consequente aumento da possibilidade de doença na planta (SAMISH et al., 1963).

Uma linha muito promissora para aplicação de bactérias endofíticas se encerra no biocontrole de fitomoléstias. Nos últimos anos resultados encorajadores tem sido obtidos, principalmente no controle de fitopatógenos do solo (WEI et al., 1991; BROOKS et al., 1994; CHEN et al., 1995). O fato das bactérias endofíticas colonizarem o interior da planta, competindo pelos mesmos sítios de colonização do patógeno, sem incitar sintomas aparentes, aliado ao menor impacto de estresses ambientais no interior da planta quando comparada a rizosfera e ao filoplano, torna a aplicação de endófitos como agentes de biocontrole extremamente vantajosa. BROOKS et al. (1994) isolaram 889 bactérias endofíticas de mudas de carvalho (*Quercus fusiformis*) no Texas, e a partir de ensaios "in vitro" selecionaram 183 estirpes antagônicas ao agente causal da murcha, *Ceratocystis fagacearum*. Seis isolados incluindo espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* foram avaliados em condições de campo, verificando-se uma redução de até 50% de plantas doentes. Recentemente, CHEN et al. (1995) avaliaram 170 isolados bacterianos oriundos dos tecidos internos de algodão quanto ao potencial de uso no controle da murcha de fusarium do algodão (*Fusarium oxysporum* fsp. *vasinfectum*). Seis bactérias endofíticas selecionadas reduziram significativamente a expressão de sintomas em casa de vegetação, as quais foram identificadas como, *Aureobacterium anophage*, *Bacillus pumilus*, *Phyllobacterium rubiacearum*, *Pseudomonas putida* (2) e *Burkholderia solanacearum*.

Os mecanismos envolvidos no controle de fitopatógenos por bactérias endofíticas são aqueles amplamente conhecidos em programas de proteção de plantas utilizando rizobactérias promotoras do crescimento (RBPC). Entretanto, no caso das RBPC, a atividade de biocontrole é baseada na redução do crescimento saprofítico do patógeno através da produção de ácido ciânico, antibióticos e sideróforos, dentre outros metabólitos secundários, de preferência

próximo aos sítios de infecção do patógeno, atuando porém ao nível de rizosfera e rizoplane (AHL et al., 1986; HAYWARD, 1989; SCHIPPERS, 1992; LEMANCEAU & ALABOUVETTE, 1993). Isto é diferente de bactérias endofíticas, onde a ação se processa no interior da planta.

Pesquisas mais recentes tem demonstrado que rizobactérias e bactérias endofíticas podem também reduzir indiretamente o ataque do patógeno pela indução de resistência ao patógeno sistêmica ou localizada (ALSTRÖM, 1991; VAN PEER et al., 1991; WEI et al., 1991; TUZUN & KLOEPPER, 1994; LEMANCEAU & ALABOUVETTE, 1993). Geralmente, a indução de resistência sistêmica (IRS) em plantas é um mecanismo de defesa caracterizado pelo aumento dos níveis de resistência após a infecção com um fitopatógeno, tendo sido demonstrado que a manifestação do estado de resistência é dependente da acumulação de um composto sinal, o ácido salicílico, que elicia a ativação de genes envolvidos na síntese de proteínas PR ("pathogenesis-related proteins"). Embora pouco estudado, pressupõe-se que RBPC e fitopatogênicos induziriam resistência por mecanismos moleculares idênticos. Entretanto, HOTFFLAND et al., (1995) trabalhando com plantas de rabanete com resistência induzida pelo tratamento com *P. fluorescens* estirpe WCS417r contra *Fusarium oxysporum* não observaram acumulação de proteínas PR. Desse modo, incertezas foram levantadas quanto a existência de uma via comum de indução de resistência mediada por RBPC e bactérias fitopatogênicas. Recentemente, PIETERSE et al. (1996) investigando as bases moleculares da resistência induzida pela inoculação de plantas com rizobactérias não fitopatogênicas, verificaram que a resistência induzida, neste caso é independente da acumulação de ácido salicílico e a expressão de proteínas PR. Neste estudo os autores trabalharam com plantas de arábida inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* como indutor de resistência e os fitopatógenos *Fusarium oxysporum* ssp. *raphani* e *Pseudomonas syringae*, que resultou em redução significativa de sintomas na planta hospedeira. Além do mais, plantas de arábida incapazes de acumular

ácido salicílico (transgênicas) e selvagens, foram igualmente responsivas a IRS por *P. fluorescens*, bem como não foi observado incremento da síntese de RNA mensageiro responsável pela transdução das PR proteínas. Disto concluiu-se que as vias que levaram a indução de resistência sistêmica em plantas inoculadas com rizobactérias promotoras de crescimento diferiram daquelas clássicas induzidas por fitopatógenos.

É importante destacar que a distinção entre rizobactérias e bactérias endofíticas se baseia na barreira limitrofe estreita que é o rizoplasma. Na prática, para Caracterização do habitat predominante da bactéria, cada isolado deve ser testado quanto sua capacidade de reconhecer e invadir determinada planta hospedeira. VAN PEER et al. (1990) sugeriram o possível envolvimento de lipopolissacarídeos (LPS) como determinantes na habilidade de *Pseudomonas* fluorescentes colonizarem o interior das raízes, após compararem o padrão de LPS de diversos isolados de *Pseudomonas* oriundos da superfície ou do interior das raízes. DUIJFF, et al. (1997) comparando a colonização de raízes de tomate por *P. fluorescens* estirpe WCS417r e sua mutante faltando a cadeia lateral O-antígeno (OA-) da fração de lipopolissacarídeos (LPS), verificaram que a bactéria selvagem colonizou o interior das raízes em maior número e frequência, quando comparada a estirpe mutante, sendo o número na rizosfera semelhante. Curiosamente, em trabalhos anteriores, VAN PEER & SCHIPPERS (1992) e DUIJFF et al. (1996) demonstraram que esta estirpe WCS417r foi capaz de induzir resistência sistêmica contra os agentes da murcha fusariana, respectivamente de craveiro e tomateiro. No trabalho de DUIJFF, et al. (1997), foi observado o espessamento da parede celular das células do córtex, em reação a colonização das células da epiderme e hipoderme e metaxilemas celulares pela bactéria, a qual pode estar relacionada com a indução de resistência. É interessante ressaltar que, embora a estirpe selvagem e a mutante tenham eliciado o espessamento localizado da parede celular, a estirpe mutante por colonizar com menor número e frequência o interior da raiz, consequentemente

induziu o espessamento de parede em menor grau e frequência e eliciando uma resistência sistêmica mais fraca. Tomados juntos, estes resultados indicam o envolvimento de terminações da fração LPS na colonização endofítica de raízes de tomate por *P. fluorescens* estirpe WCS417r, sugerindo ainda que o maior ou menor grau de indução de resistência a murcha fusariana esta relacionada com a extensão da colonização dos tecidos internos das raízes, ou seja, com a capacidade de estabelecimento endofítico.

Além de atuarem como agentes no controle de fitopatógenos, bactérias endofíticas podem influenciar positivamente no metabolismo da planta hospedeira, promovendo o crescimento da planta através da produção de hormônios e outros metabólitos, ou no caso de bactérias diazotróficas nutrir a planta com nitrogênio fixado. O exemplo mais marcante de contribuição para nutrição nitrogenada por uma bactéria endofítica vem da simbiose entre rizóbio e leguminosas. Entretanto, cabe ressaltar que, pela definição de KADO (1992) o rizóbio só seria considerado um endófito no intervalo de tempo entre o processo inicial de infecção na planta e o início da atividade da enzima nitrogenase. Uma vez estabelecida a interface bidirecional de troca entre a planta e a bactéria, rizóbio por definição deixa de ser um endófito, sendo designado endosimbionte (KADO, 1992; QUISPEL, 1988). Da mesma forma, com os avanços nos estudos de inter-relação bactéria e planta, outras bactérias endofíticas podem ser “promovidas” a endosimbiontes. Raciocínio análogo, pode ser aplicado a bactérias consideradas endofíticas quando associadas a um genótipo da planta e patogênicas quando a outro, ou mesmo no caso de infecções latentes, onde patógenos habitam endofiticamente a planta por longos períodos, só expressando sintomas visíveis em função de estresses no hospedeiro. Estas possibilidades vem a demonstrar o quão tênue é o limiar entre o que consideramos relações parasitárias, neutras e simbióticas como discutido por OLIVARES et al. (1997) e JAMES et al. (1997).

A introdução do termo endófito na linha de pesquisa com bactérias diazotróficas associativas foi proposto por DÖBEREINER (1992). Nos últimos anos, uma série de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a gramíneas tem sido descrita como tipicamente endofíticas, baseada principalmente na sua ocorrência natural no interior de raízes e na parte aérea de plantas, bem como na baixa capacidade de sobrevivência no solo (REIS, 1991; BALDANI et al., 1992; OLIVARES et al., 1993b; BALDANI, 1996). No entanto, a descrição de novas bactérias e os avanços contínuos no conhecimento dos aspectos ecológicos, anatômicos e fisiológicos dessas interações endofíticas, tornou restritivo e falho o conceito de endófito como uma bactéria que habita o interior da planta, mas não sobrevive no solo. Basta citar o exemplo de algumas espécies do gênero *Azospirillum*, que anteriormente caracterizadas como bactérias tipicamente rizosféricas, e a despeito de sua boa sobrevivência no solo, tem sido encontradas no interior de raízes e parte aérea de plantas, podendo portanto ser classificadas também como endofíticas. Diante do exposto, a proposição de BALDANI et al. (1996), dividindo as bactérias diazotróficas de acordo com o habitat predominante em endofíticas obrigatorias, endofíticas facultativas e rizosféricas, parece bastante oportuna. Porém, associadas a uma análise crítica entre pesquisadores na área, uma série de parâmetros devem ser investigados e descritos para uma classificação mais precisa das bactérias quanto a seu habitat predominante.

As altas contribuições da fixação biológica de nitrogênio para alguns genótipos de cana-de-açúcar estimadas pelos métodos de balanço de N total e diluição isotópica de ^{15}N (LIMA et al., 1987; URQUIAGA et al., 1992) não poderiam ser explicadas apenas pela atividade de bactérias diazotróficas associadas à rizosfera das plantas, onde a alta competição com a microflora do solo por exsudados radiculares, associada aos estresses inerentes do meio limitariam a atividade diazotrófica. Nesse sentido, o interior da planta seria um habitat mais estável e protegido, onde atividades como biocontrole e indução de resistência a

fitopatógenos poderiam ser mais efetivas (discutidos acima) e haveria maior possibilidade da bactéria influenciar no metabolismo e crescimento da planta, tendo em vista o íntimo contato entre as células da planta e da bactéria. Neste contexto, tendo em vista a maior oferta de substrato, maior estabilidade ambiental, associadas a pressuposição de existência de sítios de baixa pressão de oxigênio e concentração de nitrogênio, bem como a uma interface de troca eficiente, constituiriam-se nas condições ideais para atividade fixação biológica de nitrogênio por diazotróficos colonizando o interior das plantas. (DÖBEREINER et al., 1993).

A primeira bactéria diazotrófica caracterizada como endofítica foi *Acetobacter diazotrophicus*. Esta foi isolada de cana-de-açúcar usando um meio semi-sólido com caldo de cana (CAVALCANTE e DÖBEREINER, 1988). *A. diazotrophicus* é bem adaptada as condições prevalentes no interior das raízes e colmos. A bactéria cresce melhor com 10% de sacarose no meio e pH na faixa ácida, excretando nestas condições, metade do nitrogênio fixado (COJHO et al., 1992). Esta bactéria tem sido encontrada naturalmente dentro de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar em áreas do Brasil, Uruguai, Austrália e México (LI e MACRAE, 1991; FUENTES-RAMIREZ et al., 1993), porém não tem sido encontrada em outras plantas ou no solo (REIS et al., 1994), sobrevivendo por menos de 1 semana após sua introdução em solo natural e esterilizado (CARUSO & BALDANI, 1995). Mais recentemente, outras bactérias diazotróficas tem sido caracterizadas como sendo predominantemente endofíticas tais como *Herbaspirillum seropedicae* em associação com gramíneas e *H. rubrisubalbicans* especificamente com cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1996), *Azoarcus indígena* em associação com as raízes de “Kallar grass” (*Leptochloa fusca*), o qual invade endofiticamente também plantas de arroz, colonizando a planta inteira (REINHOLD-HUREK et al., 1993, HUREK et al., 1994), bem como *Burkholderia* sp., a qual coloniza endofiticamente cana-de-açúcar, mandioca e arroz (BALDANI et al., 1996).

Além das possibilidades de uso de endófitos acima discutidas, tem se tornado cada vez maior o interesse de cientistas na utilização de bactérias endofíticas no campo da biotecnologia vegetal, em aplicações que envolvem o seu uso como vetor para transformações genéticas na planta (URATANI et al., 1995) ou bactérias endofíticas transgênicas (TESTER, 1992). FAHEY (1988) aborda diversas vantagens no uso de vetores endofíticos para controle de pragas e doenças comparadas ao uso de pesticidas, destacando vantagens econômicas como a questão da inoculação única da bactéria, dosagens pequenas e potência sustentada; vantagens ambientais como atividade contida ao interior da planta e a dependência da planta para sobreviver, que limita a atividade do produto excretado pelo endófito ao interior da planta; e vantagens tecnológicas como desenvolvimento e comercialização do produto rápidas, ampla aplicabilidade em variedades comerciais da cultura, bem como reduzido impacto na fisiologia da planta hospedeira (comparado a transformações genéticas na planta que podem reduzir substancialmente o rendimento da cultura) e por fim a necessidade de repetidas ao agricultor no caso de culturas propagadas por semente. O primeiro trabalho utilizando bactérias endofíticas transgênicas foi conduzido por FAHEY (1988). Neste caso, o endófito *Clavibacter xily* subsp. *cynodontis* foi modificado geneticamente para a produção da delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* visando o controle da broca do colmo do milho. Dentre desta linha de controle de pragas, SKOT (1990) utilizou estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* transgênicas para a produção da delta-endotoxina de *B. thuringiensis* oriunda do gene Cry IIIA (ativo contra Coleoptéros), para controle de *Sitona* spp., um coleóptero, cujas larvas predam nódulos. A mesma estratégia foi adotada por TEIXEIRA (1993) para controle de larvas de *Cerotoma* sp. em nódulos de feijão. Recentemente, SALLES et al. (1995) obtiveram transconjugantes das bactérias endofíticas *Acetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum seropedicae* com a capacidade de produzir constitutivamente a endotoxina de *B. thuringiensis* visando o controle de pragas da cana-de-açúcar.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo investigar aspectos da biologia de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* no meio natural, tais como a sobrevivência no solo e na planta, o crescimento, a disseminação e a distribuição ecológica.

MATERIAL E MÉTODOS

EXPERIMENTO 1 - OCORRÊNCIA NATURAL DE *Herbaspirillum seropedicae* E *H. rubrisubalbicans* NO SOLO E EM PLANTAS.

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS:

O meio utilizado para isolamento e contagem de *Herbaspirillum* spp. foi o meio JNFb semi-sólido pH 5,8 isento de nitrogênio, segundo procedimento descrito por BALDANI et al. (1992) e OLIVARES et al. (1996). A bactéria foi reconhecida por sua morfologia em bastões curvos pequenos ao microscópio ótico de contraste de fase, formação de colônias pequenas, bordo liso, com centro azul em placas de NFb malato com 3 vezes a concentração de azul de bromotimol (OLIVARES et al., 1996) e sua capacidade de crescer formando uma película aerotóxica em meio JNFb semi-sólido isento de N.

PLANTAS:

O material vegetal utilizado nos estudos de ocorrência foi obtido na grande maioria das vezes de áreas continuamente cultivados com gramíneas, localizado no campo experimental do CNPAB (áreas 1 e 2, Tabela 1). O material de planta foi abundantemente lavado em água corrente e separado em raízes, colmos e folhas. A seguir, 10 g de cada parte foi triturada, diluída até 10^6 e inoculada em frascos de vidro contendo meio JNFb semi-sólido (BALDANI et

al., 1992). As avaliações dos crescimentos ocorreram 5 a 7 dias após a inoculação. Foram colhidas 5 plantas por espécie. Um segundo levantamento teve como objetivo investigar a ocorrência de *Herbaspirillum* spp. associado a diversas variedades de cana-de-açúcar oriundas de importantes regiões canavieiras do Brasil (áreas 3, 4 e 5), seguindo a mesma metodologia adotada acima.

TABELA 1 - Histórico das áreas destinadas a coleta de amostra de plantas, visando o isolamento de *Herbaspirillum* spp.

ÁREA 1	Área canavieira por 6 anos, recentemente queimada e possuindo uma soqueira de cana com 80 d.a.g.
ÁREA 2	Área submetida a rotação de culturas por 13 anos consecutivos, cultivada com feijão guandu (20 d.a.e.) em sucessão a cultura do milho.
ÁREA 3	Área do banco de germoplasma da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa - Minas Gerais), plantado com cana-de-açúcar por 40 anos, primeira soca após renovação do canavial (termoterapia e altas doses de nitrogênio).
ÁREA 4	Região plantada com cana por 13 anos consecutivos, Fazenda-Quissama, Campos-R.I.
ÁREA 5	Coopersucar (Piracicaba -SP) e Universidade Federal de São Carlos (Campus-Araras-SP)

A presença natural de *Herbaspirillum* spp. em cana-de-açúcar foi ainda avaliada em plântulas oriundas de cultivo de meristemas (micropropagação), mantidas sob condições estéreis. Para tal 35 amostras de 4 variedades de cana-de-açúcar (SP 81-9025, RB 85-5065, RB 80-6043 e IAC 82-2045) gentilmente cedidas pelo Dr. T.S.G. Lee (Universidade de São Carlos) e 33 amostras de 11 variedades de cana-de-açúcar (SP 70-1143, CB 45-3, NA 5679, CB 4776, B-4362 e SP 79-1011) cedidas pela COOPERSUCAR (Piracicaba-SP) foram processadas de acordo com metodologia descrita acima.

SOLO:

De todas as regiões amostradas, foram colhidas amostras de solo dos primeiros 10 cm superficiais. As amostras foram trazidas ao laboratório e peneiradas em malha de 2 mm. A partir deste material tomou-se 10 gramas, diluiu-se em 90 ml de solução salina contendo 1/4 dos sais do meio NFb obtendo-se diluições seriadas até 10^{-4} , procedendo-se de maneira similar a descrita para as plantas.

CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS AO NÍVEL DE ESPÉCIE:

Os isolados de *Herbaspirillum* obtidos de diversas plantas foram classificados ao nível de espécie, baseado no uso das fontes de carbono meso-eritritol e N-acetilglucosamina segundo proposto por OLIVARES et al. (1993a).

EXPERIMENTO 2- SOBREVIVÊNCIA DE *Herbaspirillum* NO SOLO.

BACTÉRIA

As bactérias utilizadas no ensaio foram crescidas em meio líquido Caldo Nutriente suplementado com 10 g.l^{-1} de glicerol por um período de 36 horas a 30°C . Posteriormente, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 2000 g, ressuspendida em solução salina e ajustadas para uma densidade ótica ($\text{D.O.}=0,65$), utilizando um colorímetro ausJena ajustado para $\lambda = 610 \text{ nm}$. Foram utilizadas, *H. seropedicae* estirpe Z67 e *H. rubrisubalbicans* estirpe M4, ambas naturalmente resistentes a 30 ppm de ácido nalidixíco.

SOLO

Os solos utilizados no presente ensaio foram extraídos dos primeiros 20 cm de profundidade, seu histórico e análise química são fornecidos a seguir:

TABELA 2 - Histórico dos solos utilizados no ensaio de sobrevivência. solo sob cultiv o contínuo com cana (Solo Cana), e solo podzólico vermelho amarelo (Solo PVd).

SOLO	ORIGEM E DESCRIÇÃO
Solo 1 - Pvd	Campo experimental do CNPAB, Podzólico Vermelho Amarelo distrófico.
Solo 2 - Cana	Fazenda Quissamã, Quissama-RJ, cultivado por 13 anos com cana-de-açúcar, classificado como Planossolo.

TABELA 3 - Análise Química dos solos utilizados no ensaio de sobrevivência.

SOLOS	TEXTURA	pH(H ₂ O)	Al meq/100g	Ca+Mg meq/100g	P	K
Solo 1 - PVd	média	4,9	0,5	1,7	2,4	51
Solo 2 - Cana	arenosa	4,7	0,7	1,9	0,0	52

Os solos foram secos, peneirados em tamis de 2 mm e acondicionados em copos plásticos contendo 10 g

INOCULAÇÃO E AVALIAÇÕES

Foi inoculado 1 ml da suspensão bacteriana em 10 g de solo, utilizando-se uma pipeta automática. O solo a partir do momento de inoculação foi mantido a 60 % da capacidade de campo, sendo incubado a 30 °C. Os períodos de amostragem constaram de: tempo zero (1 h após a inoculação), 1, 3, 4, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 21 e 25 dias após a inoculação. As amostragens foram feitas através da coleta de um copinho por tratamento (10 g), diluição em 90 ml de solução salina (1/4 dos sais do meio NFB), seguido de agitação da suspensão contendo o solo a 200 rpm por 30 minutos e posterior diluição seriada para contagem. As contagens de bactérias no solo ocorreram 7 dias após a inoculação de 0,1 ml das diluições seriadas dos solos em meio JNFb semi-sólido (BALDANI et al., 1992) com e sem ácido nalídixico. O número mais provável de bactérias (NMP) foi estimado pela formação de película típica no meio JNFb usando a

tabela de McCrady (POCHON & TARDIEUX, 1962). Os controles constaram de solo não inoculado (solo testemunha), mantido dentro das mesmas condições de temperatura e umidade, além da inoculação de uma estirpe da *Azospirillum brasilense* (109) resistente a 100 ppm de streptomomicina. Os dados obtidos sofreram transformação logarítmica para plotagem no gráfico.

EXPERIMENTO 3- SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE *Herbaspirillum spp.* NA RIZOSFERA E NAS RAÍZES DA PLANTA HOSPEDEIRA.

BACTÉRIAS

Foram utilizadas três estirpes, *H. seropedicae* estirpe Z67, *H. rubrisubalbicans* estirpe M4 e uma estirpe recentemente isolada de raízes esterilizadas de sorgo (Hsorgo) como controle. As estirpes foram crescidas nas mesmas condições que as descritas no experimento 2. Em seguida foram centrifugadas a 1000 g por 20 minutos, ressuspendidas em solução salina (114 sais do meio NFb) e ajustadas para uma densidade ótica de 0,65 lidas a $\lambda = 610\text{nm}$ em um colorímetro Ausjena.

PLANTAS

Sementes de sorgo variedade BR 005 (*Sorghum bicolor*) secas ao sol por 48 horas, foram tratadas termicamente a 65 °C por um período de 2 horas visando eliminar parte dos microrganismos superficialmente e internamente associados aos tecidos da semente. Antes do plantio, as sementes foram lavadas duas vezes em água estéril por um período de 5 minutos, álcool etílico 70% por 30 segundos, bicloreto de mercúrio 1:500 por 1 minuto e três vezes em água estéril por 10 minutos. Duzentas sementes que sofreram o tratamento térmico e desinfestação química, foram avaliadas quanto a presença de bactérias diazotróficas em meio NFb semi-sólido isento de nitrogênio (TARRAND et al., 1978) e a presença de microrganismos gerais em placas contendo meio.

TRATAMENTOS, INOCULAÇÃO E AVALIAÇÕES:

Potes plásticos contendo 300 gramas de solo PVd (composição química descrita no experimento 2) foram semeados com 5 sementes por pote e em seguida foram inoculados 2 ml da suspensão bacteriana por semente, totalizando 10 ml da suspensão por pote. Após a germinação, foram deixadas 3 plantas por pote. Os tratamentos constaram das estirpes inoculadas no solo na ausência da planta, solo mantido com planta desde o início da inoculação com as bactérias e plantas introduzidas no solo após a queda da população bacteriana (após três e nove semanas). As avaliações ocorreram aos 0, 7, 14, 21, 28, 56, 64, 90 e 101 dias após a inoculação e constaram da contagem das bactérias no solo, solo da rizosfera e em raízes lavadas e esterilizadas, utilizando para tal, o meio JNFb semi-sólido suplementado com 30 ppm de ácido nalídixico e o método do NMP como descrito no experimento 2. As bactérias foram extraídas por agitação do solo com água estéril por 30 minutos a 200 rpm. Paralelamente foram feitas contagens de bactérias totais em raízes lavadas e esterilizadas em placas contendo os meios batata-ágar e JNFb sólidos com ou sem ácido nalídixico (30 ppm). Os controles constaram de solo e plantas não inoculados. Os resultados apresentados representam média de três repetições.

EXPERIMENTO 4: SOBREVIVÊNCIA DE *Herbaspirillum* NO INTERIOR DA PLANTA E RESPOSTA A INOCULAÇÃO.

BACTÉRIA, PLANTA E MONTAGEM DO EXPERIMENTO:

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com 7 tratamentos, 6 épocas de coleta (12, 24, 42, 64, 106 e 136 dias após a inoculação) e 3 repetições. Os tratamentos constaram de duas estirpes de *H. seropedicae* (267 e HRC 54) duas estirpes de *H. rubrisubalbicans* (M4 e HCC103), uma estirpe de *H. seropedicae* não fixadora (M2), controle não inoculado e testemunha nitrogenada (equivalente a 160 kg N .ha⁻¹). Plântulas

micropropagadas de cana-de-açúcar da variedade CB 45-3 obtidas de acordo com HENDRE et al. (1983) e crescendo em frascos de vidro contendo meio MS com 1/10 da força iônica na fase de enraizamento, foram inoculadas com uma suspensão de 0,1 ml de aproximadamente 10^8 células bacterianas. ml^{-1} , sendo mantidas por sete dias em câmara de cultivo, para assegurar a infecção da parte aérea. Decorrido esse período, plântulas individuais foram cuidadosamente transferidas para potes plásticos contendo 10 kg de uma mistura 2:1 de areia lavada e vermiculita. As plântulas foram irrigadas diariamente com água estéril e fertilizadas semanalmente com 10 ml de solução de Hoaugland estéril sem nitrogênio. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento com temperatura inicial de 22 ± 2 °C e a partir da quarta semana a 30 °C com nível de radiação de $100 \mu\text{E.s}^{-1}.\text{cm}^2$ e um período luminoso de 12 horas. dia^{-1} . O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com três repetições. A testemunha nitrogenada recebeu o equivalente a 80 kg N.ha^{-1} , sete dias após o plantio e o restante (80 kg N.ha^{-1}) aos 11 dias depois. Os parâmetros avaliados constaram de enumeração do número de bactérias nas raízes e parte aérea após esterilização superficial com Cloramina T por 3 minutos (Olivares et al., 1996 expresso em logaritmo do número de bactérias por grama de material da planta e determinação do peso da matéria fresca de raízes e parte aérea expresso em mg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. OCORRÊNCIA DE *Herbaspirillum seropedicae* E *H. rubrisubalbicans* NO SISTEMA SOLO-PLANTA:

Na tabela 4 encontram-se os resultados do levantamento conduzido nas áreas 1 e 2. Podemos observar que dentre as 12 espécies de planta amostradas, *Herbaspirillum* spp. foi isolado apenas de 4, comparado com *Azospirillum* spp., presente em 9 das 12 testadas. Dentre as plantas positivas para *Herbaspirillum*, 3 são espécies pertencentes a família das gramíneas e já relatadas como hospedeiras (BALDANI et al., 1992). Porém, a espécie *Cajanus cajan*, pertencente a família das leguminosas, se constituiu no primeiro relato dessa bactéria associada a outra planta que não gramínea, já que todos os hospedeiros naturais relatados na literatura pertencem a família das gramíneas, seja enfocando o caráter diazotrófico ou fitopatogênico (BALDANI et al., 1992; HALE & WILKIE, 1972a,b; TOKESHI, 1980). É importante ressaltar que as amostras de raízes lavadas positivas para *Herbaspirillum* spp. em *C. cajan* foram obtidas de uma parcela anteriormente cultivada com milho, que hipoteticamente poderia elevar o potencial de inóculo desse microrganismo no solo, além de permitir a sobrevivência da bactéria em restos culturais.

Tabela 4 - Isolamento e diluição máxima para *Herbaspirillum* em raízes e parte aérea de diversas plantas invasoras presentes em duas áreas cultivadas com gramíneas (amostra composta de 5 plantas).

Espécie vegetal	Familia	<i>Herbaspirillum</i> spp.	<i>Azospirillum</i> spp.		
		RL ¹	PAL ²	RL	PAL
Área 1 - área cultivada com cana-de-açúcar por 6 anos					
<i>Cassia tora</i>	<i>Leguminosae</i>	ni*	ni	ni	ni
<i>Mollugo verticilata</i>	<i>Molluginaceae</i>	ni	ni	10 ⁻² **	ni
<i>Waltheria indica</i>	<i>Sterculiaceae</i>	ni	ni	ni	ni
<i>Emília sanchifolia</i>	<i>Compositae</i>	ni	ni	ni	ni
<i>Cyperus rotundus</i>	<i>Cyperaceae</i>	ni	ni	10 ⁻²	10 ⁻²
<i>Portulaca oleraceae</i>	<i>Portulacaceae</i>	ni	ni	10 ⁻²	ni
<i>Echinola crusgalli</i>	<i>Gramineae</i>	ni	ni	10 ⁻²	ni
<i>Saccharum hyb.</i>	<i>Gramineae</i>	10 ^{''}	10 ^{''}	10 ⁻²	10 ⁻²
<i>Digitaria insularis</i>	<i>Gramineae</i>	10 ⁻²	ni	ni	ni
gramíneas não identificadas (duas)		10 ⁻⁵	ni	ni	ni
Área 2 - Monocultivo de milho por 13 anos					
<i>Cajanus cajan</i> ***	<i>Leguminosae</i>	1 0 ⁻⁴	ni	10 ⁻²	ni
<i>Bidens pilosa</i>	<i>Compositae</i>	ni	ni	10 ⁻²	ni
<i>Panicum maximum</i>	<i>Gramineae</i>	10 ⁻⁴	ni	10 ⁻²	ni
<i>Zea mays</i>	<i>Gramineae</i>	10 ⁻⁴	ni	10 ⁻²	ni

¹ RL = Raiz lavada, ² PAL = Parte aérea lavada

Amostragem composta de 5 plantas por espécie.

* não foi isolado

** isolado da diluição citada

*** amostrado da parcela rotação milho-guandu.

Um aspecto interessante resulta da observação dos dados da área 1. Dentre as 11 plantas investigadas, *Herbaspirillum* spp. foi isolado apenas de raízes lavadas de 3 gramíneas invasoras ocorrendo no canavial e de plantas de cana-de-açúcar, ocorrendo neste caso nas raízes e na parte aérea. Esta observação constitui-se em evidência para existência de um grau de associação mais específico entre a planta e a bactéria, já que muitas das plantas invasoras foram amostradas muito próximo das plantas de cana-de-açúcar, o que permite um contato íntimo entre o sistema radicular das diferentes plantas. Em outro levantamento conduzido em diferentes regiões canavieiras (áreas 3, 4 e 5) foi demonstrada a ocorrência natural de *Herbaspirillum* spp. em raízes, colmos e folhas de uma gama de variedades de cana-de-açúcar, todas híbridos interespecíficos de *Saccharum* incluindo as variedades SP 70-1143, SP 70-1284, SP 72-1861, SP 79-1011, CB 45-3, CB 4176, NA 5679 e B-4362 em números variando de 10^2 a 10^6 bactérias por grama de material da planta. Além destes relatos de ocorrência da bactéria em plantas de cana-de-açúcar vegetando sob condições de campo, *Herbaspirillum* foi também isolado de 35 amostras de plântulas de cana-de-açúcar das variedades SP 81-9025, RB 85-5065, RB 80-6043 e IAC 82-2045 (gentilmente cedidas pelo Dr. Lee, UFSCar - Araras), oriundas de micropropagação e mantidas sob condições estéreis, o que não ocorreu em 33 amostras de 6 variedades oriundas da COPERSUCAR. Na técnica de micropropagação, os meristemas de plantas oriundas de campo e pré-germinadas em casa de vegetação são desinfestados superficialmente, obtendo-se seções de 0,1 a 0,6 mm a partir do meristema apical para cultivo em meio estéril apropriado, procedimento que é adotado pela COPERSUCAR. No caso das plantas do Dr. Lee (comunicação pessoal), procedimento similar é adotado, porém o tamanho do meristema apical para obtenção de plântulas é de 2 mm, indicando que com segmentos do meristema deste tamanho, não se consiga remover a bactéria. Essas observações não são surpreendentes, uma vez que dependendo do tamanho do meristema, uma porção variável dos tecidos

condutores, que comunicam a planta ao meristema é removida, podendo esta porção conduzir bactérias (KARTHA & GAMBORG, 1975). Ademais, bactérias do gênero *Herbaspirillum* tem sido observadas nos vasos do xilema de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1993b). OLIVEIRA et al. (1995) trabalhando com plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar var. SP 81-2590, também isolaram *Herbaspirillum* spp. do tratamento não inoculado, antes da aclimação.

Na tabela 5 estão listadas todas as espécies vegetais examinadas quanto a ocorrência de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*. Os diferentes isolados foram classificados ao nível de espécie em função de sua capacidade de utilizar as fontes de carbono meso-eritritol e N-acetilglucosamina (OLIVARES et al., 1993a). Como podemos observar, dentre as 23 espécies de plantas testadas para a presença de *Herbaspirillum* spp., 13 espécies vegetais foram hospedeiras, sendo que 12 espécies pertencem a família das gramíneas. *H. seropedicae* ocorreu na maioria das gramíneas testadas, associado às raízes, colmos e folhas. Já *H. rubrisubalbicans* mostrou-se mais restrito quanto ao espectro de hospedeiros, sendo isolado de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar, bem como de uma amostra de raízes lavadas de *Digitaria insularis*, a qual foi amostrada da área do canavial ocorrendo como planta invasora. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por BALDANI et al. (1986) e BALDANI et al. (1992) que demonstraram o amplo espectro de plantas hospedeiras para *H. seropedicae*, predominantemente plantas da família das gramíneas, bem como estão de acordo com aqueles descritos por CRISTOPHER & EDGERTON (1932), HALE & WILKIE (1972a) e TOKESHI et al. (1980), que descrevem "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, recentemente reconhecido como *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI et al., 1996), como um patógeno foliar secundário associado a cana-de-açúcar. Observando ainda a tabela 5, de um grande número de amostras (5 repetições) de raízes lavadas e da parte aérea de 9 espécies distribuídas dentro de sete famílias de plantas não gramíneas, *Herbaspirillum* spp. não foram isolados, fato que reforça a maior afinidade destas bactérias

diazotróficas por gramíneas. Além do mais, em nenhuma das 10 amostras de solo retiradas dos 10 cm superficiais das diferentes áreas de amostragem das plantas foi possível isolar *Herbaspirillum* spp. A ocorrência natural de *Herbaspirillum seropedicae* no interior de raízes, colmos e folhas de gramíneas e de *H. rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar, associada a não detecção destes microrganismos no solo sem plantas, sugerem a existência de uma interação do tipo endofítica entre gramíneas e as bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum*. Bactérias endofíticas foram definidas por PETRINI et al. (1991) como toda bactéria que habita parte ou todo seu ciclo de vida o interior dos tecidos da planta, sem causar dano aparente a seu hospedeiro. Tomando como modelo a interação entre cana-de-açúcar e *Herbaspirillum* na qual as bactérias ocorrem naturalmente no interior de raízes, colmos e folhas de plantas aparentemente saudáveis ou assintomáticas, parece claro pressupor a existência de uma interação não patogênica entre a bactéria e a planta, caracterizada por definição como uma interação endofítica. Tal situação, por hipótese, poderia se constituir num passo importante na coevolução e compatibilização entre a planta e a bactéria, onde características ligadas ao desenvolvimento dos mecanismos para maximização da contribuição da fixação biológica de nitrogênio estariam sendo desenvolvidas em detrimento dos efeitos deletérios da patogenicidade. Porém, a despeito destas especulações, pouco se conhece sobre o grau de especialização e evolução da interação endofítica entre *Herbaspirillum* spp. e plantas de cana-de-açúcar e outras gramíneas. Trabalhando com a ocorrência de raças fisiológicas de *Xanthomonas albilineans*, agente causal da escaldadura das folhas em cana-de-açúcar, TOKESHI (1986) afirmou que apesar da bacteriose estar disseminada pelos 4 milhões de hectares de campos de cana-de-açúcar, estabilidade na resistência tem sido observada por mais de 36 anos. O grau de estabilidade de resistência das variedades comerciais indica que a resistência poligênica é a forma de resistência operante na cana-de-açúcar. Desse modo, *X. albilineans* mesmo sendo um parasita facultativo, atua como se fosse um

parasita obrigatório desenvolvendo uma infecção latente. A necessidade de constante associação da bactéria com o sistema vascular do hospedeiro resulta em numa especialização parasitária, que permite a sobrevivência da planta e do patógeno. A análise apresentada acima por TOKESHI (1986) enfocando a questão de uma bactéria fitopatogênica não induzir sintomas no seu hospedeiro, reflete claramente o fenômeno de compatibilização entre mecanismos de defesa da planta e os de ataque da bactéria, gerando uma associação planta-bactéria que pode ser duradoura e apresentar diferentes graus de resposta. Desde a bem conhecida interação fitopatogênica com diferentes graus de severidade (expressão de sintomas), passando por interações neutras a benéficas uni e bidirecionais (interações endofíticas e simbióticas), estas ainda pouco exploradas pela comunidade científica. Esta avaliação poderia explicar também a inexistência de sintomas de estria mosqueada em variedades comerciais de cana-de-açúcar no Brasil em condições de campo e em testes de patogenicidade, e o estabelecimento de uma interação endofítica.

Na tabela 6, 38 isolados representativos de *Herbaspirillum* de diferentes plantas hospedeiras, obtidos durante os estudos de ocorrência foram identificados como *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* em função de sua capacidade de utilizar meso-eritritol e N-acetilglucosamina como fontes de carbono (OLIVARES et al., 1996). Como podemos perceber, entre os isolados de cana-de-açúcar (total de 22 isolados), 70% foram identificados como *H. seropedicae*, enquanto que os 30% restantes foram identificados como *H. rubrisubalbicans*. Se considerarmos todas as espécies hospedeiras incluindo a cana-de-açúcar, gramíneas forrageiras e cereais, bem como gramíneas invasoras vegetando na área canavieira, o percentual de ocorrência de *H. seropedicae* em relação ao total de espécies hospedeiras sobe para 79%. Cabe ressaltar que a maioria destes isolados foi discriminado ao nível de espécie não apenas pelo uso de fontes de carbono, tendo sua classificação confirmada pela aplicação de métodos genotípicos como descritas na capítulo desta tese.

Tabela 5 - Ocorrência de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* em diferentes espécies de 8 famílias de plantas. As amostras para isolamento consistiram da amostra composta de raízes lavadas e parte aérea de 5 plantas.

Espécie Vegetal	<i>H. seropedicae</i>	<i>H. rubrisubalbicans</i>
Família Gramineae		
<i>Saccharum hyb.</i>	Raízes e colmos	Raízes, colmos e folhas
<i>Sorghum bicolor</i>	Raízes, colmos e folhas	Não isolado
<i>Oriza sativa</i>	Raízes, colmos e folhas	Não isolado
<i>Zea mays</i>	Raízes, colmos e folhas	Não isolado
<i>Pennisetum purpureum</i>	Raízes ¹	Não isolado
<i>Panicum maximum</i>	Raízes ¹	Não isolado
<i>Digitaria decumbens</i>	Raízes ¹	Não isolado
<i>Brachiaria decumbens</i>	Raízes ¹	Não isolado
<i>Digitaria insularis</i>	Não isolado	Raízes²
<i>Melinis minutiflora</i>	Raízes ¹	Não isolado
<i>Echinola crusgalli</i>	Raízes	Não isolado
<i>Paspalum notatum</i> cv. <i>batatais</i>	Não isolado	Não isolado
Planta invasora 1	Raízes ³	Não isolado
Planta invasora 2	Raízes ³	Não isolado
Família Leguminosae		
<i>Cajanus cajan</i>	Raízes⁴	Não isolado
<i>Cassia tora</i>	Não isolado	Não isolado
Família Compositae		
<i>Bidens pilosa</i>	Não isolado	Não isolado
<i>Emilia sanchifolia</i>	Não isolado	Não isolado
Família Molluginaceae		
<i>Mollugo verticillata</i>	Não isolado	Não isolado
Família Sterculiaceae		
<i>Waltheria indica</i>	Não isolado	Não isolado
Família Cyperaceae		
<i>Cyperus rotundos</i>	Não isolado	Não isolado
Família Portulacaceae		
<i>Portulaca oleraceae</i>	Não isolado	Não isolado
Família Cucurbitaceae		
<i>Mormodica charantia</i>	Não isolado	Não isolado

¹ apenas as raízes foram avaliadas.

² planta invasora ocorrendo dentro do canavial.

³ planta invasora não identificada.

⁴ isolado de área de rotação milho-guando

Tabela 6 - Identificação de diferentes isolados de *Herbaspirillum* ao nível de espécie, através do uso de mesoeritritol¹ e N-acetilglucosamina² como fontes de carbono em meio JNFb semi-sólido.

Origem e código do isolado	UTILIZAÇÃO DE:		Designação ao nível de espécie
	Meso ¹	N-acetil ²	
1. Cana-de-açúcar			
Raiz SP 70-1143 (HRC50)	+	-	<i>H. rubrisubalbicans</i>
Raiz SP 70-1143 (HRC51)	+	-	<i>H. rubrisubalbicans</i>
Raiz CB 45-3 (HRC52)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz CB 45-3 (HRC53)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz CB 45-3 (HRC54)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz CB 45-3 (HRC55)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz SP 70-1143 (HRC60)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz SP 70-1143 (HRC61)	+	-	<i>H. rubrisubalbicans</i>
Raiz variedade desconhecida	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz SP 72-1861 (HRC80)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Colmo SP 70-1284 (HCC100)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Colmo SP 70-1284 (HCC101)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Colmo SP 70-1284 (HCC102)			<i>H. seropedicae</i>
Colmo SP 70-1284 (HCC103)	+	-	<i>H. rubrisubalbicans</i>
Colmo NA 5679 (HCC105)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Folha B-4362 (B-4362)	+		<i>H. rubrisubalbicans</i>
Folha NA 5679 (isol D)	-	+	<i>H. rubrisubalbicans</i>
Planta micropr. RB 80-6043 (isol 1)	+	-	<i>H. seropedicae</i>
Planta micropr. RB 80-6043 (isol 4,8)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
2. Gramíneas forrageiras			
Raiz Capim digitaria ³ (Dig RL3)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz Capim digitaria ³ (Dig RE3)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz Capim elefante ⁴ (RLelef4)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz Capim braquiaria ⁵ (RLbrach3)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz Capim braquiaria ⁵ (REbrach3)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz Capim gordura ⁶ (RLgord3)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz Capim gordura ⁶ (REgord3)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz Capim colônia ⁷ (RLcolon4)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
3. Cereais			
Raiz Sorgo (Sorgo RL3)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz Sorgo (Sorgo RE5)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz Milho (HRM01)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Colmo Milho (HCM50)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz Arroz (HRA01)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Folha Arroz (HFA100)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
4. Gramíneas invasoras			
Raiz Digitaria insularis (HPD01 e 02)	+	-	<i>H. rubrisubalbicans</i>
Raiz planta não identificada 1 (HPD03)	-	+	<i>H. seropedicae</i>
Raiz planta não identificada 1 (HPD05)	-	+	<i>H. seropedicae</i>

³ *Digitaria decumbens*, ⁴*Pennisetum purpureum*, ⁵*Brachiaria decumbens*, ⁶*Melinis minutiflora*, ⁷*Panicum maximum*.

2. SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE *Herbaspirillum* NO SOLO, SOLO DA RIZOSFERA E RAÍZES DA PLANTA HOSPEDEIRA.

Dois experimentos foram conduzidos visando avaliar a sobrevivência de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* no solo, bem como avaliar o papel da planta hospedeira na dinâmica populacional da bactéria, já que a bactéria parece não sobreviver no solo. O isolamento e quantificação de *Herbaspirillum* no solo é baseado em sua capacidade de crescer em meio semi-sólido isento de nitrogênio, tal como as bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum*. As inúmeras tentativas voltadas para a obtenção de um meio seletivo para *Herbaspirillum*, culminaram na formulação do meio JNFb semi-sólido (BALDANI et al., 1992) que facilitaram o isolamento de *Herbaspirillum*, reduzindo o crescimento de *Azospirillum* spp. no meio de isolamento. Entretanto, em situações em que a relação entre o número de células de *Herbaspirillum* e *Azospirillum* é baixa, surgem problemas na sua detecção e enumeração. Diante do exposto, visando facilitar o isolamento e a identificação de *Herbaspirillum*, adicionou-se ao meio de JNFb semi-sólido o antibiótico ácido nalidíxico (30 ppm), pois verificou-se que as estirpes utilizadas neste ensaio (267 e M4), são naturalmente resistentes a esta concentração do antibiótico. Testando estas estirpes em meio JNFb semi-sólido com e sem ácido nalidíxico (Nal), verificou-se uma redução nas taxas de crescimento dessas estirpes avaliado pelo método de redução de acetileno, quando crescendo na presença do ácido nalidíxico, comparado ao meio sem antibiótico, sob condições de fixação de N_2 , porém não observou-se uma redução significativa nas contagens da bactéria nas diferentes épocas de coleta de amostras do solo (dados não mostrados).

Na figura 1(A e B), podemos observar o comportamento das duas espécies de *Herbaspirillum* (Z67 e M4), em dois tipos de solo (Pvd e Cana). Em todos os tratamentos e independente da espécie de *Herbaspirillum*, existiu um padrão semelhante de sobrevivência, caracterizado por um período inicial de 5 a 7 dias em que a população bacteriana introduzida sofreu uma queda brusca até

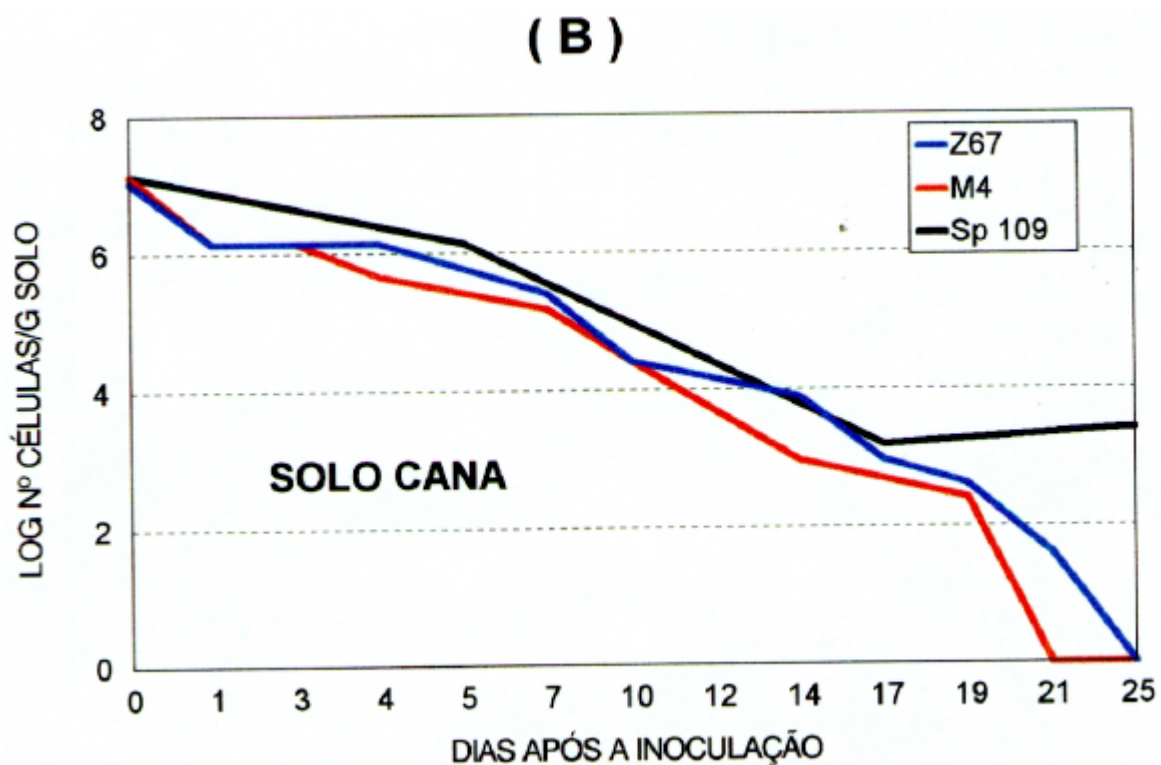
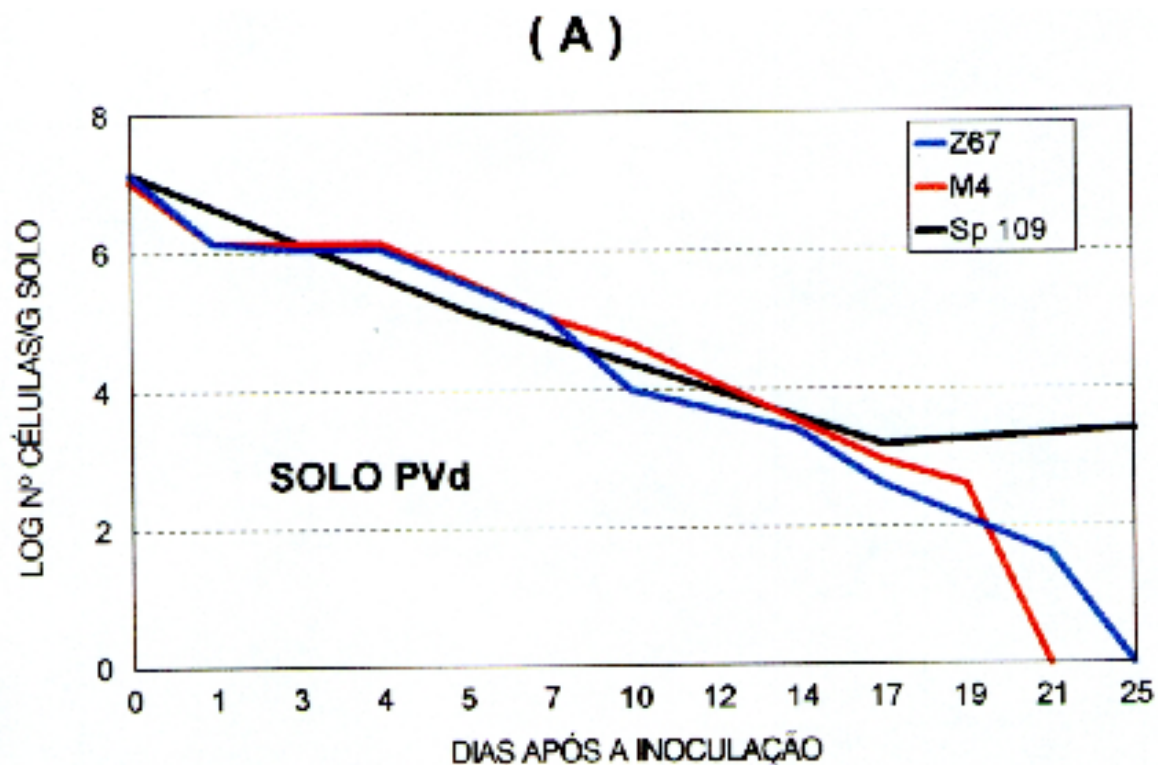


Figura 1- Sobrevivência de *H. seropedicae* estirpe Z67, *H. rubrisubalbicans* estirpe M4 e *Azospirillum brasilense* estirpe Sp 109 em dois tipos de solo, Podzólico Vermelho Amarelo distrófico, Pvd (A) e solo cultivado com cana por 13 anos, solo cana (B). Valores são média de 3 repetições.

níveis como os observados aos 21 dias após a inoculação de 40 células por g de solo (correspondente em log a 1,60) para a estirpe Z67 em ambos os solos e zero para a estirpe M4 nos dois solos estudados. Estes resultados são bastante similares aqueles obtidos por BALDANI et al., (1992), que investigaram a sobrevivência de duas estirpes de *H. seropedicae* (267 e ZM 176) em uma amostra de solo Pvd semelhante ao utilizado neste ensaio. Estes resultados são indicativos de que *Herbaspirillum* spp. não seja uma bactéria tipicamente do solo e subsidia a hipótese da bactéria como um endófito.

Estudos conduzidos por HUGHES (1968) mostraram que solos continuamente cultivados com cana-de-açúcar incrementaram a sobrevivência de *Xanthomonas albinneans* (agente causal da escaldadura foliar em cana de açúcar) por um período de tempo mais prolongado que o habitualmente observado. No presente ensaio, para as duas espécies de *Herbaspirillum*, não foi observado nenhum efeito do solo cultivado continuamente com cana no aumento da longevidade das bactérias, já que, as curvas de sobrevivência nos dois solos foram muito semelhantes para uma mesma estirpe. Apenas a estirpe Z67 foi recuperada aos 21 dias após a inoculação (40 células por g de solo), porém aos 25 dias a população bacteriana atingiu níveis não detectáveis, fato que se repetiu em amostragens realizadas aos 40 e 60 dias após a inoculação, mesmo com a adição de meio de cultura no solo (dados não mostrados).

Tabela 7 - Flutuação da população diazotrófica natural nos solos, Pvd e Cana não inoculados (testemunha não inoculada) e mantidos nas mesmas condições de umidade e temperatura dos solos inoculados.

Dias de incubação	Número de células x 10 ² . g ⁻¹ solo	
	Pvd	Cana
1	0	0
3	4	4
10	0	0
17	0	4
21	0	0
25	0	0

Observando a tabela 7, notamos que a população diazotrófica natural dos solos PVd e Cana não inoculados utilizados neste ensaio variaram de 0 a 400 células. g⁻¹ de solo ao longo de 25 dias de incubação, quando utilizou-se o meio JNFb sem ácido nalidíxico (Nal) como meio de isolamento. A observação ao microscópio e o plaqueamento dos isolamentos positivos, revelou a presença de *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense*. Ressalta-se que, dentre os isolados obtidos naturalmente do solo, nenhum foi caracterizado como *Herbaspirillum*, o que confirma achados anteriores de BALDANI et al. (1992). Quando utilizou-se o meio JNFb com Nal, não foi possível isolar nenhum diazotrófico natural do solo dentro dos períodos de amostragem citados acima (dados não mostrados), do que se conclui que a marca selecionada é seletiva para as bactérias em estudo, possibilitando aumentar o limite de detecção e facilitar o reconhecimento da bactéria.

Um outro controle para este ensaio, foi a inoculação de uma estirpe de *Azospirillum brasilense* (Sp109), resistente a 50ppm de estreptomicina (gentilmente cedida pela Dr. Vera Baldani). Utilizando os solos PVd e Cana não inoculados (testemunha), não foi possível isolar nenhum diazotrófico em meio NFb com 50 ppm de estreptomicina (dados não mostrados). Na figura 1A e B, podemos ainda observar a dinâmica populacional da estirpe Sp109 ao longo de 25 dias nos dois solos, quantificada no meio NFb com 50 ppm de estreptomicina. As curvas de sobrevivência de *Herbaspirillum* spp. e *A. brasilense* foram bastante similares até 19 dias após a inoculação. A partir de 25 dias após a inoculação, apenas *A. brasilense* Sp109 foi detectado, com níveis populacionais na ordem de 10³ células por g de solo, valores que permaneceram até a última avaliação aos 40 dias após a inoculação (dados não mostrados). *Azospirillum* sobrevive por um longo período de tempo na rizosfera de um grande número de espécies de planta. A colonização das raízes é inespecífica e a bactéria migra entre diferentes espécies de planta (BASHAN & HOLGUIN, 1996). Com relação a sobrevivência

de *Azospirillum* em solo fora da rizosfera, evidências conflitantes tem sido acumuladas. *Azospirillum* ocorre em muitos solos tropicais (p. ex. Brasil) e em alguns solos de regiões temperadas, sugerindo sobrevivência ilimitada da bactéria no solo. Porém, estudos conduzidos em zonas temperadas (p. ex. solos americanos e canadenses) e zonas semi-áridas (solos israelenses), bem como algumas regiões tropicais, mostraram que *Azospirillum* spp. introduzido no solo apresenta baixa sobrevivência (BASHAN & LEVANONY, 1990). Desse modo é largamente reconhecido que a sobrevivência de *Azospirillum* no solo é uma das questões básicas ainda não esclarecidas. BASHAN et al., (1995) trabalhando com 23 tipos de solo de diferentes regiões geográficas do mundo, procurou correlacionar diversos parâmetros do solo com a sobrevivência de *Azospirillum brasilense* estirpes Cd e Sp 245 com o intuito de gerar dados para a criação de um modelo de predição da sobrevivência da bactéria. Neste estudo os autores concluíram que a sobrevivência da bactéria é independente da aridez do solo e que sete parâmetros abióticos governaram a sobrevivência da bactéria no solo, a % de argila, o teor de nitrogênio, o teor de matéria orgânica, o teor de carbonato de cálcio, o teor de areia fina e grossa e a capacidade de retenção de água. Perturbações no solo como remoção da planta hospedeira ou percolação de água no perfil afeta rapidamente os níveis populacionais da bactéria. BASHAN et al. (1995) destacaram também que em seguida a remoção da planta do solo, o material residual remanescente suporta o crescimento da bactéria por poucas semanas. A partir da exaustão dos nutrientes, os parâmetros abióticos supra citados e as interações bióticas irão determinar as taxas de sobrevivência da bactéria *Azospirillum*. A ocorrência natural e a persistência de *Azospirillum* em solos tem sido atribuída a capacidade da bactéria de alterar sua forma vegetativa para uma forma encistada. Pleomorfismo em *Azospirillum* é uma característica bem documentada na literatura, sendo caracterizada pela transformação da bactéria da forma vibrióide típica ("V-form") para uma forma encistada ("C-form") via espessamento da parede celular bacteriana (TARRAND et al., 1978). Estas

estruturas similares a cistos são induzidas sob condições de estresse a nível de laboratório ou naturalmente e são mais resistentes a dessecação comparada a células vegetativas (BECKING, 1985). A existência de formas encistadas no gênero *Azospirillum* representam um mecanismo de sobrevivência valioso para manutenção da bactéria em solo desnudo e na rizosfera sob condições desfavoráveis (BASHAN et al., 1991).

A baixa capacidade de persistência de *herbaspirillum* no solo após inoculação, associada a sua aparente inexistência em solo sem planta foi demonstrada por BALDANI et al. (1992). Tal fato, contrastado com ocorrência natural de *Herbaspirillum* na parte aérea de algumas gramíneas e a boa adaptação aos tecidos da planta após inoculação artificial (PIMENTEL et al., 1991) reforça ainda mais a existência de uma interação endofítica, na qual a planta hospedeira exerce influência marcante na sobrevivência, crescimento e disseminação das bactérias no meio natural.

Na segunda parte deste estudo tratou-se de avaliar o efeito da presença da planta hospedeira na dinâmica populacional de *Herbaspirillum* no solo, solo da rizosfera e raízes, o qual pode ser observado na figura 2(A e B). Neste ensaio, a baixa capacidade de persistência de *H. seropedicae* estirpe Z67 e *H. rubrisubalbicans* estirpe M4 foram mais uma vez comprovadas. As bactérias atingiram níveis não detectáveis no solo desnudo entre 3 a 4 semanas, enquanto que, na presença da planta, foram encontrados números entre 10^3 e 10^4 células por grama de raiz até 9 semanas (fim do período experimental) em raízes lavadas e esterilizadas. A dinâmica populacional no solo de rizosfera foi similar a no solo desnudo, com *H. rubrisubalbicans* estirpe M4 atingindo limites não detectáveis apenas uma semana depois, enquanto que *H. seropedicae* estirpe Z67, no mesmo período (28 d.a.i.) apresentava números ao redor de 10^3 células. g de solo⁻¹, chegando a limites não detectáveis entre 4 a 9 semanas. Curiosamente, *H. seropedicae*, diferente de *H. rubrisubalbicans* ocorre naturalmente associado a raízes de plantas de sorgo, o que sugere que plantas hospedeiras possam

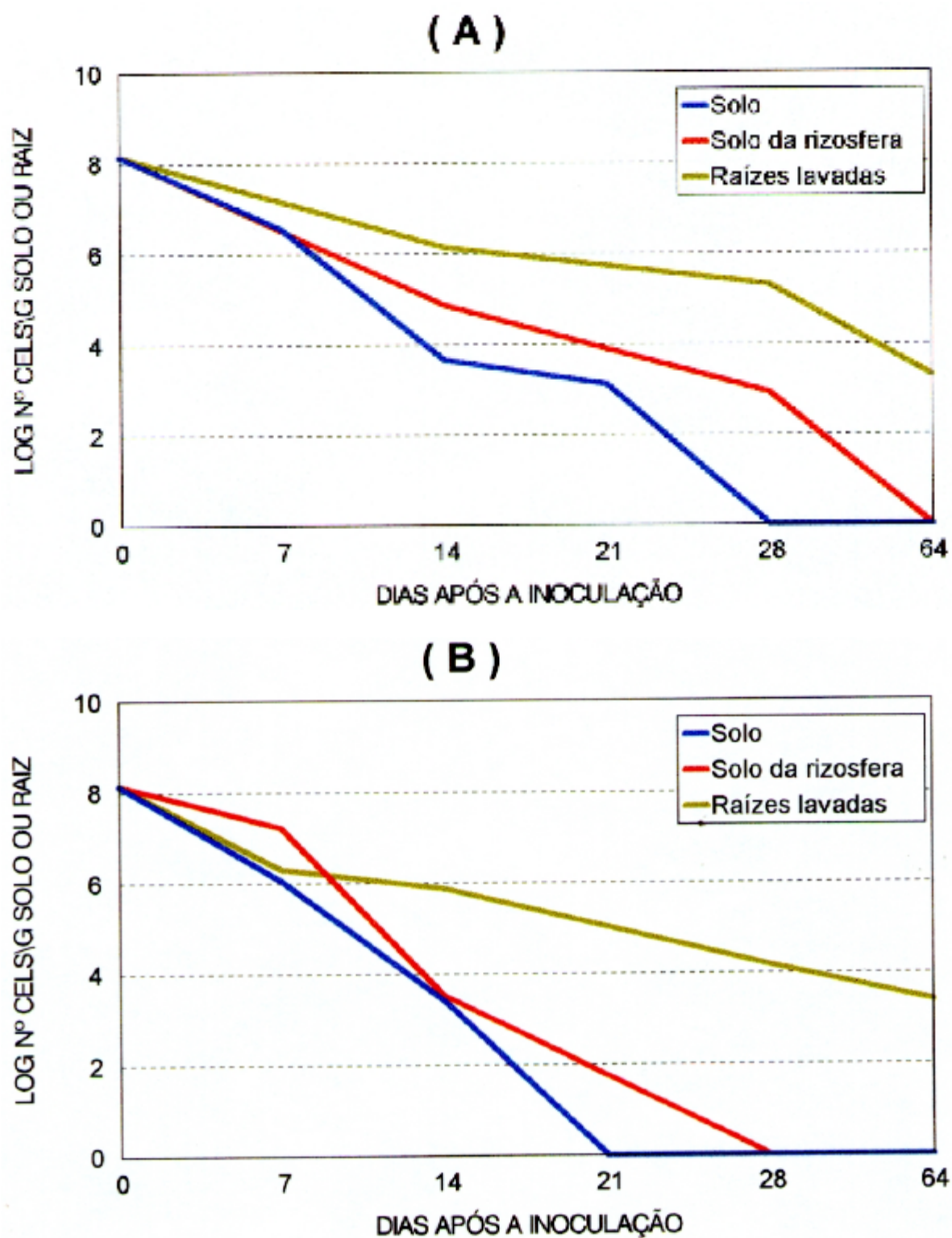


Figura 2- Sobrevivência de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z67 (A) e *H. rubrisubalbicans* estirpe M4 (B) no solo, solo de rizosfera e raízes lavadas de plantas de sorgo. (Média de 3 repetições).

aumentar a longevidade da bactéria no solo da rizosfera, ou que *H. seropedicae* apresente maior capacidade de persistência no ambiente rizosférico. No entanto, ambas afirmações devem ser comprovadas por experimentos mais precisos. A baixa capacidade de persistência de *Herbaspirillum* spp. ao nível de rizosfera, contrasta com a elevada capacidade de *Azospirillum* spp. persistir na rizosfera de diversas plantas, o que pode explicar em parte a grande capacidade de dispersão de *Azospirillum* no solo. Embora, a persistência de *Herbaspirillum* no solo da rizosfera de plantas hospedeiras e principalmente de plantas não-hospedeiras seja baixa, assim como para bactérias fitopatogênicas, tal modalidade de sobrevivência pode ser um componente importante para disseminação e estabelecimento endofítico das bactérias (KIMURA, 1981).

Dados não apresentados de contagem comparativa em placa contendo meio batata e meio NFb sólidos, com e sem Nal30, indicaram que aos 7 dias após a inoculação das sementes, 50 a 75 % do total de bactérias que colonizaram às raízes eram pertencentes ao gênero *Herbaspirillum*. Aos 14 d.a.i., a proporção de *Herbaspirillum* em relação a bactérias totais caiu para 1,5 a 2,0% do número total de bactérias por grama de raiz lavada.

Outro fato interessante resultou da recuperação de *Herbaspirillum* do solo da rizosfera, raízes lavadas e esterilizadas quando introduziu-se sementes pré-germinadas de sorgo comprovadamente livres da bactéria, 6 a 7 semanas após a não detecção de *Herbaspirillum* no solo. Como podemos perceber na figura 3 (A e B), as sementes foram introduzidas aos 77 dias após a inoculação da bactéria (setas) no solo. Os resultados obtidos contrariam as suposições iniciais de que a bactéria não sobreviveria no solo desnudo e levantam uma questão quanto a sobrevivência de *Herbaspirillum* no solo; teriam estes microrganismos uma fase de sobrevivência curta ou permanente no solo?. A resposta para este questionamento está vinculada a adoção de métodos de detecção mais sensíveis. Até o momento, podemos concluir que após a inoculação no solo, a população de *Herbaspirillum* spp. declina rapidamente, não sendo mais detectada após 4

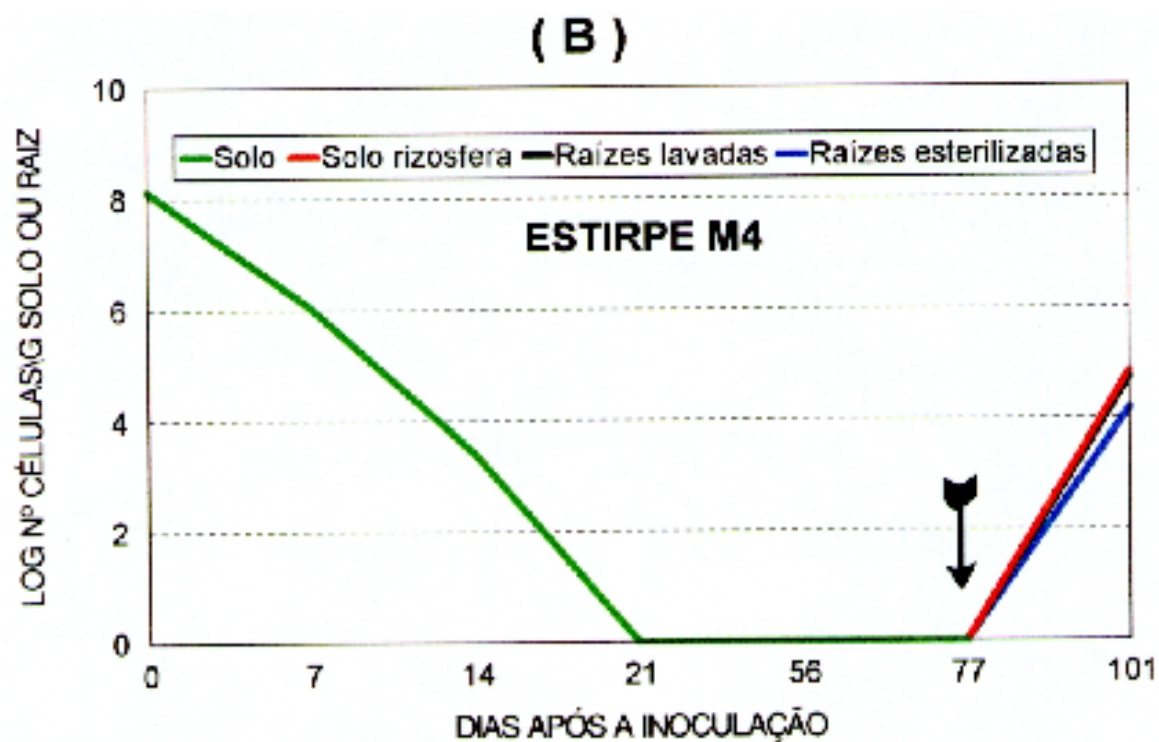
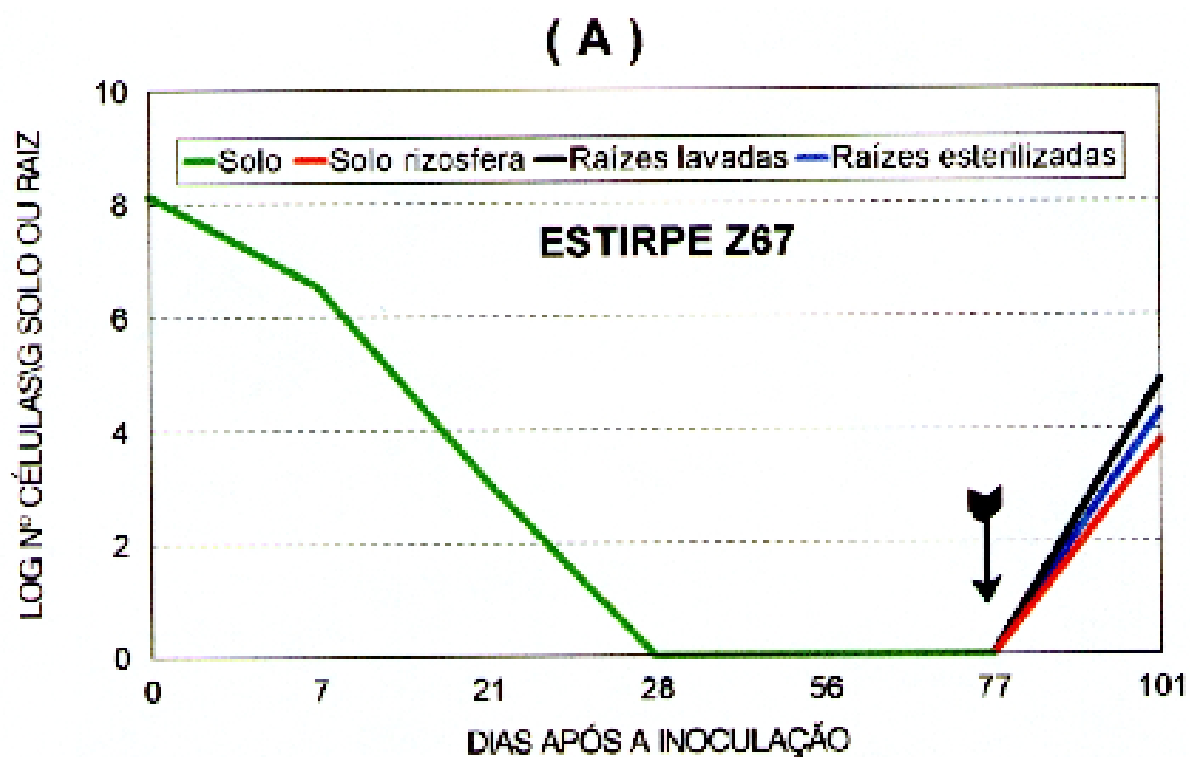


Figura 3- Reisolamento de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z67 (A) e *rubrisubalbicans* estirpe M4 (B) de plantas de sorgo 77 dias após a inoculação (setas). Os dados são média de 3 repetições.

semanas. Sua longevidade é um pouco incrementada no solo de rizosfera e bastante aumentada nas raízes de sorgo. A recuperação em raízes de sorgo 77 dias após a inoculação vem a demonstrar que as bactérias permanecem viáveis no solo, porém em numeros abaixo do limite de detecção do método de contagem empregado (menor que 100 células por grama) ou apresentam um mecanismo de sobrevivência descrito como “estágio viável mas não culturável” (ROSZAK, & COLWELL, 1987). De acordo com estes autores, o mecanismo de viabilidade e não culturabilidade, caracteriza-se como um desvio no metabolismo natural da bactéria e surge em função dos estresses que ocorrem no solo, em que a célula bacteriana está intacta, viável, mas não sofre divisão celular em meios de cultura cornumente empregados. Desse modo, com a introdução da planta hospedeira, haveria um estímulo específico a multiplicação das bactérias, atingindo números em torno de 10^4 células por grama de solo. Resultados semelhantes foram observados por NESMITH & JENKINS (1983) no qual o fitopatógeno *Pseudomonas solanacearum*, agente da murcha bacteriana em tomate, não pode ser detectado no solo 30 dias após a inoculação, porém com a introdução de plântulas de tomate a bactéria pôde ser detectada. A detecção da bactéria apenas depois da introdução da planta, subsidia o conceito de viabilidade e não culturabilidade proposto por ROSZAK & COLWELL (1987). Neste caso, a planta exsuda determinados compostos que estimulam a divisão celular, restabelecendo o metabolismo normal da bactéria.

Ressalta-se que nos controles utilizados, solo não inoculado com e sem plantas de sorgo, não foi possível isolar *Herbaspirillum*. Também foi utilizada uma estirpe recentemente isolada de raízes de sorgo (estirpe H19) e pouco manipulada em condições de laboratório. Tal tratamento tinha a preocupação de checar se o comportamento de estirpes frequentemente manipuladas em laboratório e reintroduzidas no meio era similar as estirpes pouco manipuladas. Dados não mostrados da estirpe Hsorgo mostraram um comportamento similar, embora sua sobrevivência no solo tenha sido um pouco maior (5 semanas) e os

números em solo de rizosfera e raízes lavadas e esterilizadas serem invariavelmente superiores aos tratamentos inoculados com Z67 e M4. O tratamento de desinfestação das sementes pareceu ser eficiente na eliminação das bactérias diazotróficas, de sorte que, podemos afirmar com alguma segurança que as células de *Herbaspirillum* isoladas são oriundas da inoculação.

SOBREVIVÊNCIA E CRESCIMENTO DE *Herbaspirillum* NO INTERIOR DA PLÂNTULAS DE CANA-DE-AÇÚCAR E RESPOSTA A INOCULAÇÃO.

Na figura 4 podemos observar a dinâmica populacional de 4 estirpes de *Herbaspirillum*, *H. seropedicae* estirpes Z67 e HRC54, *H. rubrisubalbicans* estirpes M4 e HCC103 no interior de raízes e da parte aérea de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar var. CB 45-3, após a inoculação da suspensão bacteriana em meio líquido, sob condições axênicas. A flutuação populacional das diferentes estirpes no interior das raízes de cana-de-açúcar encontra-se na figura 4A. Neste caso, ao longo de todo período experimental (106 dias) o número de bactérias por grama de raiz esterilizada superficialmente com cloramina T por 3 minutos, variou entre 10^4 e 10^7 células. g^{-1} de raízes, não sendo observado um declínio significativo da população. No momento do plantio no substrato (tempo zero), o número inicial de células no interior da planta era de 10^6 bactérias. g^{-1} de planta (inoculação “*in vitro*”). Com o desenvolvimento inicial das raízes, verificou-se um incremento geral das populações até 24 dias após a inoculação entre 5 a 10 vezes (até 1 unidade log), seguida de uma queda de até 100 vezes (2 unidades log), com aparente estabilização das população entre 10^4 e 10^6 células. g^{-1} raiz. A boa adaptabilidade das estirpes de *Herbaspirillum* ao interior das raízes foi anteriormente demonstrada na figura 2 (A e B), em raízes lavadas de sorgo, onde as estirpes Z67 e M4 sofreram menor decréscimo comparada ao solo de rizosfera e solo. Os números mais estáveis no interior das raízes de cana-de-açúcar comparadas a sorgo, podem ser explicados pelo

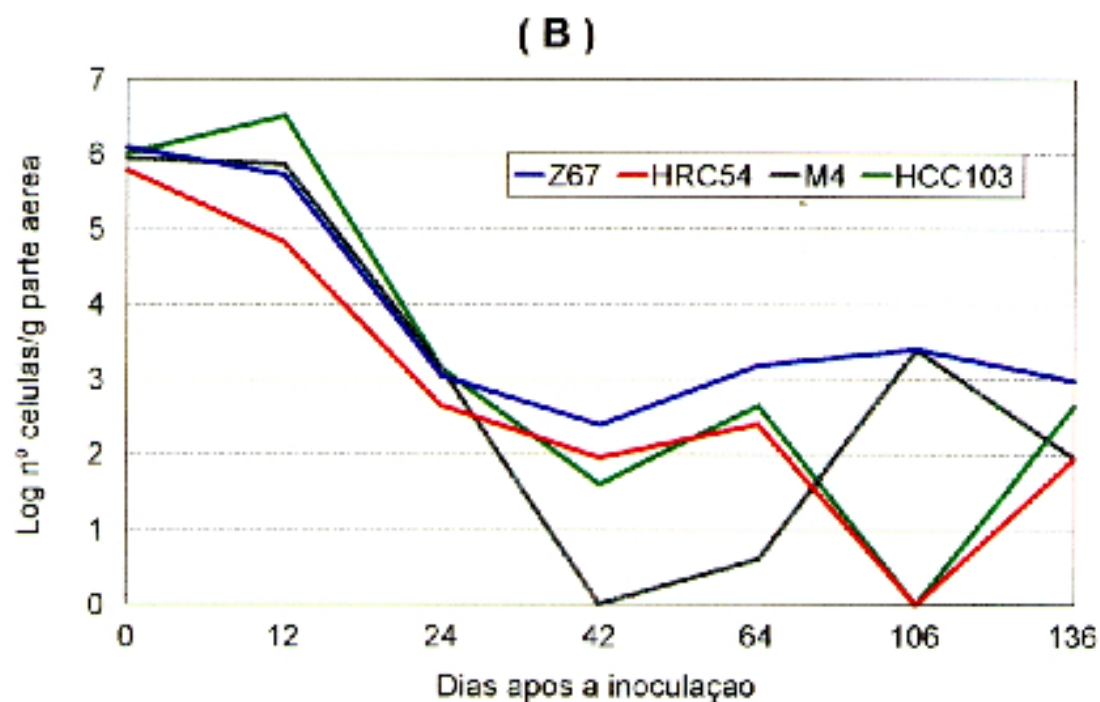
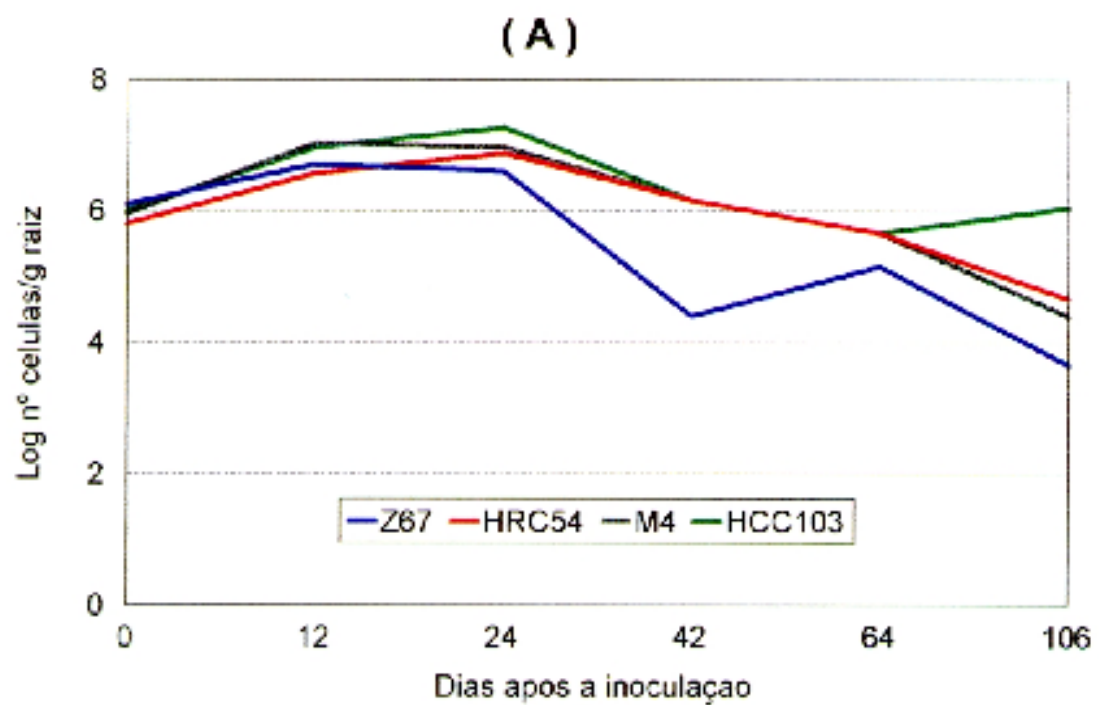


Figura 4- Variação populacional endofítica de *Herbaspirillum seropedicae* (Z67 e HRC54) e de *H. rubrisubalbicans* (M4 e HCC103) em raízes (A) e na parte aérea (B) de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar var. SP 70-1143, após a inoculação "in vitro" e transferência das plantas para câmara de crescimento.

método de inoculação utilizado e pelo fato do substrato utilizado ser esterilizado, o que diminui a competição com a microbiota nativa por sítios de infecção.

Durante todo período experimental, *Herbaspirillum* não foi observado nas raízes de cana-de-açúcar do controle não inoculado, porém aos 24, 64 e 106 d.a.i., foram observados respectivamente 2,34; 2,6 e 3,39 (log nº células. ml⁻¹) de bactérias diazotróficas. Observações ao microscópio e isolamento em placas de meio sólido NFb 3X (OLIVARES et al., 1996) revelaram a presença de *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense*, além de uma bactéria em forma de cocos não identificada. A contaminação do controle não inoculado com *Azospirillum* spp. tem sido bem frequente em condições de casa-de-vegetação e em câmaras de crescimento, a despeito das precauções que se tomam na montagem e condução dos experimentos. Embora a fonte deste tipo de contaminação seja ainda desconhecida, em experimentos sob condições controladas, BASHAN (1991) verificou que plantas inoculadas com *A. brasilense* causaram a contaminação de plantas não inoculadas via transmissão pelo ar. Resultados semelhantes foram obtidos por Reis Jr. (comunicação pessoal) trabalhando em casa de vegetação. Neste caso, plantas de cana-de açúcar micropropagadas não inoculadas, foram contaminadas por plantas inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* HRC54. A transmissão pelo ar foi confirmada, quando colocou-se frascos de vidro abertos, contendo meio JNFb semi-sólido aleatoriamente dispersos na área experimental e isolou-se a bactéria.

A dinâmica populacional das quatro estirpes de *Herbaspirillum* na parte aérea de plântulas de cana de açúcar pode ser observada na figura 4B. Diferente da estabilidade observada nas raízes, as populações na parte aérea sofrem grandes variações em função do tempo, com algumas estirpes como M4 (aos 42 d.a.i.) e HRC54 e HCC103 (aos 106 d.a.i.) atingindo valores abaixo do limite de detecção e em seguida, atingindo números entre 10² a 10³ bactérias por grama de parte aérea aos 136 dias após a inoculação. A variabilidade populacional da microflora bacteriana endofítica natural é bem conhecida para uma série de

culturas (GIBBINS, 1972) e para cana-de-açúcar (VALDEBENITO-SANHUEZA & TOKESHI, 1985). Mc NEIL et al. (1971) referem-se ao isolamento e identificação de *Erwinia uredovora*, *E. herbicola*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloace*, *Klebsiella pneumoniae* e *Leuconostoc mesenteroides* do tecido interno de plantas verdes e queimadas de cana-de-açúcar, aparentemente sadias e LEBEN et al. (1967) estudando a variação da população bacteriana de *Saccharum officinarum* L. em uma região de clima úmido de Porto Rico, observaram que as bactérias não eram detectadas no período das secas, mas no período de chuvas, essa população era evidenciada em todo material estudado. McINROY & KLOEPPER, (1991) relataram uma redução na população natural de endófitos associada com o aumento da idade de plantas de algodão.

Com relação a experimentos de inoculação de bactérias endofíticas, resultados de persistência e translocação contraditórios tem sido obtidos. CHEN et al. (1995) trabalhando com plântulas de algodão (7 d.a.e.), inoculadas com seis bactérias endofíticas por meio de picada com agulha no caule, 0,5 cm acima da linha do solo, observaram um rápido declínio até 7 dias após a inoculação, seguida de uma estabilização das populações endofíticas até o final do ensaio (21 d.a.i.), em números que variavam de $2,5 \times 10^2$ a 1×10^5 bactérias. g^{-1} de caule. Em contraste, uma estirpe de *Escherichia coli* incluída como controle negativo, foi detectada apenas no dia da inoculação ($\log 6,51$ UFC. g^{-1} colmos), não sendo mais detectada na planta em outras épocas de amostragem. Estes autores ainda relataram uma translocação limitada das bactérias inoculadas no interior do caule (apenas 3 a 5 cm acima e abaixo do ponto de inoculação). Entretanto, nem todas bactérias endofíticas demonstram translocação limitada, DIMOCK et al. (1989) relataram que *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, colonizaram os vasos do xilema de milho, sendo reisoladas em todos os órgãos da planta, embora a densidade populacional tenha sido maior na base dos colmos.

Mais escassos ainda são os estudos avaliando a dinâmica populacional de bactérias diazotróficas naturais ou introduzidas na planta. Um dos trabalhos

pioneiros, DÖBEREINER et al., (1990) inocularam plantas de sorgo (*Sorghum bicolor*) e capim elefante (*Pennisetum purpureum*) com estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* por meio de injeção no cartucho foliar, introduzindo uma população em torno de 10^6 células. g^{-1} de parte aérea. Através da avaliação dos frascos positivos para a presença da bactéria por meio da inoculação de fragmentos do limbo foliar de diferentes regiões acima do ponto de inoculação em meio NFb semi-sólido, os autores verificaram que em sorgo as bactérias persistiram por 30 dias após a inoculação, ficando restritas as folhas inoculadas. No capim elefante, *Herbaspirillum* spp. pôde ser detectado até 65 dias após a inoculação, sendo reisolado da terceira a quinta folhas acima da inoculada. OLIVEIRA et al. (1995) trabalhando com plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar inoculadas com combinações envolvendo os diazotróficos endofíticos *Acetobacter diazotrophicus* e *H. seropedicae*, inoculados ou não com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum*, em condições semelhantes as apresentadas neste experimento de tese, verificaram um aumento da população endofítica na parte aérea em função do tempo (99 d.a.i.). Estes resultados diferem dos aqui apresentados (figura 4B), enquanto que nas raízes, dinâmicas populacionais muito semelhantes foram obtidas com níveis de bactérias entre 10^4 e 10^6 células. g^{-1} de raízes.

Avaliando a flutuação natural das populações dos diazotróficos, *A. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp. através de número mais provável (NMP) em meio semi-sólido e a técnica imunoenzimática de ELISA, SILVA et al. (1995) verificaram que independente da variedade de cana e da parte da planta, a população de *Herbaspirillum* crescia com o tempo, sendo o números de bactérias nas raízes, sempre superior aos de colmos e folhas de cana, enquanto que *A. diazotrophicus* apresentava um padrão não bem definido e mais dependente do genótipo de cana-de-açúcar. Os fatores determinantes das variações nas populações diazotróficas endofíticas em função da ontogenia da planta são ainda muito pouco entendidos. As relações ecológicas com a microflora não fixadora de

N₂, a influência de fatores edafoclimáticos, bem como as alterações anatômicas que ocorrem no interior dos tecidos devem pouco a pouco ser levados em consideração em pesquisas futuras envolvendo o tema. De acordo com SILVA et al. (1994) e REIS Jr. et al. (1997), as maiores densidades populacionais de diazotróficos endofíticos em cana-de-açúcar ocorrem em toletes recém-germinados. Plantas recém germinadas de toletes em contraste com colmos oriundos do campo, se constituem material ideal para isolamento de *A. diazotrophicus*, devido ao elevado número de bactérias e a alta frequência de isolamento como demonstrado por REIS Jr. et al., 1997.

Tabela 8 - Peso de matéria fresca de raízes (PFr) e da parte aérea de (PFpa) de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar var. CB 45-3 inoculadas *H. seropedicae* (Z67 e HRC54), *H. rubrisubalbicans* (M4 e HCC103), uma mutante não diazotrófica de *H. seropedicae* (M2), 12 dias após a inoculação. (média de 3 repetições).

TRATAMENTO	PFr mg)	TRATAMENTO	PFpa (mg)
Z67	576,7 A	HRC54	880,0 A
HRC54	430,0 AB	Z67	833,3 A
HCC103	406,7 AB	Controle não inoculado	680,0 AB
M4	353,3 AB	M4	673,3 AB
M2	296,7 AB	HCC103	653,3 AB
Controle não inoculado	266,7 AB	M2	596,7 AB
Testemunha nitrogenada	140,0 B	Testemunha nitrogenada	310,0 B
cv (%)	34,65		27,53

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 9 - Peso de matéria fresca de raízes (PFr) e da parte aérea de (PFpa) de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar var. CB 45-3 inoculadas com estirpes de *H. seropedicae* (267 e HRC54), *H. rubrisubalbicans* (M4 e HCC103), uma mutante não diazotrófica de *H. seropedicae* (M2), 24 dias após a inoculação. (média de 3 repetições).

TRATAMENTO	PFr (mg)	TRATAMENTO	PFpa mg)
HCC103	1440,0 A	HRC54	1846,7 A
HRC54	1187,0 AB	Z67	1826,7 A
Z67	1163,3 A B	M 2	1233,3 AB
Controle não inoculado	876,7 A B	M 4	1053,3 AB
Testemunha nitrogenada	686,7 B	HCC103	1006,6 AB
M4	566,7 B	Testemunha nitrogenada	746,7 B
M2	550,0 B	Controle não inoculado	466,7 B
c v (%)	25,79		28,66

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 10 - Peso de matéria fresca de raízes (PFr) e da parte aérea de (PFpa) de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar var. CB 45-3 inoculadas com estirpes de *H. seropedicae* (267 e HRC54), *H. rubrisubalbicans* (M4 e HCC103), uma mutante não diazotrófica de *H. seropedicae* (M2), 64 dias após a inoculação. (média de 3 repetições).

TRATAMENTO	PFr (mg)	TRATAMENTO	PFpa (mg)
Z67	1426,7 n.s.	Testemunha nitrogenada	3167,0 A
HCC103	1403,3 n.s.	H C C 1 0 3	1567,0 B
M2	1363,3 n.s.	M4	1433,3 B
Controle não inoculado	1204,7 n.s.	M2	1417,0 B
M4	1203,3 n.s.	Z67	1303,3 B
HRC54	1173,3 n.s.	H R C 5 4	1217,0 B
Testemunha nitrogenada	1153,3 n.s.	Controle não inoculado	946,7 B
c v (%)	20,05		35,71

Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Nas tabelas 8, 9 e 10 podemos observar o efeito da inoculação de 4 estirpes de *Herbaspirillum* spp. (267, HRC54, M4 e HCC103), uma estirpe mutante natural não fixadora de *H. seropedicae* (M2), testemunha nitrogenada e controle não inoculado aos 12, 24 e 64 dias após a inoculação. Avaliando a tabela 8, podemos concluir que aos 12 dias após a inoculação, apenas *H. seropedicae* incrementou significativamente o peso fresco de raízes (estirpe 267) e o peso fresco da parte aérea (estirpes 267 e HRC54) com relação ao tratamento testemunha nitrogenada, não diferindo da média de tratamento das outras estirpes e da testemunha não inoculada. Mesmo trabalhando em condições de casa-de-vegetação, podemos observar os elevados coeficientes de variação (C.V.) obtidos no ensaio. A principal razão para a elevada variabilidade entre repetições dentro do tratamento é a heterogeneidade de desenvolvimento das plântulas obtidas através da técnica de micropropagação, o que resulta na obtenção de efeitos não significativos, a despeito das diferenças aparentes entre as médias, como pode ser observado claramente nos dados de peso da matéria fresca de raízes aos 12 dias. Aos 24 dias após a inoculação (tabela 9) foram observadas diferenças significativas ($\alpha=5\%$) na acumulação de matéria fresca de raízes de plântulas inoculadas com *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103 em contraste com a testemunha nitrogenada e as estirpes M2 e M4. Com relação a acumulação de matéria fresca da parte aérea, a média de tratamento das estirpes de *H. seropedicae* 267 e HRC54 diferiu estatisticamente das médias do controle não inoculado e da testemunha nitrogenada, o que não ocorreu quando comparou-se as médias de tratamento das estirpes de *H. seropedicae* com M4, M2 e HCC103, e estas por sua vez não diferiram das médias de tratamento da testemunha nitrogenada e do controle não inoculado. Observando agora os dados de 64 dias após a inoculação (tabela 10), podemos verificar a inexistência de diferenças significativas entre as médias de tratamento para o parâmetro peso da matéria fresca de raízes, enquanto que para o parâmetro peso fresco da parte

aérea, a média do tratamento nitrogenado diferiu estatisticamente das demais médias de tratamento.

A análise conjunta do experimento sugere a existência de um efeito deletério marcante do tratamento nitrogenado no desenvolvimento inicial das plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, que comprometem o crescimento de raízes e da parte aérea aos 12 e 24 dias após a inoculação. Este efeito deletério foi tão intenso, que a despeito dos elevados coeficientes de variação (C.V.), diferenças significativas ainda assim foram obtidas (tabelas 8 e 9). Efeitos deletérios de altas doses de N na acumulação de matéria fresca e seca tem sido demonstrado na literatura (FERNANDES et al., 1990). Neste caso, a absorção excessiva de NH_4^+ , devido a aplicação de fertilizantes nitrogenados em condições de temperatura elevada e baixa luminosidade, podem levar a um desequilíbrio entre o metabolismo de carbono e nitrogênio, resultando na falta de esqueletos de carbono para assimilação do amônio, que circulando livre nos tecidos vegetais afeta diversos processos metabólicos ligados a geração de energia (FERNANDES et al., 1984). No presente experimento foi utilizada uma dose de nitrato de amônio equivalente a $160 \text{ kg de N. ha}^{-1}$, parcelada aos 7 e 19 d.a.i.. Embora esta dose não tenha sido exageradamente alta, efeitos deletérios no início do experimento são observados devido a aplicação localizada do fertilizante nitrogenado na base das plântulas, que muitas das vezes possuem poucas ou nenhuma raiz. A esse fato somam-se as condições inadequadas de radiação que comprometem a fotossíntese, e por consequência a geração de esqueletos de carbono. Reis Jr. (com pessoal) seguindo o mesmo modelo experimental, porém trabalhando em casa de vegetação e com doses de N equivalentes a 300 Kg ha^{-1} , observou um efeito ainda mais drástico, as raízes do tratamento nitrogenado, comparada ao tratamento de inoculação com bactérias diazotróficas, que foi visualmente inibida quanto ao processo de alongamento, apresentando-se curtas e grossas. A partir da terceira colheita aos 64 d.a.i. (gráfico 10) e em colheitas subsequentes aos 106 e 136 d.a.i. (dados não mostrados), os efeitos deletérios

do N desapareceram, e o peso da matéria fresca da parte aérea do tratamento com N foi significativamente superior aos tratamentos de inoculação e ao controle não inoculado, não existindo mais diferenças no peso fresco de raízes. Presumivelmente, os efeitos deletérios do nitrogênio desaparecem em função das perdas de N do sistema e do crescimento concomitante das raízes e da parte aérea em concentrações de nitrogênio não tóxicas.

Outro fator importante a se discutir, se relaciona com os efeitos positivos da inoculação das estirpes de *Herbaspirillum* spp. no crescimento de raízes e da parte aérea. Neste experimento, as condições inadequadas de radiação limitando o crescimento potencial das plantas, associada a elevada variabilidade no vigor e tamanho das plântulas micropropagadas, contribuíram sobremaneira para o aumento da variância do erro experimental, mascarando a variação devido a tratamento e gerando médias de tratamento inoculado não estatisticamente diferentes do controle não inoculado. Efeitos positivos da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no alongamento do sistema radicular podem ser visualmente percebidos. Presumivelmente as taxas de crescimento da parte aérea tenderiam a ser maiores em função das taxas iniciais de absorção de nutrientes. Estes efeitos podem ser estatisticamente demonstrados se houver uma redução do erro experimental, principalmente pela redução da variabilidade de crescimento das plantas micropropagadas ou acompanhamento do incremento de matéria seca, a partir do peso individual inicial das plantas no momento de instalação do experimento, além do aumento dos níveis de radiação e redução da contaminação dos controles com diazotróficos naturais. Efeitos positivos no crescimento de raízes de cana-de-açúcar inoculadas com *Herbaspirillum* foram também observados por REIS Jr. (dados não publicados). BALDANI et al., (1995) trabalhando com seleção de estirpes de *Herbaspirillum* para inoculação em plantas de arroz., observaram um aumento de mais de 100% no peso fresco total das plantas inoculadas com *H. seropedicae* estirpes Z94 e Z95 comparadas a testemunha. A atividade da nitrogenase significativamente maior nestes

tratamentos, associada a maior acumulação de nitrogênio total indicaram que a fixação biológica do nitrogênio (FBN) foi o mecanismo responsável pelas respostas positivas. Utilizando a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , os autores demonstraram que a estirpe Z94 contribuiu via FBN, com 54% do total de N acumulado nos tecidos. No presente ensaio, bem como naquele conduzido por REIS Jr. (dados não publicados), os efeitos positivos da inoculação com *Herbaspirillum* spp. sobre o alongamento radicular de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar podem ser devido a produção de hormônios vegetais como o ácido indolacético (AIA) ou outros metabólitos secundários com ação promotora de crescimento. A produção de AIA por estirpes de *Azospirillum* spp. na presença ou não de triptofano tem sido amplamente relatada na literatura (IOSIPENKO & IGNATOV, 1995; PATTEN & GLICK, 1996) já para *Herbaspirillum* pouco se conhece.

Tabela 11 - Comparações entre a média de todos os tratamentos inoculados com *Herbaspirillum* spp. (Herba fix⁺, estirpes diazotróficas), a média do tratamento inoculado com a estirpe de *Herbaspirillum* M2 (Herba fix⁻) e o controle não inoculado (CNI) pelo teste t de student para $\alpha = 5\%$.

12 dias após a inoculação		
Comparação entre médias	Peso fresco de raiz	Peso fresco parte aérea
Herba fix+ vs. Herba fix-	n.s. ¹	n.s.
Herba fix+ vs. CNI	n.s.	n.s.
Herba fix+ vs. Herba fix- + CNI	P (0,020) ²	n.s.
24 dias após a inoculação		
Herba fix+ vs. Herba fix-	P (0,045)	n.s.
Herba fix+ vs. CNI	n.s.	P (0,0037)
Herba fix+ vs. Herba fix- + CNI	n.s.	p (0.0357)
64 dias após a inoculação		
Herba fix+ vs. Herba fix-	n.s.	n.s.
Herba fix+ vs. CNI	n.s.	n.s.
Herba fix+ vs. Herba fix- + CNI	n.s.	n.s.

1 n.s. médias não diferem entre si ao nível de 5% pelo teste t de student

2 p (0.020) médias diferem entre si ao nível de 2% de probabilidade pelo teste t.

Na tabela 11 encontram-se os resultados das comparações duas a duas da média combinada de todos tratamentos que receberam inoculação com estirpes de *Herbaspirillum* fixadoras de nitrogênio, comparadas utilizando o teste t com a média do tratamento inoculado com a estirpe não fixadora de *Herbaspirillum* (M2) e o controle não inoculado ou a média de ambos. Na primeira avaliação (12 d.a.i.) a inoculação com *Herbaspirillum* fix⁺ incrementou significativamente ($p = 0,02$) o peso fresco das raízes quando comparada a média dos tratamentos (M2 + CNI). Resultados mais interessantes ocorreram na segunda avaliação (24 d.a.i.), quando a média dos tratamentos *Herbaspirillum* fix⁺ foi significativamente superior a média do tratamento inoculado com a estirpe de *Herbaspirillum* fix⁻, quanto a acumulação de matéria fresca da parte das raízes ao nível de $P = 0,045$, e a média dos tratamentos *Herbaspirillum* fix⁺ foi significativamente superior a média do tratamento controle não inoculado quanto a acumulação de matéria fresca da parte aérea ao nível de $p = 0,0037$.

HERBASPIRILLUM SPP. É UMA BACTÉRIA ENDOFÍTICA?

Apesar de *Herbaspirillum seropedicae* ter sido descrito por BALDANI et al. (1986) a praticamente uma década, existem relatos escassos da existência deste microrganismo em outros países do mundo que não o Brasil (OLIVARES et al., 1996). Mesmo no Brasil, apenas com a introdução do meio JNFb semi-sólido (BALDANI et al., 1992) um variante do meio NFb (TARRAND et al., 1978), um maior volume de informações sobre a ocorrência dessa bactéria foram acumuladas. Tomados todos os aspectos ecológicos investigados neste trabalho, quais sejam a ocorrência natural de *Herbaspirillum* em raízes, colmos e folhas de plantas aparentemente saudáveis, de espécies predominantemente da família das gramíneas, a ausência da bactéria em solo desnudo, a baixa persistência no solo e solo rizosférico, comparada com a elevada persistência no interior das raízes e na parte aérea em estudos de inoculação, podemos concluir que *Herbaspirillum*

seropedicae e *H. rubrisubalbicans* são bactérias fixadoras de nitrogênio que se associam endofiticamente com a cultura da cana-de-açúcar e outras gramíneas.

Como discutido anteriormente, bactérias diazotróficas endofíticas podem ser definidas como bactérias fixadoras de nitrogênio que vivem, pelo menos parte de seu ciclo de vida no interior de plantas superiores ou inferiores, estabelecendo-se intercelular ou intracelularmente, sem causar dano aparente ao hospedeiro (adaptado segundo PETRINI, 1991). É interessante notar que tal definição é bastante abrangente e um pouco complexa, enquadrando como endófito qualquer bactéria que durante trabalhos de isolamento, sejam obtidas do interior de plantas aparentemente saudáveis. Alguns aspectos devem ser considerados na identificação de uma bactéria como endófito, quais sejam sua frequência de isolamento e a avaliação de persistência e estabilidade da bactéria no tecido hospedeiro em ensaios de inoculação e reisolamento. Bactérias classificadas como endofíticas, podem ser distinguidas de acordo com a proposição de BALDANI et al. (1997) em obrigatórias ou facultativas. Bactérias endofíticas diazotróficas obrigatórias, como o nome define, necessitam estar continuamente em contacto com a célula viva da planta hospedeira sob condições naturais, habitando o interior da planta durante todo o seu ciclo, e sendo obviamente disseminada via material propagativo vegetal. Desse modo, utiliza a planta como residência segura e fonte de disseminação. Tais bactérias sobrevivem por um período muito curto de tempo na ausência da planta hospedeira, em solo (natural ou esterilizado), em resíduos vegetais em decomposição e na rizosfera e rizoplane de plantas hospedeiras e não hospedeiras. Tendo em vista sua baixa competência saprofítica, tais bactérias se disseminam no meio natural, principalmente através de toletes e gemas em plantas propagadas vegetativamente, e possivelmente através de sementes em plantas propagadas sexualmente, embora tal via não seja tão eficiente para assegurar a transmissão de bactérias (SCHUSTER & COYNE, 1974; SAETTLER et al., 1989). *Acetobacter diazotrophicus* é tipicamente um endófito obrigatório

(BALDANI et al., 1997), ocorrendo principalmente no interior de raízes e da parte aérea de cana-de-açúcar (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988; REIS, 1991) além de relatos escassos em batata doce e capim elefante (REIS et al., 1993; PAULA et al., 1991), todas propagadas vegetativamente e mais recentemente em café (JIMÉNEZ-SALGADO et al., 1995). Sua propagação planta a planta se dá principalmente através de toletes, embora insetos vetores possam ter algum papel ainda não bem elucidado (ASHBOLT & INKERMAN, 1990). É interessante acrescentar que o espectro de hospedeiros restrito, associado ao caráter endofítico obrigatório tende a refletir em uma baixa diversidade genética entre diferentes isolados (CABALLERO-MELLADO & MARTINEZ-ROMERO, 1994; CABALLERO-MELLADO et al., 1995). Grande variabilidade genética da bactéria parece ocorrer em função da origem dos diferentes genotipos (BARBOSA et al., 1997). Ademais, *A. diazotrophicus* possui baixa capacidade de sobreviver no solo, possuindo ainda características fisiológicas compatíveis com as condições físico-químicas reinantes no tecido da planta hospedeira (acumuladoras de sacarose). Avanços nos estudos morfológicos e ultraestruturais da interação entre *A. diazotrophicus* e plantas de cana-de-açúcar são necessários para se conhecer os sítios específicos de estabelecimento e atividade da bactéria, bem como para o melhor entendimento dos mecanismos de troca entre a bactéria e a planta. Estruturas anatômicas como por exemplo a presença de células modificadas, depósitos de parede celular e matrizes polissacarídicas, depósitos de membranas envolvendo a bactéria, que limitem o acesso de oxigênio e regulem o metabolismo de carbono e nitrogênio devem ser minuciosamente investigados.

Em contraste, bactérias diazotróficas endofíticas facultativas não necessitam da planta hospedeira para completar seu ciclo de vida, podendo sobreviver saprofiticamente no solo, na rizosfera de plantas não hospedeiras ou possuir algum mecanismo de dormência como por exemplo a existência de um estado viável mas não cultivável (ROSZAK & COLWELL, 1987). Tendo em vista tais características, o solo ou mesmo outras plantas da comunidade vegetal

podem ser fonte primária de inóculo da bactéria, embora a disseminação via material propagativo da planta possa permanecer como o principal mecanismo. Devido a sua elevada versatilidade fisiológica, geralmente tais bactérias possuem um espectro amplo de hospedeiro, bem como respondem prontamente a exsudatos da rizosfera. No gênero *Azospirillum* podemos encontrar estirpes consideradas endófitos facultativos ou rizosféricas, já que de um lado, sobrevivem bem no solo e na rizosfera das plantas, bem como possuem a capacidade de infectar e colonizar o interior das raízes e da parte aérea de plantas como demonstrado para as estirpes de *A. brasilense* Sp 245 e Cd (SCHLOTTER et al., 1994; ASSMUS et al., 1995), e outras estirpes não possuem grande capacidade invasiva no interior da planta como demonstrado para *A. brasilense* estirpe Sp7, e outros diazotróficos como *Azotobacter paspali* e *Derxia* sp., habitantes típicos da rizosfera e do rizoplane (DÖBEREINER, 1959; DÖBEREINER, 1966).

De acordo com a definição de endófitos e dos aspectos ecológicos levantados neste capítulo, podemos concluir que *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* são bactérias endofíticas, ocupando uma posição intermediária entre endófitos obrigatórios e facultativos. Já que a despeito do insucesso no seu isolamento em solo sob condições naturais e a sua baixa capacidade de manter-se em números detectáveis no solo, possui um mecanismo ainda não esclarecido, de sobrevivência no solo como demonstrado no experimento 3 deste capítulo. Ademais, a sobrevivência de *Herbaspirillum* foi incrementada em solo estéril, o que não ocorreu com o endófito obrigatório, *A. diazotrophicus* (CARUSO et al., 1995). O fato do solo ou de plantas não hospedeiras se constituírem em fonte de inóculo tem sido corroborada pela reinfecção por *Herbaspirillum* de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar isentas de bactérias introduzidas em condições de campo (REIS Jr.; dados não publicados). *Herbaspirillum* ocorre endofiticamente em espécies da família das gramíneas, apresentando espectro hospedeiro mais amplo que *Acetobacter*, porém inferior a algumas espécies do gênero *Azospirillum*. De modo similar a *Azospirillum*, *Herbaspirillum* responde

bem ao efeito rizosfera, porém não persiste por muito tempo na rizosfera, infectando e colonizando mais ativamente o interior da planta, estabelecendo-se mais rapidamente nas camadas mais internas do córtex e tecidos condutores (STEIN et al.,1995). Evidências neste sentido tem sido acumuladas, tendo em vista a presença mais frequente de *Herbaspirillum* em raízes esterilizadas em comparação a raízes lavadas e solo de rizosfera, obtidas da mesma amostra, que tendem a possuir comparativamente números maiores de *Azospirillum*. Em adição, a presença de *Herbaspirillum* em plantas micropropagadas obtidas a partir de meristemas maiores que 2 mm, sugere sua afinidade ao interior da planta e se constitui em evidência para disseminação da bactéria através de material propagativo.

Como discutido na revisão, a interação entre *Herbaspirillum* spp. e gramíneas, caracterizada aqui como endofítica, pode ser posteriormente descrita como uma endosimbiose. Neste caso, investigações mais acuradas como por exemplo estudos ao microscópio e com plantas em condições naturais, devem avaliar o papel e a interação da bactéria com os tecidos da planta hospedeira, avaliando a presença de estruturas simbióticas. Do ponto de vista de evolução, bactérias endófitos podem tornar-se endosimbiontes, através de mecanismos de coevolução. Hipoteticamente falando, a interação entre *Herbaspirillum* spp. e a cana-de-açúcar poderia estar no curso de uma evolução passando da patogênese clássica (estrias mosqueadas) para uma interação endofítica a endosimbiose.

Na tabela 12 encontra-se uma proposição com as principais diferenças entre os três grupos de bactérias diazotróficas acima discutidas, bem como os possíveis benefícios ou maléfícios que cada grupo promove na planta hospedeira.

Tabela 12 - Diferenças ecológicas e anatomo-fisiológicas na interação entre bactérias diazotróficas endofíticas, endosimbiontes e de rizosfera e plantas superiores.

	RIZOSFERA	ENDÓFITO FACULTATIVO	ENDÓFITO OBRIGATÓRIO	ENDOSIMBIONTE
CARACTERÍSTICA				
Espectro hospedeiro	Ampla ¹			Restrito
Habitat predominante	Solo Rizosfera Rizoplane	Solo, Rizosfera Rizoplane, Raízes e Parte aérea	Raízes e parte aérea, intercelular ou intracelular	Raízes e parte aérea (princ. intracelular)
Sobrevivência no Solo	Alta			> Baixa ²
Disseminação	Solo Água Ar	Rizosfera p1 não hospedeira Sementes e toletes pl. hosp.	Material de propagação da planta hospedeira	?
Presença de estruturas Simbióticas	Ausente	Pouco estudado	Pouco estudado	Cordões de Infecção, cels hipertróficas, membrana peribacteriana, barreiras de difusão ao oxigênio
Infecção das raízes e colonização parte aérea	Não	Sim	Sim	Sim
Efeitos benéficos	Controle de patógenos do solo, crescimento radicular. FBN	FBN(?) Indução de resistência a doenças da parte aérea, prod. promotores de crescimento	(idem anterior)	Fixação biológica de N ₂
Efeitos maléficos	Inibição cresc. raízes	Indução de susceptibilidade Interação parasitária (sintomas)	(idem anterior)	Interação parasitária
Coevolução com a planta hospedeira	Primitivo			→ Evoluído

1 Excessão para *Azotobacter paspali*; 2 Excessão para *Rhizobium*

CONCLUSÕES

1. *Herbaspirillum seropedicae* ocorre naturalmente em raízes, colmos e folhas de espécies de plantas predominantemente da família das gramíneas;
2. *Herbaspirillum rubrisubalbicans* ocorre naturalmente em raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar;
3. *Herbaspirillum* spp. não persistem por mais de 4 semanas em números detectáveis, após a inoculação no solo. Porém a presença da planta hospedeira aumenta a longevidade da bactéria, que abriga-se preferencialmente no interior da raiz, podendo sobreviver por algum tempo no solo da rizosfera de plantas hospedeiras e plantas não hospedeiras;
4. A não detecção de *Herbaspirillum* no solo após 4 semanas não implica no desaparecimento da população bacteriana, que se mantém abaixo do limite de detecção do método de isolamento.
5. *Herbaspirillum* spp. são capazes de infectar e colonizar sistemicamente plântulas de cana-de-açúcar;

6. *Herbaspirillum* spp. promovem o crescimento das raízes de plântulas de cana-de-açúcar em meio esterilizado, enquanto que doses equivalentes a 160 kg de nitrogênio ha⁻¹ reduz o crescimento inicial das raízes, efeito que desaparece posteriormente;

7. A ocorrência natural de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* no interior da planta em interação aparentemente não patogênica, aliada as demais características ecológicas acima descritas permitem concluir que *Herbaspirillum* spp. sejam bactérias endofíticas facultativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHL, P.; VOISARD, C. & DEFAGO, G. Iron bound-siderophores, cyanic acid and antibiotics involved in supression of *Thielaviopsis basicola* by a *Pseudomonas fluorescens* strains. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 116, p. 121-134, 1986.
- ALSTRÖN, S. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterisation with rhizosphere pseudomonads. **Journal General Applied of Microbiology**, v. 37, p. 495-501, 1991.
- ASHBOLT, N.J. & INKERMANN, P.A. Acetic acid bacterial biota of pink sugar cane mealy bug, *Saccharococcus sacchati*, and its environs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 707-712, 1990.
- ASSMUS, B.; HUTZLER, P.; KIRCHHOF, G.; AMANN, R.; LAWRENCE J.R.; HARTMANN, A. "In situ" localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1013-1019, 1995.
- BALDANI, J.I. Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz. **Tese de mestrado**, UFRRJ, Itaguaí, Rio de Janeiro, 110 pp., 1984.

- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L. & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium, **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HORSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M. & DÖBEREINER, J. Inclusion of "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, within the genus *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, p. 802-810, 1996.
- BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S.R. & DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, (special issue) v., p., 1997.
- BALDANI, V. L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Seropédica, UFRRJ, 1996, 234 p. **Tese de Doutorado**.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F. & DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F. L. & DÖBEREINER, J. Selection of *Herbaspirillum* strains associated with rice seedlings amended with ¹⁵N-labelled fertiliser. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**, p. 202, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 1995.
- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum* - plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1996.
- BASHAN, Y. & LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, p. 591-608, 1990.

- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. & WHITMOYER, R.E. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v. 137, p. 187-196, 1991.
- BASHAN, Y.; PUENTE, M. E.; RODRIGUEZ-MENDONÇA, M. N.; TOLEDO, G.; HOLGUIN, G.; FERRERA-CERRATO, R. & PEDRIN, S. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 5, p. 1938-1945, 1995.
- BARBOSA, E.A.; REIS Jr., F.B.; ABOUD, A.C.S.; BALDANI, J.I. & REIS, V.M. Estudo da biodiversidade de estirpes de *Acetobacter diazotrophicus* isoladas de diversos genótipos de cana-de-açúcar. submetido, 1997.
- BECKING, J. H. Pleomorphism in *Azospirillum*. In: ***Azospirillum* III: Genetics, Physiology, Ecology**, pp. 2430-2462. Edited by W. KLINGMÜLLER, Berlin:Springer Verlag, 1985.
- BROOKS, D.S.; GONZALEZ, C.F.; APPEL, D.N. & FILER, T.H. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. **Biological Control**, Orlando, v. 4, p. 373-381, 1994.
- CABALLERO-MELLADO, J. & MARTINEZ-ROMERO, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 1532-1537, 1994.
- CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMIREZ, L.E.; REIS, V.M. & MARTINEZ-ROMERO, E. Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* population and identification of a new genetically distant group. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 3008-3013, 1995.
- CARROL, G.C. The biology of the endophytism in plants with particular reference to Woody perennials. In: FOKKEMA, N.J. & HEUVEL, J. Van Den, ed. **Microbiology of phyllosphere**, London, Cambridge University Press, p. 205-222, 1986.
- CARUSO, L.V. & BALDANI, J.I. Monitoring the survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil using Lac-Z fusion. In: **International Symposium on**

Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation, p. 108, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 1995.

CAVALCANTE, V.A. & DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, Orlando, v. 5, p. 83-91, 1995.

CHRISTOPHER, W.N. & EDGERTON, C.W. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. **Journal Agricultural Research**, Queensland, v. 41, p. 259, 1932.

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

COLOMBO, P.M. Ocurrence of endophytic bacteria in siphonous algae. **Phycologia**, v. 17, p. 148-151, 1978.

DIMOCK, M.B.; BEACH, R.M. & CARLSON, P.S. Endophytic bacteria for the delivery of crop protection agents. In: **Proceedings of a Conference on Biotechnology, Biological Pesticides and Novel Plant-Pest Resistance for Insect Pest Management**, D.W.ROBERTS & R.R. GRANADOS, Eds, Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, New York, p. 88-92, 1989.

DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. **Revista Brasileira de Biologia**, São Paulo, v. 19, p. 251-258, 1959.

DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 1, p. 357-365.

- DÖBEREINER, J.; PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.L. & URQUIAGA, S. Bactérias Diazotróficas podem ser Endofíticas, e/ou Fitopatogênicas? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 62, p. 319, 1990.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 44, p. 310-313, 1992.
- DOBEREINER, J.; REIS, V.M.; PAULA, M.A.; OLIVARES, F.L. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R.; MORA, J. AND NEWTON, W.R. (ed) **New Horizons in Nitrogen Fixation**, p. 671-676. CRC Press, Dordrecht, Netherlands, 1993.
- DUIJFF, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. **New Phytologist**, London, v. 135, p. 325-334, 1997.
- DUIJFF, B.J.; ALABOUVETTE, C. & LEMANCEAU, P. Induced systemic resistance in the control of fusarium wilt of tomato by *Fusarium oxysporium* strain Fo47 and *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. In: ALABOUVETTE, C. ed. **Biological and Integrated Control of Root Diseases in Soilless Cultures**, IOBC/WPRS Bulletin, v. 19, p. 120-124, 1996.
- EDGERTON, C.W. Sugar cane and its diseases, **Lousiana State University Press**, Lousiana, 1955.
- FAHEY, J.W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: CUTLER, H.O. ed. **Biologically Active Natural Products. Potencial Use In Agriculture**. Washington, American Chemical Society Symposium, Ser. 380, p. 120-128, 1988.
- FERNANDES, M. S. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio sobre a absorção e assimilação de N em arroz. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 2, p. 1-6, 1990.

- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. **Turrialba**, Costa Rica, v. 34, p. 9-18, 1984.
- FISHER, P.J.; PETRINI, O. & LAPPIN SCOTT, M.M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.), New **Phytologist**, London, v. 122, p. 299-305, 1992.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R. & CABALLERO-MELLANO, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars in Mexico. **Plant and Soil**, v. 154, p. 145-150, 1993.
- GIBBINS, L. N. Relationships between pathogenic and nonpathogenic bacterial inhabitants of aerial plant surfaces. In: **Center of Agricultural Publications Documents**, Conference of Plant Pathology Bacteria, Waninger, p. 15-24, 1972.
- GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B. & KERSTERS, K. Taxonomic Relationships between {*Pseudomonas*} *rubrisuba/bicans*, some clinical isoletes (EF GROUP 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autotrophicum* In: **International Symposium on Nitrogen Fixation with non-Legumes**, 5, 1990, Florence. Abstracts.. Florence, 1990.
- HALE, C.N. & WILKIE, J.P. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. **New Zeland Journal of Agriculture Research**, New Zeland, v. 15, p. 448-456, 1972a.
- HALE, C.N. & WILKIE, J.P. Bacterial leaf stripe of sorghum in New Zeland. **New Zeland Journal of Agriculture Research**, New Zeland, v. 15, p. 457-460, 1972b.
- HAYWARD, A.C. The non-fluorescent pseudomonads: current status and future prospects. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, p. 11-16, 1989.
- HENDRE, R.R.; IYOR, R.S.; KOTWALM, M.; KLUSPE, S.S. & MASCARENHAS, A.F. Rapid multiplication of sugar cane by tissue culture. **Sugar Cane**, Port Talbot, v. 1, p. 5-8, 1983.

- HOTFFLAND, E.; PIETERSE, C.M.J.; BIK, L. & van PELT, J.A. Induced systemic resistance in radish is not associated with accumulation of pathogenesis-related proteins. **Physiology Molecular of Plant Pathology**, Washington, v.46, p. 309-320, 1995.
- HUGES, C.G. Transmission of leaf scald by soil leachate, **Sugarcane Pathology Newsl.**, p. 27-28, 1968.
- HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M. & KELLENBERG, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washigton, v. 176, p. 1913-1923, 1994.
- IOSIPENKO, A. & IGNATOV, V. Physiological aspects of phytohormone production by *Azospirillum brasilense* Sp7. **NATO ASI Series**, v. G37, p. 307-312, 1995.
- JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M. & GABRIELSON, D.A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, p. 1262-1265, 1985.
- JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p., 1997.
- JIMENEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMIREZ, L.E.; TAPIA-HERNANDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M.A.; MARTINEZ-ROMERO, E. & CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of other nitrogen-fixing-acetobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 1997 (in press).
- KADO, C.I. **"The Prokaryotes"**, v. 1, 2nd, ed. Springer-Verlag, New York, 1992.
- LEMANCEAU, P. & ALABOUVETTE, C. Suppresion of *Fusarium* wilts by fluorescent pseudomonads. Mechanisms and application . **Biocontrol Science and Technology**, v. 3, p. 219-234, 1993.

- KARTHA, K.K. & GAMBORG, O.L. Elimination of cassava mosaic disease by meristem culture. **Phytopathology**, St. Paul, v. 65, p. 826-828, 1975.
- KIMURA, O. Importância das populações “residentes” de fitobactérias na epidemiologia de enfermidades bacterianas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 310-311, 1981.
- LI, R. & MACRAE, I.C. ‘Specific association of diazotrophic Acetobacters with sugarcane’, **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 23, p. 999-1002, 1991.
- LIMA, E.; BODDEY, R.M. & DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ^{15}N -aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 24, p. 413-419, 1987.
- MCINROY, J.A. & KLOEPPER, J.W. Endophytic bacteria from field-grown corn and cotton, **Phytopathology**, St Paul, v. 81, p. 812-813, 1991.
- MISHAGI, I.J. & DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, St Paul, v. 80, p. 808-811, 1990.
- NESMITH, W.C. & JENKINS, S.F. Jr. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in selected North Carolina soils, **Phytopathology**, St Paul, v. 73, p. 1300-1304, 1983.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Contribuição para a diferenciação taxonômica entre *Herbaspirillum seropedicae* e *Herbaspirillum rubrisubalbicans* sin. *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Fitopatologia Brasileira**, Aracajú, Suplemento. 18, p. 313, 1993a.
- OLIVARES, F.L.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; REIS, F.B.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Ecologia das bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*”. **Fitopatologia Brasileira**, Aracajú, Suplemento. 18, p. 313, 1993b.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots,

- stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, p. 197-200, 1996.
- OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, London, v. 135, p. , 1997.
- OLIVEIRA, A.L.M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Colonisation of micropropagated sugar cane by nitrogen-fixing bacteria co-inoculated with arbuscular-mycorrhizal *Glomus clarum*. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**, p. 218, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 1995.
- PATTEN, C.L. & GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-b-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 207-220, 1996.
- PAULA, M.A. & DÖBEREINER, J. Interaction of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugar cane (*Saccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 11, p. 111-115, 1991.
- PETRINI, L.E., PETRINI, O. & LAFLAMME, G. Recovery of endophytes of *Abies balsamea* from needles and galls of *Paradiplosis fumifex*. **Phytoprotection**, 1992.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: **Microbial Ecology of Leaves** Ed. J. ANDREWS & S. HIRANO, 1991.
- PIETERSE, C.M.J.; van WEES, S.C.M.; HOFFLAND, E.; van PELT, J.A. & van LOON, L.C. Systemic resistance in arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression, **The Plant Cell**, v. 8, p. 1225-1237, 1996.
- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F. & DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 137, n.1, p. 61-65, 1991.

- POUCHON, J. & TARDIEUX, P. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. **Éditions de la Tourelle**, St. Mandé (Seine), 105 p., 1962.
- QUISPEL, A. A. Search for signals in endophytic microorganisms. In: **Molecular signals in plant-microbe communications**. Eds. P.S. VERMA, Publisher place, p. 475-491, 1992.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K. & DE LEY, J. Azoarcus gen. nov., nitrogen-fixing proteobacteria associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.), and description of two species, *Azoarcus indigena* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, v. 43, p. 574-584, 1993.
- REIS Jr., F.B.; BARBOSA, E.A.; ABBOUD, A.C.S.; REIS, V.M. & BALDANI, J.I. Uma nova estratégia para isolar *Acetobacter diazotrophicus* de plantas de cana-de-açúcar. (submetido), 1997.
- REIS, V.M. Aspectos ecológicos e fisiológicos da bactéria fixadora de N₂ *Acetobacter diazotrophicus*. Seropédica, UFRJ, Rio de Janeiro, 1991, 119 p. **Tese de Mestrado**.
- REIS, V.M.; OLIVARES, F.L. & DÖBEREINER, J. Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.10, p.401-405, 1994.
- ROSZAK, D.B. & COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environmental. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 51, p. 365-379, 1987.
- ROBBS, C.F. Caracterização de espécies fitopatogênicas de *Pseudomonas* que acumulam poli-beta-hidroxibutirato. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 309, 1981.
- SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W. & ROTH, D.A. Detection of bacteria in seed and other planting material. **The American Phytopathological Society**, Minneapolis, 122 p., 1989.

- SALLES, J.F.; GITAHY, P.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; SKOT, L. & BALDANI, J.I. Effect of the cryIIIA gena from *Bacillus thuringiensis* in endophytic diazotrophic bacteria associated with sugar cane. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**, p 134, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, 1995.
- SAMISH, Z.; ETINGER-TULCZYNNska, R & BICK, M. The microflora within the tissue of fruits and vegetables. **Journal of Food Science**, v. 28, p. 259-266, 1963.
- SANFORD, B.B. The occurrence of bacteria in normal potato plants and legumes. **Science Agriculture**, v. 28, p. 21-25, 1948.
- SCHANDLER, H. In: PORSCH-WIEN, O. & WEBER-STRABURG, H. Eds **Biologia Generalis**, Spriger-Verlag/Vien, p. 311-337, 1940.
- SCHIPPERS, B. Prospects for management of natural suppressiveness to control soilborne pathogens. In: **Biological Control of Plant Diseases, Progress and Challenges for the Future**, NATO ASI Series, Series A: Life Science, v. 230, E.C. TJAMOS; G.C. PAPAIVIZAS & R.J. COOK, eds. New York, Plenum Press, p. 21-34, 1992.
- SCHLOTTER, M.; KIRCHHOF, G.; HEINZMANN, U.; DÖBEREINER, J. & HARTMANN, A. Immunological studies of the wheat-root-colonization by the *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 using strain-specific monoclonal antibodies. In: **Nitrogen Fixation with Non-Legumes**, (N.A. Hegazi, M. Fayez and M. Monib, Eds.), pp. 291-297. American University in Cairo Press, Cairo, Egypt, 1994.
- SCHUSTER, M.L. & COYNE, D.P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 12, p. 199-221, 1974.
- SILVA, L.G.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; REIS Jr., F.B. & BODDEY, R.M. Uso do método de ELISA indireto para detecção e enumeração de bactérias fixadoras de N₂. III **Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia do Solo**, Londrina, resumo nº 155, 1994

- SILVA, L.G.; REIS, V.M.; REIS Jr., F.B. & BODDEY, R.M. Ontogenic variation of diazotrophic bacteria in sugar cane (*Saccharum* spp.) tissues. In: **International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The Role of Biological Nitrogen Fixation**, p. 234, Angra dos Reis, Rio de Janeiro. 1995.
- SKOT, L. Insecticidal activity of *Rhizobium* strains containing the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis*. **Aspects of Applied Biology**, v. 24, p. 101-107, 1990.
- SMITH, R.L.; SCHANK, S. C.; MILAN, J. R. & BALTENSBERGER, A. A. Responses of *Sorghum* and *Pennisetum* species to the N₂-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, p. 1331-1336, 1984.
- STEIN, T.; UECKERT, J. & FENDRIK, I. Establishment of two nitrogen-fixing bacteria on roots of Kallar grass using alginate-coated seeds in mixed inoculation. In: **Azospirillum VI and related microorganisms**, FENDRIK, I; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J. & DE ZAMAROCZY, M. eds., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, v. G37, p., 1995
- STONE, J.K. Foliar endophytes of *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco. Cytology and physiology of the host-endophyte relationship. **PhD-University of Oregon**, Eugene, 124 p., 1986.
- TARRANT, J.J.; KRIEG, N.R. & DÖREINER, J. A taxonomy study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov., **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 967-980, 1978.
- TEIXEIRA, M.L.F. Efeito de *Cerotoma arcuata* OLIVER (Coleoptera: Chrysomelidae) na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Seropédica, UFRRJ, Rio de Janeiro, 1994, 176 p. **Tese de Mestrado**.
- TERVET, I.W. & HOLLIS, J.P. Bacteria in the storage organs of healthy tissue. **Phytopathology**, St Paul, v. 38, p. 960-967, 1948.

- TESTER, C.F. Influence of a genetically modified endophytic bacterium on composition and decomposition of corn residue. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 24, p. 1107-1112, 1992.
- TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P.C.T.; BALMER, F.; KIMATI, H.; CARDOSO, CO.; SALGADO, C.L.; KRUGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N. & BERGAMIN, F.A. **Manual de fitopatologia : Doenças de plantas cultivadas**, Ed. Agronômica Ceres, 2a ed., vol.2, São Paulo, 1980.
- TOKESHI, H. Occurrence or not of physiological races of *Xanthomonas albilineans* in sugar cane. **Stab**, São Paulo, v. 4, p., 1986.
- TUZUN, S. & KLOEPPER, J. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. In: RYDER, M.H., STEPHENS, P.M. & BOWEN, G. D., Eds. **Improvement Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria**. Adelaide: CSIRO, p. 104-109, 1994.
- URATANI, B.B.; ALCORN, S.C.; TSANG, B.H. & KELLY, J.L. Construction of secretion vectors and use of heterologous signal sequences for protein secretion in *Clavibacter xyli* subsp. *cynodonfis*. **Molecular Plant and Microbe Interaction**, St. Paul, v. 8, p. 891-898, 1995.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S. & BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.
- VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. & TOKESHI, H. Relação entre *Xanthomonas albilineans*, *Erwinia herbícola* e *Pseudomonas* sp., cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Campinas, v. II, p. 105-114, 1985.
- VAN PEER, R. & SCHIPPERS, B. Lipopolisaccharides of plant-growth *Pseudomonas* sp. strain WCS417r induce resistance in carnation to *Fusarium* wilt. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Amsterdam, v. 98, p. 129-139, 1992.
- VAN PEER, R; NIEMANN, G.J. & SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by

Pseudomonas sp. estirpe WCS417r. **Phytopathology**, St Paul, v. 81, p. 728-734, 1991.

VAN PEER, R.; PUNTE, H.L.M.; DE WEGER, L.A. & SCHIPPERS, B. Characterization of root surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 2462-2470, 1990.

WEI, G.; KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by Select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, St Paul, v. 81, p. 1508-1512, 1991.

WEI, G.; KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, St Paul, v. 81, p. 1508-1512, 1991.

CAPÍTULO 3

VIAS DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR POR BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DO GÊNERO *HERBASPIRILLUM*

RESUMO

O modo de infecção e colonização de raízes de plantas de cana-de-açúcar por estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* foi investigado utilizando, como modelo experimental, um sistema de cultivo monoxênico com plântulas de cana-de-açúcar da variedade SP 70-1143, obtidas através da técnica de micropropagação, inoculadas com diferentes estirpes de *Herbaspirillum* spp. Aos 1, 2, 4 e 7 dias após a inoculação, amostras das raízes e da parte aérea foram coletadas para avaliação do número de bactérias presentes no interior dos tecidos. Paralelamente, segmentos de raízes, colmos e folhas foram preparados para microscopia ótica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A avaliação de segmentos de raízes ao MO e MEV permitiram concluir que 1 dia após a inoculação, *Herbaspirillum* aderiu-se a superfície das raízes de modo similar, independente da espécie ou da estirpe. O modo de ataque foi apolar em monocamada, e mais raramente em agregados, colonizando randomicamente as zonas de diferenciação, alongamento e formação de pêlos radiculares, porém raramente colonizando o meristema apical e a superfície dos pêlos radiculares. A partir de 2 dias após a inoculação, foi frequente a concentração e ou multiplicação das bactérias em duas regiões da raiz: nas zonas de emergência das raízes secundárias com a raiz principal e, em regiões de ruptura das células da epiderme. Após a infecção, a colonização do interior dos tecidos radiculares

ocorreu principalmente através da multiplicação da bactéria nos espaços intercelulares das células do córtex, sendo observada também a colonização intracelular de algumas células do parênquima cortical. Aos 7 dias após a inoculação, as bactérias foram frequentemente observadas no interior do tecido vascular, colonizando células do parênquima vascular e os vasos do xilema da base do colmo. O sítio de acesso da bactéria ao tecido vascular é a zona de emergência das raízes secundárias, onde ocorre ruptura temporária das células da epiderme. Imunomarcção com ouro utilizando anticorpos policlonais produzidos contra ambas espécies de *Herbaspirillum*, confirmaram a identidade das bactérias observadas ao microscópio.

ABSTRACT

The present study was undertaken to investigate root infection and endophytic establishment of the nitrogen fixing bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *H. rubrisubalbicans* of sugar cane plantlets in a monoxenic system. For this it, micropropagated sugar cane plants (interespecific hybrids of *Saccharum* var. SP 70-1143) were obtained by cultivation of meristems under sterilised conditions. The experiment was carried out in a growth chamber with five treatments and three replicates. The treatments consisted of two *H. seropedicae* strains (267, HRC54), two *H. rubrisubalbicans* strains (M4, HCC103) and an uninoculated control. Plantlets grown in MS liquid medium were inoculated with 0.1 ml of bacterial suspension containing 10^7 cells per ml^{-1} . Washed samples from roots (a 5 cm length) and aerial parts (1 g) were taken at 1, 2, 4 and 7 days after inoculation to estimate the number of the bacteria in association with the plants. Also, material from roots, stems and leaves was prepared for light microscopy (LM), transmission electron microscope (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). In order to certify the identity of the bacteria viewed under LM and TEM, some sections were prepared and labelled with immunogold for TEM and immunogold with silver enhancement for LM sections using the polyclonal antibody against the whole bacteria. All the *Herbaspirillum* strains attached to the root surface in a similar way. One day after inoculation, roots were colonised randomly over the entire surface predominantly by apolar attachment in monolayer

or clumps. In the last case they were close to a natural or artefactual root wound. Attachment to the root hair was observed at a very low frequency. The estimated number of bacteria associated with the root and aerial parts increased with time. From 2 to 7 days after inoculation, the bacteria were predominantly found in large packages localised at the points of the origin of secondary roots and partially exfoliated cells of the epidermal layer, where the cell wall was naturally disrupted. Also, there was an obvious multiplication of the bacteria inside the root tissue, which spread through the intercellular air spaces and colonised some epidermal/hipodermal and parenchymatosa cells intracellularly and invaded the vascular bundles. Even, two days after inoculation, it was possible to observe the bacteria within the vascular bundle but less frequent than at 7 days. Stern sections (7 days after inoculation) showed the bacteria colonising xylem vessels and parenchyma cells at the cortex and the vascular bundle. In addition, immunogold labeled root sections confirmed the presence of the inoculated bacteria. The present studied let us to conclude that successful endophytic infection of sugar cane roots by *Herbaspirillum* spp. involves the attachment to the plant surface, proliferation of the bacteria mainly at the origin of secondary roots or wound site, followed by penetration and spreading of the bacteria through the intercellular air space and vascular bundles with subsequent colonisation and establishment at the aerial part, probably into the xylem vessels.

REVISÃO DE LITERATURA

O processo de infecção e colonização de plantas por bactérias caracteriza-se como um evento dinâmico envolvendo o movimento da bactéria em direção a planta hospedeira, sua adesão a superfície vegetal e posterior penetração e multiplicação no interior da planta. A atração da bactéria em direção à raiz se dá por meio de fenômenos de aerotaxia ou quimiotaxia por um gama de exsudados radiculares e envolve o deslocamento ativo da bactéria através de flagelos (PANOPOULOS & SCHROTH, 1974; BASHAN, 1986a). A grande maioria dos compostos presentes em exsudados radiculares, incluindo açúcares, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos e outros, podem atrair indistintamente um grande número de microrganismos rizosféricos (FOSTER, 1986). Dentre o espectro de microrganismos atraídos pela oferta de substratos ao nível de rizosfera, existem aqueles que são seletivamente atraídos por compostos não metabolizáveis específicos, como é o caso da atração de *Agrobacterium tumefaciens* às raízes de dicotiledoneas. Neste caso, estão envolvidos compostos fenólicos de baixo peso molecular, exsudados de regiões feridas durante o processo de cicatrização de células vegetais. Estes compostos, identificados como acetosiringone e hidroxí-acetosiringone, atuam como quimioatrativos e sinais moleculares na indução dos genes de virulência “vir” de *A. tumefaciens* (PARKER et al., 1987; GELVIN, 1992). Esta etapa é considerada como o primeiro evento que governa o reconhecimento específico entre a bactéria

e a planta hospedeira. Outro grupo de compostos fenólicos com ação quimioatrativa seletiva na rizosfera são os compostos da classe dos flavonóides e isoflavonóides. Estes compostos, no caso das leguminosas, são responsáveis pela ativação dos genes ligados a iniciação nodular, presentes em diversas espécies do gênero *Rhizobium*, e sendo a base da especificidade hospedeira da interação leguminosa-rizóbio (HUNGRIA, 1994). Os flavonóides exsudados pelas leguminosas atuam como indutores dos genes Nod (genes da iniciação nodular) do rizóbio específico, porém podem atuar como inibidores para o rizóbio não específico e de outras bactérias (PETERS & LONG, 1988; HARTWIG et al., 1991). Uma vez multiplicando-se ao nível de rizosfera, as bactérias podem aderir-se a superfície radicular. O papel da adesão como mecanismo determinante da infecção segue em discussão na literatura, porém parece óbvio que este fenômeno assume um papel ecológico relevante na infecção bacteriana, já que fixa a bactéria próximo a sítios potenciais de infecção, como por exemplo junções de raízes secundárias e feridas, podendo aumentar a probabilidade de infecção, bem como assegurar um contato íntimo entre moléculas sinais da bactéria e receptores da planta, facilitando assim, sua ação. Cargas elétricas e estruturas presentes na superfície das bactérias e das plantas determinam o grau de associação e reconhecimento da interação. Com a proliferação das bactérias próximo ao sítio de infecção, ocorre então a infecção e colonização do interior das raízes. Nesta etapa, os mecanismos induzíveis de defesa da planta podem ser expressos resultando em inibição do crescimento da bactéria invasora (interação incompatível) ou compatibilização (interação compatível) entre os mecanismos de defesa da planta e ataque da bactéria e em consequência estabelecendo uma interação com diferentes graus de compatibilidade, que pode variar de benéfica a parasitária.

1) ADESÃO DE BACTÉRIAS À SUPERFÍCIE DAS PLANTAS

O papel da adesão em interações envolvendo plantas e bactérias não é completamente conhecido. No entanto, é fácil pressupor que uma vez que uma bactéria atinja um sítio favorável, sua habilidade para resistir a remoção constitui-se em uma vantagem seletiva. De outro lado, a adesão de bactérias fitopatogênicas a plantas susceptíveis, tem sido considerada em muitos casos, como um evento essencial no processo de infecção. Além disso, para que rizobactérias promotoras ou deletérias ao crescimento exerçam um efeito fisiológico significativo sobre a planta hospedeira, a bactéria deve colonizar efetivamente a superfície radicular.

De modo geral, a adesão de bactérias a superfície da planta é caracterizada por uma fase inicial reversível e inespecífica que envolve interações de carga ao nível de superfície, e uma segunda fase, caracterizada como tempo-dependente e irreversível, sendo mediada por propriedades adesivas de polímeros extracelulares, em certos casos altamente específica (ROMANTSCHUK, 1992). A superfície das bactérias, assim como a das plantas exibem carga de superfície líquida negativa em meio aquoso, e desse modo forças eletrostáticas manteriam as células afastadas. Para aderir-se a superfície da planta, a célula bacteriana deve sobrepor a barreira energética repulsiva, estabelecendo pontes com cátions divalentes, ligações iônicas em regiões localizadas positivamente carregadas, pontes de hidrogênio e via forças de van der Waals (BELL, 1978; ROMANTSCHUK, 1992). Além disso, substâncias hidrofóbicas depositadas na superfície da planta (por ex.: ceras) e regiões hidrofóbicas da superfície da bactéria, podem permitir o íntimo contato entre as células e, desse modo, facilitar interações posteriores (BELL, 1978; ROMANTSCHUK, 1992). O efeito positivo de cátions divalentes como Ca^{++} e Mg^{++} e o efeito negativo de cátions monovalentes como K^+ e Na^+ na adesão tem sido amplamente discutido na literatura. A adesão de *Pseudomonas fluorescens*

estirpe E6-22 a raízes de rabanete foi estimulada por concentrações variando de 5 a 10 mM de cálcio ou magnésio (JAMES JR et al., 1985).

Os detalhes moleculares do reconhecimento e ligação de sítios na superfície da planta hospedeira são conhecidos em poucos sistemas. Além do que, existem muitas controvérsias com respeito a importância, a especificidade e a natureza dos fatores que contribuem para adesão da célula bacteriana a determinados alvos na superfície da planta. No trabalho conduzido por JAMES Jr. et al. (1985) em condições de laboratório, tanto rizobactérias promotoras ou deletérias ao crescimento naturalmente isoladas de raízes de rabanete, quanto bactérias isoladas de outras fontes incluindo *Escherichia coli*, foram capazes de aderir-se a superfície radicular de plantas de rabanete. Para todas bactérias estudadas o número de bactérias aderidas aumentou com o tempo e com a Concentração inicial de inóculo. A saturação no número de bactérias aderidas seria esperada se sítios de alta afinidade de adesão estivessem presentes na superfície radicular. Entretanto isto não ocorreu neste estudo, demonstrando claramente a inexistência de especificidade na adesão rápida. Adesão inespecífica tem sido demonstrada também para *Rhizobium*. PUEPPKE (1984) observou que a adesão de diversas estirpes de rizóbio as raízes foi independente da espécie de planta e da especificidade de nodulação. Se de um lado tem sido amplamente relatada que a adesão rápida é um fenômeno inespecífico, de outro lado várias estruturas ou biomacromoléculas presentes na superfície da bactéria tem sido relatadas como ter papel primordial na adesão permanente e governar em parte especificidade e capacidade de colonização sob condições naturais. Estas estruturas incluem proteínas filamentosas não-flagelares conhecidas como fímbrias e pili (KORHONEN et al., 1983), polissacarídeos como fibrilas de celulose e moléculas solúveis como β -1,2-glucanos (MATTHYSSE et al., 1978) lectinas envolvidas na interação *Rhizobium*-Leguminosae (DAZZO et al., 1976) e aglutininas específicas para pseudomonas do grupo fluorescente (ANDERSON, 1983). A maioria dos estudos nesta área concentram-se em três sistemas, na

simbiose leguminosa-rizóbio, na interação parasitária dicotiledóneas-agrobactéria e bactérias fitopatogênicas Gram negativas em interações resistentes, conforme discutido abaixo.

1.1) Adesão de *Rhizobium* à superfície dos pêlos radiculares: estudos envolvendo *Rhizobium trifolii* e *Trifolium repens* (trevo branco), conduzidos por FAHRAEUS (1957), demonstraram que 5 horas após a inoculação, a bactéria já esta aderida a superfície do pêlo radicular, que começa a se curvar ou ramificar-se. Dentro de 16 a 24 horas, o pêlo está totalmente deformado. Nestas regiões, o rizóbio aparentemente digere a parede celular do hospedeiro, formando um sítio de entrada. A presença de enzimas pectinolíticas e enzimas que degradam celulosas e hemi-celulosas tem sido demonstrada em *Rhizobium* (MARTINEZ-MOLINA et al., 1979). Estas enzimas hidrolisam a parede celular do pêlo radicular nas regiões onde a bactéria esta aderida. A célula hospedeira responde sintetizando uma fina camada de parede celular, formando o cordão de infecção, que acompanhando a multiplicação da bactéria, invade o interior do córtex, liberando a bactéria no interior de células recém-divididas. O papel de lectinas na adesão do rizóbio a superfície da parede celular do pêlo radicular tem merecido muita atenção (ALBERSHEIM & ANDERSON, 1975; BAUER, 1981). Lectinas são proteínas ou glicoproteínas com sítios múltiplos para ligação a açúcares específicos presentes na parede celular da bactéria. De um modo geral, poderíamos dizer que o primeiro passo na formação de nódulos por *Rhizobium* é a adesão da bactéria a superfície do pêlo radicular. Esta ligação envolve polissacarídeos presentes na superfície da bactéria, podendo de acordo com DAZZO & HUBBELL (1975) incluir polissacarídeos extracelulares (EPS), polissacarídeos capsulares (CPS) e lipopolissacarídeos (LPS). A interação entre lectinas específicas presentes na parede celular do hospedeiro e polissacarídeos presentes na bactéria durante o processo de adesão poderia facilitar a iniciação do processo infeccioso, bem como, facilitar a troca de metabólitos e a atividade de enzimas que degradam polissacarídeos (HALVERSON & STACEY, 1986).

1.2) Adesão de *Agrobacterium tumefaciens* a dicotiledóneas: a infecção de feridas em plantas dicotiledóneas por *A. tumefaciens* resulta na formação de tumores. Após a infecção das feridas, a bactéria se adere a parede celular do hospedeiro, sendo que a adesão é pré-requisito fundamental para a formação dos tumores, existindo uma relação direta entre virulência e adesão (LIPPINCOTT & LIPPINCOTT, 1969; DOUGLAS et al., 1982). Diferentemente do rizóbio, lecitinas parecem não estar envolvidas na adesão de *Agrobacterium* (LIPPINCOTT & LIPPINCOTT, 1976). Neste caso, a célula da planta possui um papel passivo na ligação da bactéria a planta. *Agrobacterium* é capaz de aderir-se a suspensão de células de cenoura, mortas por aquecimento ou fixadas em glutaraldeído, com a especificidade inalterada e apenas uma ligeira alteração na cinética de ligação (MATTHYSSE et al., 1981). Estes achados sugerem a presença de um receptor constitutivo. O fato da bactéria aderir-se a células intactas ou mesmo a protoplastos (células cuja parede celular foi removida), associadas a observações ao microscópio permitiram concluir que existam receptores localizados na parede celular e ao nível de plasmalema (GURLITZ et al., 1984). Apesar da célula da planta ter um papel passivo no processo de adesão de *Agrobacterium*, a bactéria parece ter um papel decisivo. Os sítios de ligação estão localizados na superfície da célula, sendo constitutivos e contendo lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas. Após a adesão, a bactéria inicia a síntese de fibrilas de celulose e estas tem a função de ancorar firmemente a bactéria ao sítio e permitem a formação de agregados. A bactéria possui enzimas como pectinase (MATTHYSSE et al., 1981), a qual altera a parede celular e permite uma associação mais estreita entre a bactéria e a planta.

1.3) Adesão de bactérias fixadoras de nitrogênio e rizobactérias promotoras de crescimento a superfície radicular: poucos estudos tem sido conduzidos envolvendo a capacidade de adesão de bactérias benéficas e sua relevância. O maior volume de informação concentra-se no estudo da interação entre bactérias

diazotróficas do gênero *Azospirillum* e plantas da família das gramíneas. MICHIELIS et al., (1991) demonstraram que a adesão de *A. brasilense* às raízes de trigo ocorre em duas fases características, a primeira (Fase de adsorção), consiste de uma ligação rápida e reversível, enquanto que na segunda fase (Fase de ancoragem), a bactéria torna-se irreversivelmente ligada a superfície radicular, processo que envolve polissacarídeos não identificados que se ligam ao calcofluor. Nesta etapa, a bactéria torna-se firmemente aderida e outras bactérias em suspensão, aderem-se a esta formando agregados de bactérias no sítio de adesão. Recentemente, CROES et al. (1993) apresentaram evidências de que o flagelo polar de *A. brasilense* ou compostos presentes no mesmo, funcionam como adesivos, mediando a adesão radicular.

Estudos ao MEV, envolvendo a colonização de raízes de gramíneas por *Azospirillum* tem indicado que a região da raiz susceptível e o modo de adesão é similar em todas as espécies estudadas, envolvendo a formação de pequenos agregados ou células isoladas principalmente na superfície das zonas de alongamento e diferenciação e zona de formação de pêlos, com relativamente menos células aderidas aos pêlos radiculares e algum grau de colonização intercelular (BASHAN, 1986b; LEVANONY & BASHAN, 1989). Contrário ao padrão uniforme de colonização observado em raízes de gramíneas, BASHAN et al. (1991) avaliando a colonização da superfície radicular de outras espécies não gramíneas, como tomate (*Lycopersicum esculentum*), pimenta (*Capsicum longum*) e algodão (*Gossypium herbaceum*) por *A. brasiliense*, verificaram que o padrão de colonização das diferentes regiões anatômicas da raiz era função da espécie. Havia variações quanto a adesão a superfície dos pêlos e da zona de formação dos pêlos, diferenciando-se, desse modo, do padrão típico das gramíneas. Uma característica marcante da adesão radicular de *Azospirillum* é o ancoramento das células da bactéria a superfície da planta por meio de um material fibrilar, bastante visível ao MEV. É difícil afirmar se esta estrutura citada por BASHAN et al. (1991) é o polissacarídeo que se liga ao calcofluor como citado por MICHIELIS

et al. (1991). De acordo com BASHAN & LEVANONY (1988) esta conexão fibrilar tem papel fundamental no ciclo de vida da bactéria, fixando-a na micela do solo e nas raízes de plantas. HAAHTELA et al. (1986) relataram adesão específica aos pêlos radiculares pela bactéria diazotrófica *Klebsiella* spp., não sendo observada a adesão a células da epiderme da superfície radicular.

A colonização das raízes de plantas por rizobactérias promotoras ou deletérias ao crescimento deve ocorrer como pré-requisito para que a bactéria exerça seus efeitos. Neste sentido, a adesão assume papel relevante como característica seletiva na manutenção do contato da bactéria com a planta hospedeira. O grupo das pseudomonas fluorescentes é largamente reconhecido como potentes colonizadores de rizosfera, sendo amplamente utilizadas em programas de controle biológico de fitomoléstias radiculares e promoção do crescimento (SCHROTH & HANCOCK, 1982; WELLER, 1983). Inúmeros trabalhos demonstram a inexistência de sítios específicos de adesão nos passos iniciais da interação. Os mesmos localizam-se ao longo de todo eixo radicular e podem ser ocupados por muitas bactérias (DAZZO et al., 1976; PUEPPKE, 1984; JAMES Jr. et al., 1985; PINHEIRO, 1992). Entretanto, ANDERSON (1983) relatou a presença de fatores de aglutinação específicos (glicoproteínas) conhecidos como aglutininas, que poderiam em parte responder pela elevada capacidade de colonização de pseudomonas não fluorescentes. O componente de superfície da bactéria que interage com aglutininas presentes em plantas ainda não é conhecido. Trabalhos comparando mutantes de *P. putida* quanto a capacidade de adesão e a estirpe parental não revelaram diferenças com relação a características de superfície como pili, flagelo e lipo-polissacarídeos (LPS) (BUELL et al., 1993). Foi demonstrado por DE WEGER et al. (1989) que a porção O-antigênica do LPS de *P. fluorescens* e *P. putida* é essencial para eficiência de colonização, porém não está envolvida na adesão de bactérias a raiz.

2) VIAS DE INFECÇÃO DE PLANTAS POR BACTÉRIAS

Como regra geral, bactérias diferentemente de fungos não possuem penetração ativa, isto é não possuem estruturas tais como apressórios e “pegs” de penetração que permitam a bactéria infectar células intactas do tecido vegetal. Consequentemente, fitobactérias não possuem a capacidade de exercer força mecânica ou física para venter barreiras como a parede celular e a pressão de turgor da planta e por consequência penetrar em células epidérmicas intactas (GOODMAN, 1982). Diante disso, a grande maioria das bactérias penetra na planta hospedeira passivamente (exceção para bactérias do gênero *Rhizobium* e correlatas) através de aberturas naturais ou ferimentos, conforme discutido abaixo.

2.1) PENETRAÇÃO ATRAVÉS DE ABERTURAS NATURAIS

2.1.1) Estômatos: ocorrem na parte aérea de plantas, particularmente em folhas e caules jovens. Algumas bactérias fitopatogênicas infectam a planta hospedeira através de estômatos como por exemplo *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* em abóbora (YAMANAKA et al., 1980), *P. syringae* pv. *anenae* (MATSUDA & SATO, 1983) e *Xanthomonas campestris* em maçã (MAAS, 1985). Bactérias chegam a superfície foliar por meio de correntes de vento e chuvas de forma aleatória. Aquelas próximas ou sobre os estômatos, podem multiplicar-se rapidamente e invadir a câmara sub-estomática e por conseguinte os espaços intercelulares das células do mesófilo. A câmara sub-estomática funciona como via de entrada e saída para as bactérias, que em muitos dos casos emergem como uma massa de uma substância não identificada, provavelmente polissacarídeos de origem bacteriana, constituindo inóculo secundário para disseminação da bactéria. A infecção dos estômatos por bactérias fixadoras de nitrogênio foi relatada para *H. rubrisubalbicans* em cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1993) e a bactéria *Pantoea agglomerans* em associação com trigo (RUPPEL et al., 1989).

2.1.2) Hidatódios: apresentam estrutura similar aos estômatos, porém a abertura do poro é fixa, não sendo regulada por células guarda. Hidatódios ocorrem principalmente em bordos dentados e serrilhados de folhas ou no seu terço superior de plantas da família das brássicas, gramíneas, crassuláceas e saxifragáceas. Nestas estruturas, sob elevadas condições de umidade e baixa evapotranspiração, principalmente nos primeiras horas da manhã, ocorre secreção de gotas de água na superfície foliar. Com o aumento da transpiração, esta gota é reabsorvida, podendo arrastar bactérias em suspensão para o interior da planta, mais precisamente para o interior dos vasos do xilema. A gota de água secretada pelo hidatódio contém quantidades traços de substâncias que podem servir como quimioatrativos e fonte nutriente para bactérias (FENG & KUO, 1975). *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causal da podridão negra das crucíferas, foi o primeiro fitopatógeno relatado a penetrar através de hidatódios (MEIER, 1934; COOK et al., 1952). Estudos utilizando MEV indicaram também que hidatódios de plantas de arroz são porta de entrada para *X. campestris* pv. *oryzae*, estando envolvidas na especificidade parasita-hospedeiro (MEW et al., 1984).

2.1.3) Nectários: ocorrem na base das flores em pontos de emergência de estames e do estigma e excretam substâncias açucaradas. Estas estruturas consistem de duas células guarda, similares aquelas presentes em estômatos, porém não regulam a abertura do poro. Nesta região ocorre deposição de cutina, exceto na região sobre o poro. Abaixo do poro, existe uma zona de tecido contendo de 12 a 15 camadas de células formando um canal onde é produzido o néctar e algumas bactérias podem se multiplicar. Estudos conduzidos por ROSEN (1936) revelaram que de 24 a 48 horas após a inoculação de nectários de pera ativos na secreção, *Erwinia amylovora* multiplicou-se especificamente em regiões onde existiam gotas de néctar, acessando e colonizando o interior dos tecidos via abertura do nectário. MEV de flores de pera aparentemente saudáveis, coletadas sob condições naturais, revelaram a presença de grande número de células de *E.*

amylovora, quase que exclusivamente colonizando a superfície do estigma de pistilos excizados. Pistilos com mais de 10^6 células bacterianas frequentemente desenvolveram frutos sadios, sugerindo que esta região se caracteriza como um sítio de multiplicação. Chuvas ocorrendo 72 a 96 horas após a inoculação causaram um incremento nas taxas de infecção, provavelmente devido a lavagem das bactérias da superfície do estigma para a região dos nectários, onde ocorre a penetração (THOMSON, 1978).

2.1.4) Lenticelas: usualmente ocorrem na camada de células da periderme de caules e raízes, abaixo de estômatos presentes originalmente na epiderme, tendo como função aumentar as trocas gasosas. Durante a transformação de estômatos em lenticelas, a primeira e a segunda camada de células sub-epidérmicas ao redor da câmara sub-estomatica dividem-se para dentro e para fora do tecido, resultando na formação de uma massa de células de parênquima frouxamente associadas com grandes espaços intercelulares. Devido a continuidade entre os espaços intercelulares das células das lenticelas e dos tecidos mais internos da planta, estas constituem sítios potenciais de infecção para muitos patógenos como *Erwinia carotovora* (agente da podridão mole) ou *Streptomyces scabies* (agente da sarna da batata). A infecção de lenticelas é altamente favorecida por umidade relativa elevada e a base de resistência das plantas está na deposição de suberinas nos espaços intercelulares das células sob invasão bacteriana (FOX et al., 1972, 1973).

2.2) PENETRAÇÃO ATRAVÉS DE INJÚRIAS E FERIDAS

2.2.1) Tricomas quebrados: tricomas são projeções de células epidérmicas que podem assumir diferentes formas, estruturas e funções, podendo ser uni ou multicelular e com função secretora ou não. Muitas destas estruturas são extremamente frágeis, colapsando facilmente sob ligeira pressão. A frequência de tricomas na superfície foliar, varia com a espécie e com a idade da planta, sendo maior em folhas mais jovens e na face abaxial. SCHNEIDER & GROGAN (1977)

trabalhando com genótipos de tomate contrastantes quanto a densidade de tricomas na superfície foliar infectados com a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* concluíram que os tricomas foliares servem como habitat para sobrevivência de populações epifitas da bactéria durante períodos de seca. Ademais, a base dos tricomas serve também como sítio de multiplicação e penetração, pois como resultado da proliferação da bactéria, frequentemente a base desta estrutura se rompe, permitindo infecção da planta (BASHAN et al., 1981).

2.2.2) Emergência de raízes laterais: raízes laterais cornumente originam-se no periciclo e crescem na direção do córtex da raiz parental, rompendo a camada de células da epiderme e emergindo para o exterior. Nestes sítios, formam-se grandes cavidades que se constituem sítios de infecção para muitas bactérias, incluindo bactérias diazotróficas como *Azospirillum* spp (PATRIQUIN & DÖBEREINER, 1983), *Acetobacter diazotrophicus* (JAMES et al., 1994) e *Azoarcus* sp. (REINHOLD & HUREK, 1988). SCHMIT (1978) investigando o processo de infecção de *Pseudomonas solanacearum* em plântulas de tomate em um cultivo “in vitro”, utilizando um MEV, verificou que 3 dias após a inoculação as bactérias foram predominantemente observadas nos pontos de emergência de raízes secundárias com raízes primárias e regiões feridas, dispondo-se como microcolônias.

2.2.3) Feridas: danos na superfície das raízes devido a abrasão com o solo durante o processo de crescimento radicular ou na parte aérea devido a ação de chuvas e ventos, constituem-se em porta de entrada para muitas bactérias. Dentre as bactérias fitopatogênicas, *Agrobacterium tumefaciens* é aparentemente a única que requer feridas para infectar a planta hospedeira e induzir a formação de tumores (LIPPINCOTT & LIPPINCOTT, 1969). JAMES et al., (1994) verificaram que feridas se constituem numa porta de entrada para *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar, notando que grande número de bactérias acumulavam-se nas regiões de ruptura de células de epiderme.

3) ESTABELECIMENTO DE BACTÉRIAS NO INTERIOR DA PLANTA

3.1) BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS: a grande maioria das bactérias fitopatogênicas são parasitas facultativos, possuindo mecanismos versáteis de sobrevivência fora da planta hospedeira. Quando em interação com a planta, estirpes virulentas da bactérias iniciam o processo de patogênese, penetrando na planta hospedeira em sítios específicos próximos ou com acesso facilitado ao local de estabelecimento da doença. Tomemos como exemplo os patovares de *Pseudomonas syringae*. Este grupo de patógenos é geralmente hospedeiro-específico e caracteristicamente coloniza o mesófilo foliar, eliciando sintomas de clorose e/ou necrose que em muitos casos é atribuída a excreção de toxinas (GROSS & CODY, 1985). Estas bactérias penetram no limbo foliar através da abertura estomática, colonizam a câmara sub-estomática e os espaços intercelulares das células do mesófilo, secretando toxinas de ação específicas, que comprometem a integridade da membrana plasmática e o metabolismo celular. A dispersão da bactéria se dá pela multiplicação excessiva no mesófilo e posterior exsudação de colônias através da abertura estomática com a ação de chuvas e vento. A grande maioria destas bactérias sobrevivem como epífitas (DURBIN, 1982; MITCHELL, 1981). Como um segundo exemplo podemos citar a etiologia do agente causal da murcha bacteriana, *P. solanacearum*, uma bactéria com um amplo espectro de hospedeiros (BUDDENHAGEN & KELMAN, 1964). *P. solanacearum* tem como sitio de infecção a região da extremidade radicular e as junções de raízes secundárias. A partir desses sítios de penetração, a bactéria multiplica-se nos espaços intercelulares das células do córtex, invade o parênquima vascular e finalmente acessa os vasos do protoxilema através da degradação da parede celular (WALLIS & TRUTER, 1978; VASSE et al., 1996). O interior do lúmen dos vasos é bloqueado pela multiplicação da bactéria e síntese de exopolissacarídeos, que impedem o transporte da água e nutrientes para a parte aérea. Com a morte da planta hospedeira, a bactéria pode sobreviver

saprofiticamente no solo e na rizosfera de plantas residentes (BUDDENHAGEN & KELMAN, 1964; TANAKA & NODA, 1973).

Como podemos perceber pelos dois exemplos acima, em muitos casos, os sítios de infecção estão relacionados com o local de estabelecimento da bactéria no interior da planta. Diferentemente de parasitas obrigatórios, estes organismos possuem uma fase patogênica (no interior da planta hospedeira) e uma fase saprofítica (que envolve um mecanismo específico de sobrevivência). Parasitas obrigatórios como são inaptos em sobreviver na ausência do hospedeiro, devem manter relações patogênicas mais sofisticadas e duradouras com a célula vegetal.

3.2) BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS: bactérias endofíticas possuem ciclo de vida similar a bactérias fitopatogênicas, diferindo obviamente destas por não induzirem sintomas de doença na planta hospedeira e muitas das vezes promovendo um efeito benéfico (QUISPEL, 1992). Estudos envolvendo bactérias endofíticas são muito recentes na literatura científica. Um número emergente de pesquisadores tem investigado mais detalhadamente seu papel ecológico e possíveis aplicações práticas deste tipo de interação (DÖBEREINER, 1992; DÖBEREINER et al., 1993; SPRENT & JAMES, 1995; WEI et al., 1991). Embora exista um número grande de relatos mostrando que bactérias diazotróficas podem ocorrer no interior das raízes (SCHANK et al., 1979; BALDANI et al., 1986; LEVANONY et al., 1989), uma das grandes lacunas no conhecimento dentro desta linha de pesquisa esta na definição dos sítios de infecção, estabelecimento e atividade de bactérias endofíticas. Neste sentido estudos de anatomia e microscopia ganham um espaço importante. Em uma revisão recente SPRENT & JAMES (1995) dentro de um enfoque anatômico, discutem as regiões anatômicas mais aptas a abrigar bactérias diazotróficas endofíticas. Abaixo, serão discutidos os mecanismos de infecção e estabelecimento das principais bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a gramíneas.

3.2.1) *Azospirillum* spp.: as bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* são conhecidas por formar associações benéficas com um grande número de plantas: Dentre os efeitos positivos explorados estão a promoção do crescimento radicular (ação hormonal), incremento na absorção de nutrientes e a fixação biológica de N_2 (PATRIQUIN et al., 1983). Existe no meio científico muita discussão quanto a classificação das bactérias do gênero *Azospirillum* como endófitos facultativos ou bactérias rizosféricas. As dúvidas emergem em parte da capacidade de algumas estirpes em colonizar o interior das raízes, enquanto que outras colonizam apenas a superfície. BALDANI et al. (1987) trabalhando em condições de campo com plantas de trigo inoculado com diferentes estirpes de *Azospirillum*, concluíram através de métodos de esterilização superficial de raízes e contagem do número mais provável que a estirpe homóloga de *A. brasilense* Sp 245 (isolada de trigo) colonizou o interior das raízes e incorporou mais nitrogênio nas plantas que a estirpe heteróloga *A. brasilense* Sp 7 (isolada da rizosfera de *Digitaria* sp.), incapaz de colonizar o interior da raiz. SCHLOTTER et al., (1994) trabalhando com as estirpes Sp 245 e Sp 7 em trigo, utilizando técnicas de imunofluorescência e anticorpos monoclonais, chegaram as mesmas conclusões. Ademais, existem relatos escassos de isolamento de *Azospirillum* na parte aérea.

A grande maioria dos estudos de adesão, infecção e colonização concentram-se na interação entre gramíneas e *Azospirillum*. Dois tipos de associações radiculares tem sido descritas, uma a nível de superfície e outra interna. No primeiro caso, a bactéria coloniza indistintamente toda a superfície radicular formando pequenos agregados, algumas vezes embebidas no mucigel e raramente coloniza a superfície dos pêlos radiculares (BERG et al., 1979; UMALI-GARCIA et al., 1980). O modo de adesão a planta se dá por meio de ataque apolar (raramente polar), onde podem estar envolvidas estruturas fibrilares ancorando a bactéria a célula vegetal e estabelecendo ligação entre células da bactéria (LEVANONY et al., 1989). No caso de uma associação endofítica, *Azospirillum* coloniza os espaços intercelulares das células da epiderme e do

córtex radicular na zona de alongamento e formação de pêlos radiculares, porém não invade o tecido vascular nem o interior das células. Nesta região não se observa o envolvimento de estruturas de ancoragem, com a bactéria se apresentando aparentemente livre em micrografias eletrônicas de transmissão (PATRIQUIN et al., 1983; LEVANONY et al., 1989). Na região meristemática, onde não são observados espaços intercelulares, a bactéria não é observada. Os sítios de infecção são zonas de emergência de raízes secundárias (PATRIQUIN & DÖBEREINER, 1978) embora alguns autores especulem também sobre o envolvimento de um mecanismo ativo, no qual a bactéria degrada a lamela média da camada de células epidérmicas, penetrando no interior da raiz (PATRIQUIN & DÖBEREINER, 1978). Esta hipótese é subsidiada apenas pela detecção de atividade pectinolítica em *Azospirillum* (UMALI-GARCIA et al., 1980).

3.2.2) *Azoarcus* sp.: a bactéria diazotrófica *Azoarcus* ocorre em números elevados no interior das raízes de “Kallar grass” (*Leptochloa fusca*) em condições naturais no Pasquistão (REINHOLD et al., 1986). Esta planta é altamente tolerante a salinidade, alcalinidade e alagamento do solo, crescendo como pioneira e produzido muito bem em solos de baixa fertilidade (MALIK et al., 1980). Estudos de infecção sob condições gnotobióticas demonstraram que a bactéria coloniza todas regiões de desenvolvimento da superfície radicular e o interior das regiões mais velhas das raízes, as quais apresentavam um aerênquima bem desenvolvido. Nesta região, colônias bacterianas estabeleceram-se na parede celular interna das células do aerênquima. A bactéria não coloniza o tecido vascular, apenas a região do córtex e provavelmente penetra no interior da planta de modo similar a bactérias de gênero *Azospirillum*, via junções de células epidérmicas e zonas de emergência de raízes laterais (REINHOLD & HUREK, 1988). Em condições naturais, *Azoarcus* forma estruturas encapsuladas contendo colônias bacterianas intimamente associadas a parede celular do aerênquima. A organização da bactéria em grandes agregados e a aparente ocorrência de um envelope, poderiam gerar um ambiente de baixa pressão parcial de O₂, ideal para

fixação biológica do nitrogênio (REINHOLD & HUREK, 1988). A colonização do aerênquima de plantas de *Spartina alterniflora* pela bactéria diazotrófica *Campylobacter* sp. já foi demonstrada por meio de MET em plantas vegetando em campo (McCLUNG et al., 1983a, b).

3.2.3) *Acetobacter diazotrophicus*: *A. diazotrophicus* é uma bactéria diazotrófica endofítica tolerante a acidez e que cresce em meio rico em sacarose, ocorrendo naturalmente em raízes, colmos e folhas de plantas acumuladoras de açúcar como batata doce (*Ipomea batatas*), capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e principalmente de cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum*), sendo isolada de diversas regiões produtoras de cana-de-açúcar do mundo (DÖBEREINER et al., 1988; PAULA et al., 1991; LI & MACRAE, 1991; REIS et al., 1994). Os primeiros estudos no sentido de elucidar os sítios de infecção e colonização do interior da planta hospedeira por *A. diazotrophicus* foram conduzidos por JAMES et al. (1994), que definiram a região meristemática radicular e as zonas de emergência de raízes secundárias como os sítios de entrada da bactéria para o interior das raízes. A penetração ocorre através de células frouxamente arranjas da coifa e do meristema ou através de fendas produzidas pela emergência de raízes laterais. Aos 15 dias após a inoculação, a bactéria foi observada no interior dos vasos do xilema associada a deposição de parede secundária, na região basal do colmo. Os autores sugeriram que *A. diazotrophicus* coloniza a planta inteira via corrente xilemática transpiratória e que os vasos do xilema do colmo de plantas de cana-de-açúcar adultas, principalmente na região do nó, são os sítios mais prováveis para fixação biológica de nitrogênio. Recentemente, DONG et al., (1994) relataram a ocorrência natural de *A. diazotrophicus* nos espaços intercelulares das células do córtex da região do entre-nó de colmos da variedade Ja 60-5 e discutiram sobre as implicações fisiológicas da presença da bactéria no apoplasto, relatando que nesta região, além do suprimento adequado de carbono, com teores de açúcar entre 12 a 30% (CANNY, 1995) existe uma troca dinâmica de solutos entre os

espaços intercelulares e as células parenquimáticas que poderiam favorecer a rápida remoção do nitrogênio fixado pela bactéria.

A colonização dos vasos do xilema por *A. diazotrophicus*, proposta por JAMES et al., (1994) foi amplamente questionada por DONG et al., (1997) baseado em estudos anatômicos e ensaios de translocação de corantes, partículas de látex e de uma suspensão de células de *A. diazotrophicus* nos vasos do xilema de plantas adultas da variedade Ja 60-5. Baseado na demonstração da impossibilidade de translocação de solutos (por exemplo açúcar) do apoplasto para o interior do tecido vascular, na reação de defesa da planta hospedeira a presença da bactéria nos vasos e na descontinuidade dos elementos de vaso, os autores concluíram que o lúmen dos elementos de vasos do xilema não seria um habitat adequado a bactéria endofítica *A. diazotrophicus*.

3.2.4) *Herbaspirillum* spp.: o gênero *Herbaspirillum* contém duas espécies fixadoras, *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, ambas caracterizadas como bactérias diazotróficas endofíticas ocorrendo predominantemente em gramíneas (OLIVARES et al., 1996). De mesma forma que *A. diazotrophicus*, poucos estudos tem enfatizado a localização da bactéria no interior da planta. OLIVARES et al. (1993) em ensaios de fitopatogenicidade, verificaram que após inoculação artificial da parte aérea, estirpes de *H. rubrisubalbicans* colonizaram os elementos de vasos do protoxilema e metaxilema de plantas de sorgo (*S. bicolor*) e cana-de-açúcar (*Saccharum* hyb.). BALDANI (1996) a partir de cultivos gnotobióticos, investigou o processo de infecção e colonização de plantas de arroz (*Oriza sativa*) por *Herbaspirillum* spp., observando que as bactérias colonizaram o interior das raízes, localizando-se principalmente nos espaços intercelulares da camada de células imediatamente abaixo da epiderme e raramente presente no interior das células do córtex. A superfície radicular foi amplamente colonizada e em alguns casos a extremidade do pêlo radicular abrigava microcolônias. De modo similar ao observado para *Azospirillum* spp. (BASHAN et al., 1991), microfibrilas parecem estar envolvidas na adesão de *Herbaspirillum* spp. a superfície radicular de

plantas de arroz.

3.2.5) *Burkholderia* sp.: isolada originalmente de plantas de arroz e inicialmente conhecida como “bactéria E” (OLIVEIRA, 1992) esta bactéria diazotrófica endofítica despertou maior interesse a partir do desenvolvimento do meio JMV semi-sólido (BALDANI, 1996), sendo descrita sua ocorrência em cana-de-açúcar, batata doce, mandioca, além do arroz (BALOTA, 1994; BALDANI, 1996). Utilizando o mesmo sistema gnotobiótico descrito acima, BALDANI (1996) verificou que *Burkholderia* colonizou maciçamente a rizosfera de plantas de arroz. As junções entre células epidérmicas foram os sítios de penetração. A partir da infecção, as bactérias multiplicaram-se nos meatos celulares, movendo-se em direção e colonizando os vasos do xilema. A autora relata a aparente ausência de reação patogênica.

3.2.6) Outras bactérias diazotróficas: a bactéria diazotrófica *Pantoea agglomerans* sin. *Enterobacter agglomerans* em experimentos de inoculação de trigo (*Triticum aestivum* L.) e cevada, tem demonstrado potencial para incremento de produtividade em regiões temperadas (RUPPEL et al., 1989). Em experimentos conduzidos sob condições axênicas, plantas de trigo foram inoculadas com estirpes de *P. agglomerans* e a interação planta-bactéria monitorada utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a técnica de ELISA (RUPPEL et al., 1992). Neste ensaio, *P. agglomerans* colonizou e multiplicou-se na superfície e no interior das raízes, colmos e folhas, mantendo um relacionamento endofítico com a planta hospedeira, obviamente sem aparentemente induzir os mecanismos de defesa. A bactéria foi observada na superfície e no interior das raízes, ocorrendo nos meatos celulares da região do córtex em microcolônias e no interior dos vasos do xilema como células isoladas acumuladoras de grânulos de polihidroxibutirato (PHB) e polifosfato (PP). Na região meristemática, *P. agglomerans* colonizou apenas a superfície radicular. Em colmos e folhas, a bactéria foi encontrada na superfície das células da epiderme e associadas a células guarda dos estômatos, sempre ocorrendo como células isoladas. Ademais

a bactéria estava presente nos espaços intercelulares das células do mesófilo e vasos do xilema.

Alcaligenes faecalis é uma bactéria predominante da microflora diazotrófica presente nas raízes de arroz de solos alagados da China (JIA et al., 1989). YOU et al. (1991) descreveram a interação íntima entre *A. faecalis* e plantas de arroz sob cultivo alagado. A bactéria coloniza rapidamente e aleatoriamente a superfície do eixo radicular, formando uma camada de 50-100 µm e mais tardiamente a região do mucigel. No interior das raízes, multiplica-se nos meatos das células da epiderme, córtex e interior da célula, fixando nitrogênio mesmo na presença de amônio.

Klebsiella spp. tem sido relatadas como rizobactérias associativas de gramíneas e diversos cereais em regiões tropicais e temperadas (BOONJAWAT et al., 1991). A adesão de *Klebsiella* sp. estirpes R15 e R17 ao pêlo radicular e células da epiderme das raízes de plantas de arroz foi observada depois de 2 horas da inoculação e o papel de lectinas e do EPS bacteriano foi documentado, sendo importante no estabelecimento de interações planta-bactéria mais efetivas. Após 36 horas, estruturas de aparência fibrilar envolveram as bactérias em pequenas microcolônias na superfície das raízes, as quais apresentavam atividade de redução de acetileno que BOONJAWAT et al. (1991) denominaram “micronódulos”.

OBJETIVOS

Este capítulo da tese teve como objetivo descrever o processo de infecção e colonização de plântulas de cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*, utilizando como modelo experimental plântulas obtidas através do processo de micropropagação e cultivadas sob condições controladas, aliado a técnicas de microscopia ótica e eletrônica para avaliação temporal e espacial da interação bactéria-planta e técnicas imunológicas para identificação da bactéria “in situ”.

MATERIAL E MÉTODOS

CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS PARA *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*

PRODUÇÃO DO ANTISORO:

Para a produção dos antisoros seguiu-se o procedimento relatado por Reis et al. (1997) sendo utilizadas como antígenos das células intactas das estirpes bacterianas de *H. seropedicae* (267 e HRC 54) e *H. rubrisubalbicans* (M4 e HCC103) crescidas em frascos contendo 50 ml de meio DYGS (RODRIGUES NETO et al., 1986) contendo em g.l⁻¹: glicose, 2,0; peptona bacteriológica, 1,5; extrato de levedura, 2,0; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,5; ácido glutâmico, 1,5 e pH 6,0 por 24 horas. As células foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 3 ml de água destilada estéril, sendo mais uma vez centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. Este processo de lavagem foi repetido três vezes. Após a última centrifugação, a massa de bactérias foi ressuspensionado em 3ml de água destilada estéril e tratada termicamente a 90 °C por 30 minutos para inativação e eliminação das proteínas flagelares. Tomou-se 1 ml da suspensão de bactérias e misturou-se com 0,5 ml do adjuvante completo de Freund e 0,5 ml de adjuvante incompleto, usando-se 1ml da mistura para inoculação via sub-cutânea em cinco pontos diferentes da linha dorsal de coelhos da raça Nova Zelândia (primeira imunização). As

imunizações subsequentes foram feitas utilizando 1 ml do antígeno aplicado via intramuscular na coxa, sem a adição de adjuvante, a intervalos variando de 7 a 10 dias. Após a segunda imunização foram colhidas as primeiras amostras de sangue dos coelhos, em média 10 ml de sangue obtidos do terço superior da orelha dos coelhos, utilizando para tal uma seringa hipodérmica descartável. O material coletado permaneceu no interior da seringa sendo deixado a temperatura ambiente na bancada do laboratório por 24 horas. Decorrido este período, observou-se uma clara separação de fases, uma grande massa sólida coagulada contendo principalmente hemácias e uma fase líquida, o plasma sanguíneo, que foi separado cuidadosamente, centrifugado por duas vezes a 2000 g por 10 minutos para remoção do precipitado contendo partículas sólidas e posteriormente colocado em banho maria a 55 °C por 30 minutos para inativação de proteínas que compõem o sistema complemento. Ao final deste processo o soro foi identificado e estocado em frascos de vidro estéril na geladeira para serem posteriormente testados quanto a sua reatividade e especificidade em testes de ELISA.

PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS EM COLUNA CONTENDO PROTEÍNA A:

Antes da utilização em ensaios imunológicos, os antisoros produzidos contra *H. seropedicae* estirpes (267 e HRC 54) e *H. rubrisubalbicans* estirpes (M4 e HCC103) foram purificados por passagem em coluna contendo proteína A extraída de *Staphylococcus aureus* embebida em agarose. O método baseia-se na afinidade específica da proteína A pela fração IgG do antisoro, responsável pela resposta específica aos antígenos e eliminação de imunoglobulinas inespecíficas (IgM, IgA, IgD e IgE). Desse modo, 1 ml de Tampão de ligação (50 mM Tris; 100 mM NaCl; 0,0005% Tween 20; pH 8,0, ajustado com HCl concentrado) foi eluído através de coluna ABICAP Protein A com intuito de lavar e promover o equilíbrio da coluna para as condições reinantes no tampão. Em seguida aplicou-se 1 ml do soro diluído 1:10 em Tampão de ligação e monitorou-

se a concentração de proteína eluída por meio de sua absorbância a $\lambda = 280\text{nm}$ utilizando um espectrofotômetro UV-1201 (SHIMADZU). O material eluído da coluna foi continuamente descartado até que os valores de absorbância estabilizassem próximo de zero. Isto significa que imunoglobulinas não-específicas e outras proteínas foram lavadas, sendo necessária a aplicação de até 2 ml de tampão para completar o processo. Na etapa final foi adicionado 1ml de Tampão de diluição (100mM Glicina; 0,0005% Tween 20; pH 2,7), e as imunoglobulinas IgG foram eluidas da fase estacionária (proteína A em agarose), sendo recolhido em frascos de vidro estéril, ao qual foram adicionados 250 μl de tampão PBS pH 7,0 e 1,25 μl de azida sódica armazenado em geladeira até o momento dos testes. A concentração total de proteína após a purificação do antisoro foi estimada baseada na seguinte relação, D.O. ($\lambda = 280\text{nm}$) = 1 .0 - este valor indica uma concentração de 0,8 mg de proteína. ml^{-1} .

PROCEDIMENTO PARA O MÉTODO DE ELISA:

O procedimento para o método de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) adotado foi o chamado ELISA indireto, segundo metodologia proposta por LEVANONY et al., (1987) com algumas modificações. O teste ELISA foi utilizado para verificar o título (nas seguintes diluições do antisoro primário: 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000) e o nível de reação cruzada do soro purificado, testado contra 25 bactérias de espécies diferentes, todas crescidas em meio LB contendo em g.l⁻¹: triptona 10g, extrato de levedura 5g e NaCl 5g por 24 horas. O método ELISA consistiu do crescimento das estirpes bacterianas em meio DYGS a 30°C por 24 horas a 150 rpm, centrifugação a 2000 g por 3 minutos de 1 ml do crescimento e ressuspensão em 1 ml de tampão carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,6. Em seguida foi feito o ajuste da concentração do antígeno para uma densidade ótica (D.O.) igual a $1,0 \pm 0,1$ lida no comprimento de onda $\lambda = 436\text{ nm}$. Os poços das placas de ELISA foram então impregnadas com 50 μl do antígeno calibrado e incubadas em geladeira por um período de 16 a 18 horas. Decorrido este período, os poços

foram lavados uma vez com solução de lavagem [solução tampão PBS (g.l^{-1}): NaCl - 8,0; KCl - 0,2; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 1,4; KH_2PO_4 - 0,2 + 0,05% Tween 20 + 0,5% BSA] e as reações inespecíficas foram bloqueadas utilizando como solução de bloqueio, soro albumina bovina (BSA solução 3% em PBS) por um período de 30 minutos a 37 °C ou de forma opcional por 1 hora a temperatura ambiente. Adicionou-se 50 μl do anticorpo purificado por poço na diluição adequada ao tipo de ensaio, geralmente 1:1000 (anticorpo primário) incubando-se a placa por um período de 30 minutos a 37 °C e a seguir lavou-se por três vezes utilizando-se 200 μl de solução de lavagem por poço. Adicionou-se então 50 μl do anticorpo secundário (imunoglobulinas IgG de cabra conjugadas com enzima peroxidase produzidas contra imunoglobulinas de coelho) diluído na proporção de 1:250 em solução de lavagem. Incubou-se por 45 minutos a 37 °C e lavou-se os poços com solução de lavagem por 5 vezes. Por fim, adicionou-se 100 μl de Signal ABTS (Tampão para ABTS, solução estoque: 1,67g de tampão para ABTS em 10ml de H_2O destilada; solução para o substrato: diluição do tampão para ABTS 1:10 em H_2O destilada e acrescentado de 1 mg. ml^{-1} de ABTS). As leituras de absorbância após desenvolvimento da reação, foram realizadas utilizando um espectofotômetro TiterTek Uniskan (Flow Laboratories) dotado de um filtro de interferência de 405 nm e os dados armazenados e processados pelo programa AUTOMate versão 2.20.

EXPERIMENTO 1: INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE PLÂNTULAS MICROPROPAGADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR POR ESTIRPES DE *Herbaspirillum* “IN VITRO”.

CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO, BACTÉRIAS E INOCULAÇÃO:

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento a temperatura de 25 ± 2 °C e um fotoperíodo de 12 horas com 3000 lux de iluminação. As plântulas de cana-de-açúcar da variedade SP 70-1143 isentas de microrganismos foram obtidas a partir do cultivo do meristema apical do colmo, através da técnica de microprogação descrita por HENDRE et al. (1983). O material foi mantido de 50 a 60 dias em meio MS completo (MURASHIGE & SKOOG, 1962) para desenvolvimento da parte aérea e das raízes. Posteriormente, as plântulas foram individualizadas sob condições estéreis, e transferidas para frascos de vidro contendo 50 ml de meio MS modificado, sem hormônios e diluído dez vezes (tabela 1) como descrito por REIS (1994). Os tratamentos constaram de 4 estirpes, sendo duas de *H. seropedicae* (267, HRC54) e duas de *H. rubrisubalbicans* (HCC103, M4), 4 colheitas (1, 2, 4 e 7 dias após a inoculação) e 2 repetições. O inóculo foi preparado a partir do crescimento das bactérias em meio líquido DIGYS (RODRIGUES NETO, 1986) por 24 horas a 30 °C a 140 rpm, centrifugando-se 5 ml do crescimento bacteriano e ressuspendendo-se em 5 ml de solução salina (NaCl 0,85%). Desse material tomou-se 0,1 ml e inoculou-se nos frascos contendo plântulas individualizadas crescendo em 50 ml de MS modificado. O número inicial de bactérias imediatamente após a inoculação, estimado através de diluições seriadas e contagem de colônias em placa contendo meio batata foi expresso em UFC. ml⁻¹, sendo de $2,24 \times 10^6$ para Z67, $1,12 \times 10^6$ para M4, $7,0 \times 10^5$ para HRC54 e $1,03 \times 10^5$ para HCC103.

CONTAGEM DE BACTÉRIAS NA PLANTA:

O número de bactérias na raiz (expresso em log n° de bactérias por cm) e o número de bactérias na parte aérea (expresso em log n° de bactérias por g de parte aérea) foi estimado tomando-se amostras de raízes de 5 cm de comprimento e amostras da parte aérea de 1 g (peso da matéria fresca) de todos tratamentos e para todas as épocas de colheita. As amostras foram lavadas abundantemente em água destilada, desinfestadas superficialmente com

Cloramina-T solução 1% por 1 minuto e lavadas em solução tampão fosfato 100 mM pH 7,0 por 5 minutos. A seguir, as amostras foram trituradas em 9 ml de solução salina contendo 1/4 dos sais utilizados na composição do meio NFb, diluídas seriadamente até 10^{-9} e inoculadas em meio JNFb semi-sólido (BALDANI et al., 1992), utilizando 3 repetições por diluição. Os frascos foram incubados a 30 °C por 7 dias, decorrido este período foi feita avaliação do crescimento da bactéria, caracterizado pela presença de uma película branca na superfície do meio e identificada de acordo como descrito por BALDANI et al. (1996). O número de bactérias foi obtido pela consulta a tabela de McCrady para 3 repetições por diluição e os valores obtidos sofreram transformação logarítmica.

MICROSCOPIA ÓTICA E ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO:

Amostras de raízes e da parte aérea de cana-de-açúcar var. SP 70-1143 de todos os tratamentos e todas as épocas de colheita foram imediatamente seccionadas em segmentos de 0,5 a 1,0 cm de comprimento por 0,1 a 0,3 cm de largura (raízes), 0,3 a 0,5 cm de espessura (colmos) e de 0,1 a 0,5 cm² (limbo foliar). As seções foram obtidos utilizando uma gilete nova através de cortes a mão livre sobre uma placa de parafina e com as amostras embebidas em tampão fosfato. Os segmentos foram lavados duas vezes em solução tampão fosfato 50 mM, pH 6,8 e fixadas em solução de glutaraldeído 2,5 % em tampão fosfato por 24 horas a temperatura ambiente (fixação primária). As amostras foram preparadas para microscopia ótica e microscopia eletrônica de transmissão (MET) de acordo com JAMES et al. (1994) com pequenas modificações. Após a fixação primária, as amostras foram lavadas por três vezes em tampão fosfato para remoção do glutaraldeído residual e desidratadas em série etanólica crescente (15, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100 % etanol em água v/v), permanecendo por 15 minutos em cada mistura. Amostras destinadas a MET foram pós-fixadas por 1 hora em solução de tetróxido de osmio 1% em água, lavadas por três vezes em tampão fosfato e só então sofreram desidratação em série etanólica crescente. Após a desidratação as amostras foram embebidas em resina acrílica "LR White

medium grade” (London Resin Company, UK) durante um período de 7 dias, sendo mantidas em geladeira para infiltração da resina. Amostras pós-fixadas em ósmio, sofreram duas trocas de resina dentro do intervalo de 7 dias. Subsequentemente, amostras individuais foram cuidadosamente transferidas com pinça fina para cápsulas transparentes de gelatina contendo resina, orientadas para obtenção de cortes transversais, longitudinais ou paradérmicos e postas a polimerizar em estufa a 60 °C por um período de 18 horas. As cápsulas polimerizadas foram selecionadas, levadas a lupa do ultramicrotomo e lapidadas a mão utilizando uma gilete nova para obtenção de blocos de forma trapezoidal contendo a amostra. A partir destes blocos foram obtidas seções semi-finas (0,7 - 1 μ m) e seções ultra-finas (60 - 80 nm) utilizando um ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E e facas de vidro preparadas em um Knife maker II Reichert-Jung. Seções semi-finas para observação ao microscópio ótico foram coletadas em lâminas de vidro contendo uma gota de água fixadas em placa metálica aquecida e imediatamente coradas com azul de toluidina solução 0,1% preparada a partir de uma solução contendo 1% de azul de toluidina e 1% de tetraborato de sódio (bórax) em água, sendo então examinadas em um microscópio ótico Olympus modelo BH2 (Micronal). Cortes seriadas foram preparados como descritos acima e o número e espessura total dos cortes registrada no aparelho de contagem serial (Counter Reichert-Jung). Seções ultra-finas para observação ao MET foram recolhidas em grades de cobre hexagonais de 200 ou 300 mesh, cobertas com uma fina camada de filme plástico de nitrocelulose, piroxilina (solução 2% em amil-acetato) ou de forma opcional em filme de polivinil formol, formvar 15/95 (Shawinigan Resins Corporation, Springfield, Massachusetts, USA) solução 0,3% em clorofórmio, postas para secar sobre papel de filtro e posteriormente contrastadas em acetato de uranila solução 5% em água por 10 minutos e citrato de chumbo solução 0,2% em NaOH 0,01N por 7 a 10 minutos (REYNOLDS, 1963), postos a secar em placas de petri com papel de filtro por 1 hora e então examinados em um microscópio eletrônico de transmissão Zeiss modelo EM 900 (Carl Zeiss).

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA:

Amostras de raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar de todos os tratamentos foram transportados ao laboratório, processadas e fixadas em glutaraldeído e tetroxido de osmio de mesma forma como descrito para amostras preparadas para MET. Após a fixação com tetróxido de osmio, as amostras foram lavadas por três vezes em tampão fosfato e desidratadas em série etanólica crescente (15, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100% etanol em água), permanecendo por 15 minutos em cada mistura e posteriormente, em série acetônica crescente (15, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% acetona em etanol). Em seguida, amostras selecionadas foram transferidas para o equipamento Critical Point Drying Apparatus (Mod E 300, Bio Rad), onde se efetuou a secagem completa das amostras pela substituição da acetona por gás carbônico líquido mantido a alta pressão. Em seguida transformou-se o CO₂ líquido em CO₂ gasoso pela aplicação de uma temperatura de 36 °C e pressão de 70 atm (ponto crítico de secagem para o CO₂), no qual ocorre mudança de fase sem adição de calor no sistema e redução dos danos de tensão superficial associadas a evaporação, resultando em um espécime completamente seco. Após este procedimento, as amostras foram cobertas com uma película de ouro visando aumentar a condutividade eletrônica, utilizando o Automatic Sputter Coater E5200 (Bio Rad), aplicando-se uma corrente de 18 mA e tempo de deposição de ouro de 240 segundos, o que fornece em teoria uma cobertura em torno de 300 nm de espessura. Finalizado este processo, as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura Stereocan 200 (Cambridge Instrument) utilizando uma voltagem de trabalho de 15 a 25KV. Os resultados de frequência de adesão foram obtidos utilizando seções de raízes um dia após a inoculação com as estirpes de *Herbaspirillum* spp., preparadas para MEV e variando de 0,2 a 0,5 cm de comprimento. As raízes foram divididas em três regiões de desenvolvimento radicular: Região 1: zona meristemática; Região 2: zona de alongamento e diferenciação e Região 3: zona de formação de pêlos radiculares. Os valores percentuais foram obtidos pela

observação aleatória da presença ou não de bactérias aderidas a superfície radicular em 25 segmentos de 100 μm de comprimento (medidos através do sistema de medição do MEV) das diferentes regiões.

IMUNOMARCAÇÃO COM PARTÍCULAS DE OURO PARA MET:

Seções semi-finas não osmificadas foram selecionadas e preparadas para MET, sendo processadas de acordo com método descrito anteriormente. Desse modo, seções ultrafinas (70-80 nm) foram recolhidas em grades hexagonais de níquel de 200 mesh cobertos com filme piroxilina para imunomarcação com ouro e postas para secar em placa de petri sobre papel de filtro. Todas as etapas seguintes foram conduzidas utilizando como suporte uma tira de Parafilm M (American can company) e uma pinça anti-magnética fina para manipulação das grades. A etapa inicial bloqueio das reações inespecíficas, consistiu em flutuar a grade com a face contendo a corte sobre a superfície de uma gota (50 μl) de solução de bloqueio IGL em g. l^{-1} (soro albumina bovina BSA - 10; tween 20 -10; diluídos em PBS) por um período de 1 hora. Em seguida as grades foram incubadas a 4 °C em uma gota (50 μl) de anticorpo primário, diluído 1:400 em tampão PBS por um período de 15 a 18 horas e lavadas cuidadosamente por 30 segundos em água destilada estéril utilizando uma pisseta. Após a lavagem, as grades foram imersas em uma gota (40-50 μl) de anticorpo secundário diluído 1:100 em solução IGL por um período de 4 horas a temperatura em torno de 20 a 25 °C. Este consiste de anticorpos produzidos em cabra contra IgG de coelho conjugados com partículas de ouro de 15 nm de diâmetro (Auto Probe LM, Amersham, UK). Ao fim desse processo, as grades foram lavadas em água destilada estéril com pisseta e totalmente imersas em uma gota de IGL. Repetido este procedimento por três vezes dentro de um período de 5 minutos, as grades foram postas à secar sobre papel de filtro e contrastadas com acetato de uranila sol. 5% e citrato de chumbo sol. 0,2% por 2 minutos, estando prontas para observação ao microscópio eletrônico de transmissão. A reação é visualizada ao MET pela deposição de pontos negros

(partículas de ouro) em regiões da seção que expõem os determinantes antigênicos para o qual o soro foi produzido. Foram utilizados dois tipos de controle para o ensaio de imunomarcacão com ouro, o primeiro controle com grades contendo seções similares ao tratamento teste a qual foi aplicada soluçã de bloqueio (controle IGL) em substituiçã ao anticorpo primário e o segundo controle consistiu da aplicaçã do soro do coelho antes da imunizaçã com estirpes de *Herbaspirillum* spp. (controle pré-imune).

IMUNOMARCAÇÃO COM PARTÍCULAS DE OURO PARA MICROSCOPIA ÓTICA:

Seções semi-finas (0,7-1 µm) não osmificadas obtidas no ultramicrotomo foram colocadas em uma gota de água sobre lâminas de microscópio novas cobertas com soluçã de gelatina 1% em água e fixadas a temperatura em torno de 40 °C. As lâminas contendo os cortes foram então colocadas em câmara úmida, sendo cobertas por soluçã de bloqueio IGL (composiçã citada acima) por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, após rápida lavagem em água, foi aplicado o antisoro primário diluído 1:400 e o material foi incubado em câmara úmida por 15 a 18 horas a 4 °C. Utilizando boxes de vidro, as seções foram então lavadas em soluçã de lavagem (1% tween 20 em PBS) e água destilada estéril por 5 minutos em cada e secas com papel absorvente. Em seguida, foram aplicados 40-50 µl de anticorpo secundário conjugado com partículas de ouro de 5 nm, diluído 1:100 em soluçã IGL por um período de 4 horas a temperatura em torno de 20 a 25 °C sob câmara úmida. Decorrido este período as lâminas foram novamente lavadas em soluçã de lavagem e água destilada estéril por 5 minutos e postas para secar, encerrando assim o processo de imunomarcacão. Para visualizaçã ao microscópio ótico marcou-se as partículas de ouro com prata utilizando o kit Intense SE BL Silver Enhancement (Laboratory Janssen Life Sciences Products) de acordo com método descrito por VANDERBOSH et al., (1989). Resumidamente, o método consistiu na mistura 1:1 do inibidor e estimulador, colocando-se então 45 µl da misturas sobre as seções em lâmina. A

reação de deposição de prata coloidal sobre as partículas de ouro foi monitorada ao microscópio ótico utilizando a lente objetiva de 40 aumentos, e o tempo ideal de deposição específica ficou em torno de 9 a 10 minutos a temperatura de 22 a 25 °C. Decorrido este período, as lâminas foram imediatamente lavadas como descrito anteriormente, secas e coradas com uma solução 0,01% de azul de toluidina, sendo então observadas ao microscópio ótico. A reação foi visualizada pela deposição de um precipitado preto opaco ao redor das partículas de ouro conjugadas ao anticorpo secundário. Foram utilizados dois tipos de controle para o ensaio de imunomarcação com ouro e revelação a base de prata, o primeiro controle com lâminas contendo seções similares ao tratamento teste a qual foi aplicada solução de bloqueio (controle IGL) em substituição ao anticorpo primário e o segundo controle consistiu da aplicação do soro do coelho antes da imunização com estirpes de *Herbaspirillum* spp. (controle pré-imune).

FOTOGRAFIA E REVELAÇÃO:

Seções preparadas para microscopia ótica foram fotografadas em um microscópio ótico Olympus BHS modelo BH2 equipado com um sistema fotográfico modelo PM-10ADS (Olympus) contendo um corpo de exposição automática para ajuste de foco e dioptria, câmara C-35AD de 35mm acoplada a uma unidade de controle de exposição automática modelo PM-CBAD, iluminação do tipo Koehler e lâmpadas de halogênio de 12V e 100W, condensador aplanático-acromático modelo BH2-AAC com regulagem de abertura numérica variando de 0,1 a 1,4 e lentes objetivas do tipo SPlan Apocromáticas (correção fina da aberração cromática e curvatura de campo com elevada abertura numérica). Fotomicrografias óticas em preto e branco foram obtidas sem uso de filtro azul, utilizando a unidade de controle de exposição no modo automático, ASA 100, FORMAT 35 mm, AJUSTE DE EXPOSIÇÃO 1 e RECIPROCIDADE 1 e 4, respectivamente para os filmes dianegativos Technical Pan Estar-AH Base (Kodak) ou Neopan SS ASA 100 (Fuji). Foi utilizado o revelador HC-110 cuja solução estoque foi preparada diluindo o conteúdo da embalagem (473 ml) em

1418 ml de água. Procedeu-se do seguinte modo, despejou-se todo conteúdo da embalagem em um frasco, lavou-se a embalagem com 118 ml de água e adicionou-se ao frasco, em seguida 1300 ml de água e estocando-se a temperatura ambiente. A solução estoque tem vida útil de no máximo 2 meses. A solução de trabalho foi obtida por diluição da solução estoque na proporção de 1:7 em água. As condições de revelação para o Technical Pan e o Neopan foram às mesmas com tempo de revelação de 9 minutos a uma temperatura de 21 °C. Após a revelação, os negativos foram lavados por 2 minutos em água corrente e imediatamente fixados por 10 minutos em Fixador Kodalith (Kodak). Para preparo de 300 ml de solução fixadora e reforçadora (suficiente para um filme negativo dentro do box de revelação), tomou-se 75 ml da parte A (Tiosulfato de amônia sol. 40%) e diluiu-se em 150 ml de água. Após agitação vigorosa adicionou-se 15 ml da parte B (Ácido sulfúrico sol. 11%), agitou-se novamente e completou-se para o volume final de 300 ml. Após a fixação, os negativos foram abundantemente lavados em água corrente, postos em solução detergente por 1 minuto, lavados em água corrente novamente e postos para secar, estando assim prontos para serem passados para o papel fotográfico. Os negativos foram passados para papel fotográfico utilizando um ampliador modelo S69 (Fuji) e uma lente objetiva com distância focal de 75 mm. A abertura do diafragma, tempo de exposição e tempo de revelação foram alterados de acordo com as condições do negativo. O papel fotográfico utilizado foi o Kodak Kodabromide Paper disponível para 4 níveis de contraste (F1, F2, F3 e F4) e o revelador Dektol Kodak (Sulfato de P-metilaminofenol sol. 3%, hidroquinona sol. 6%, carbonato de sódio sol. 50%) preparado a partir da diluição 1:3 de uma solução estoque obtida por adição paulatina do conteúdo do pacote (730 g.l⁻¹) em 4,5 litros de água a temperatura entre 32 e 38 °C e agitação continua até a completa dissolução completando para um volume final de 5 litros. Fotomicrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas do mesmo modo e com os mesmos materiais descritos acima. Slides coloridos de seções preparadas para microscopia ótica foram obtidas utilizando diapositivos Ektachrome ASA 64 Kodak

daylight (Reciprocidade 3) e o equipamento fotográfico acima descrito, alterado apenas pela colocação de dois filtros de densidade neutra ND e um filtro de cor (filtro azul tipo LBD2) e regulagem da temperatura de cor utilizando o módulo de temperatura de cor PM-CTR. Os filmes coloridos foram revelados em firmas comerciais. Fotomicrografias eletrônicas de transmissão foram obtidas utilizando um MET Zeiss EM 900 e negativos Kodak EM Film 4489 (ESTAR Thick Base) com dimensões de 6,5 x 9,0 cm, tempo de exposição de 2,5 segundos e densidade de elétrons de 2,5, com abertura máxima (60 μ m) ou intermediária (90 μ m), inseridas na objetiva. Os negativos foram revelados utilizando revelador D-19 para autocontraste cuja composição em g.l⁻¹ é de: (metol - 2,2; sulfito de sódio - 96; hidroquinona - 8,86; carbonato de sódio - 56; brometo de potássio - 5), preparados a partir de 700 ml de água destilada aquecida a 50 °C, colocando os reagentes em sequência, agitando e completando para 1 litro. O tempo de revelação foi de 2 minutos e 30 segundos a 20 °C. Após revelação, os negativos foram lavados rapidamente em água e imediatamente fixados por 10 minutos, sendo então lavados abundantemente em água, secos e copiados em papel fotográfico, como descrito para filmes em preto e branco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS PURIFICADOS:

A utilização bem sucedida de técnicas imunológicas aplicadas ao estudo da interação entre bactérias e plantas é absolutamente dependente da qualidade do antisoro policlonal produzido. A qualidade por sua vez esta vinculada a experiência de quem produz o antisoro, da formulação, do modo de aplicação e propriedades antigênicas dos antígenos, do controle sanitário das cobaias e dos métodos de colheita e purificação do antisoro. Idealmente o soro imune deve possuir um balanço apropriado entre especificidade e sensibilidade, adequada a cada tipo de trabalho. No presente estudo, anticorpos policlonais produzidos contra células totais das bactérias: *Herbaspirillum seropedicae* estirpes Z67 e HRC54 e *H. rubrisubalbicans* estirpes M4 e HCC103 foram inicialmente aquecidos para inativação de proteínas que compõem o sistema complemento (euglobulinas combinadas a carboidratos e fosfolipídeos) e em seguida eluídos através de coluna contendo proteína A, na qual foi descartada a fração contendo IgA, IgM, IgE e outras proteínas não imunogênicas, obtendo-se então a fração contendo IgG. Ao final do processo de purificação foram observados os seguintes valores de proteínas totais nos extratos contendo os antisoros: Z67 -- 0,6272 mg.ml⁻¹; HRC54 -- 0,3920 mg.ml⁻¹; M4-- 0,8226 e HCC103 -- 0,5280 mg.ml⁻¹. Obviamente, existiu uma redução da concentração de proteínas durante o processo de purificação do soro, tendo em vista a eliminação de proteínas não imunogênicas e imunoglobulinas inespecíficas (IgA, IgM, IgE). Estas estão envolvidas na resposta genérica a antígenos, sendo indesejáveis quando se busca maior especificidade.

Já na classe das imunoglobulinas IgG, produzidas pelo sistema imune mais tardiamente e predominantes como elemento circulante do plasma sanguíneo a partir da segunda imunização, encontram-se imunoglobulinas mais específicas para biomacromoléculas presentes na superfície da bactéria, sendo então desejáveis para estudos de imunodeteção.

De posse dos antisoros purificados, uma série de parâmetros foram investigados no intuito de avaliar a qualidade dos mesmos. As figuras 1, 2, 3 e 4 representam respectivamente, a reatividade dos anticorpos IgG anti-Z67, IgG anti-HRC54, IgG anti-M4 e IgG anti-HCC103, medidos através da absorbância a 405 nm de comprimento de onda, em diferentes diluições do IgG (1:100, 1500, 1:1000, 1:5000, 1:10000; 1:20000 e 1:50000) contra uma concentração padronizada dos antígenos específicos para cada soro (D.O. = 1,0 a $\lambda = 436$ nm). Obviamente com o aumento da diluição das IgG, ocorre uma queda proporcional nos valores de absorbância, tendo em vista a diminuição no número de complexos antígeno-anticorpo formados. Tal comportamento não foi observado na passagem da primeira para a segunda diluição, que pode ser explicado, pois trata-se de um fenômeno comum em ensaios imunoenzimáticos conhecido como efeito pro-zona. Se um excesso de anticorpos é adicionado a uma suspensão bacteriana, seus sítios antigênicos poderão ser, de tal forma cobertos por anticorpos que a reação (formação dos complexos) é em parte inibida. A esse efeito de interferência dá-se o nome de efeito pro-zona. Analisando ainda as figuras 1, 2, 3 e 4, verificamos que os soros produzidos reagiram até a diluição 1:50.000 com valores de absorbância acima do controle. Os controles do ensaio (brancos) constaram de poços sem antígeno, sem o conjugado primário ou sem o secundário. Os maiores valores de branco foram tomados como valores de referência, abaixo do qual as reações foram consideradas negligenciáveis.

O critério adotado para definição do título do antisoro foi a diluição máxima do soro imune que não promoveu um decréscimo significativo na reatividade, comparada com o controle. É importante ter em mente que diluições crescentes de IgG tendem a promover um aumento de especificidade associada a queda de sensibilidade. Tal efeito paradoxal deve ser sempre considerado na

H. seropedicae

Gráfico 1: Z67

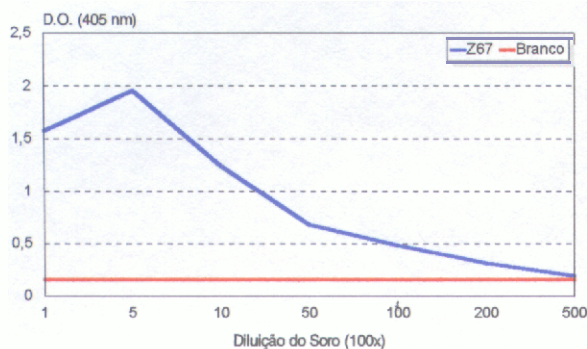
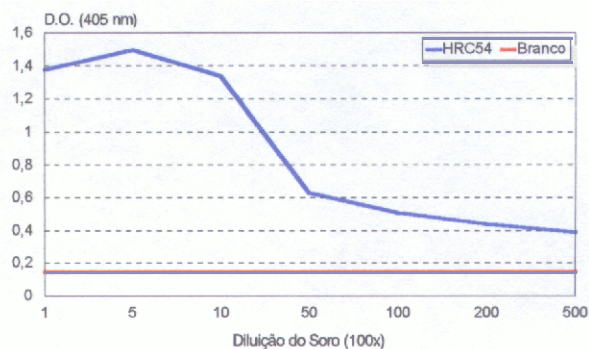


Gráfico 2: HRC54



H. rubrisubalbicans

Gráfico 3: M4

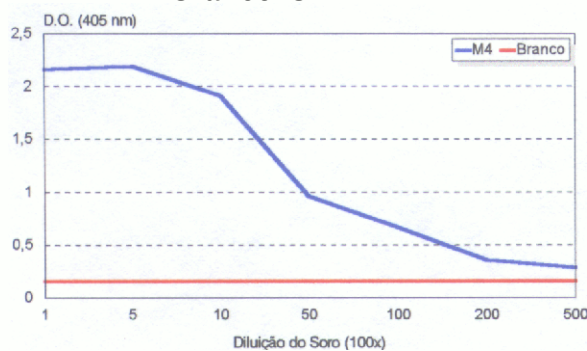
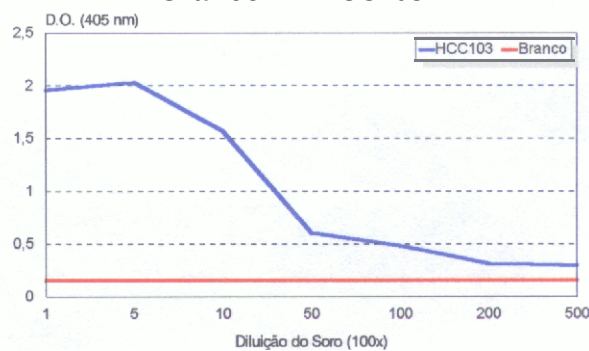


Gráfico 4: HCC103



Figuras 1-4: Determinação do título dos antisoros policlonais produzidos contra *H. seropedicae* (Z67, HRC54) e *H. rubrisubalbicans* (M4, HCC103). Os valores obtidos são média de 3 repetições.

definição do título do antisoro, sendo fortemente dependente do objetivo que o pesquisador quer atender em seus estudos. Por exemplo, em ensaios de detecção “in situ” onde a concentração do antígeno é variável, e que uma série de sítios antigênicos podem aumentar consideravelmente as reações inespecíficas, recomenda-se trabalhar com diluições do IgG um pouco menores àquelas utilizadas em ensaios com cultura pura da mesma bactéria. Dentro deste contexto e associado a análise dos gráficos, adotou-se para os antisoros a diluição de 1 :1000 como título ideal nos imuno-ensaios de detecção de *Herbaspirillum* spp. em seções de plantas preparadas para microscópio ótico e eletrônica de transmissão. A discussão acima é válida para os quatro antisoros produzidos.

Nas figuras 5 e 6, podemos observar os valores para nível mínimo de detecção das bactérias utilizando os antisoros purificados Z67, HRC54, M4 e HCC103, diluídos na proporção 1 :1000 e diluições seriadas das bactérias variando de 10^4 a 10^8 células.ml⁻¹. Podemos perceber que foram necessárias acima de 5×10^5 a 5×10^6 células.ml⁻¹ para que ocorresse uma detecção positiva. Os níveis de detecção obtidos são satisfatórios para *Herbaspirillum* spp. no presente estudo, ademais os valores apresentados encontram-se apenas um pouco abaixo da média daqueles apresentados na literatura. LI & MACRAE (1992) desenvolveram um ELISA indireto específico para identificação e enumeração de *Acetobacter diazotrophicus* e encontraram um limite de detecção de 10^5 células.ml⁻¹, similares àqueles encontrados por LEVANONY et al. (1987) trabalhando com *Azospirillum* brasilense estirpe Cd. Valores de limites de detecção tão baixos como 10^2 e 10^3 células.ml⁻¹ foram encontrados por MARTENSSON et al. (1984) e NAMBIAR & ANJIAH (1985) trabalhando com bactérias do gênero *Rhizobium* até valores acima de 10^7 células.ml⁻¹ de *Pseudomonas* sp. estirpe H8 (BARRAQUIO et al., 1986). Dependendo da proposta de trabalho, o limite de detecção do soro-imune pode ser fator limitante. Entretanto, embora tal parâmetro seja uma característica intrínseca do soro-imune, alguns artifícios metodológicos podem contribuir para aumento da sensibilidade do antisoro. LEVANONY & BASHAN, (1990) desenvolveram o método ABELISA (“Avidin-Biotin Complex Incorporation into Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) que baseia-se na formação do

Figura 5: *H. seropedicae*

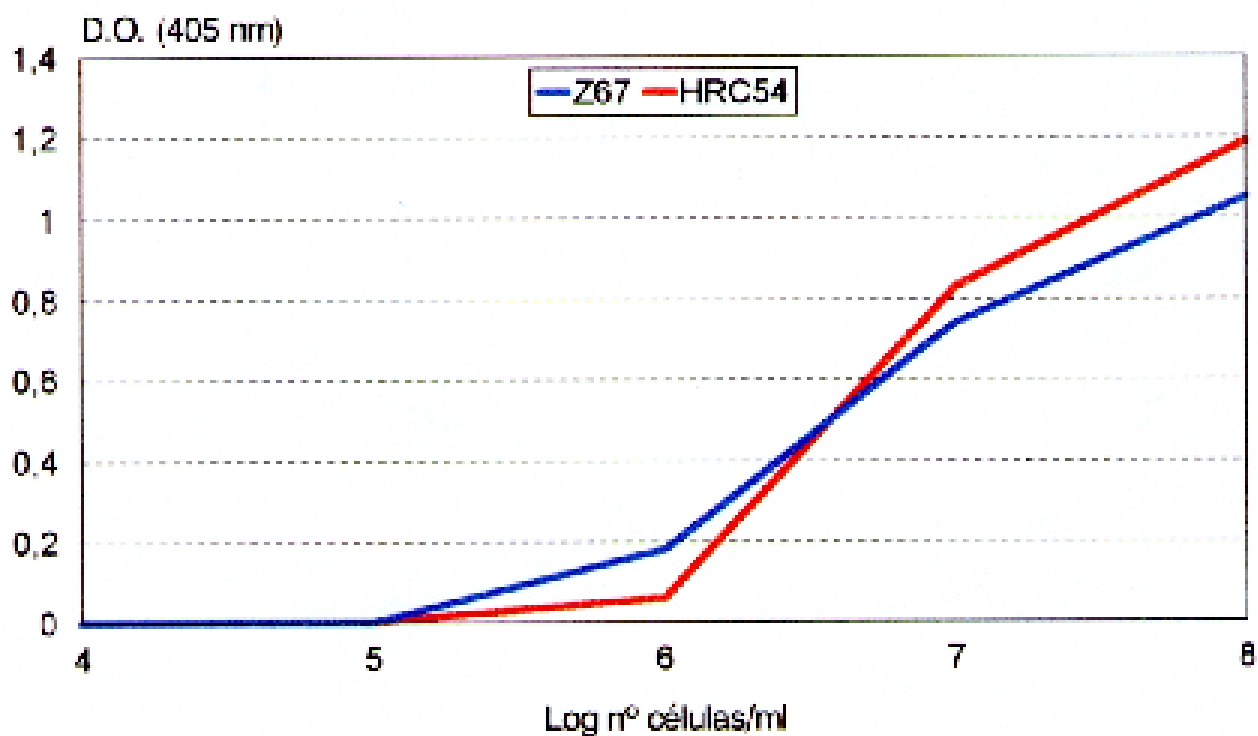
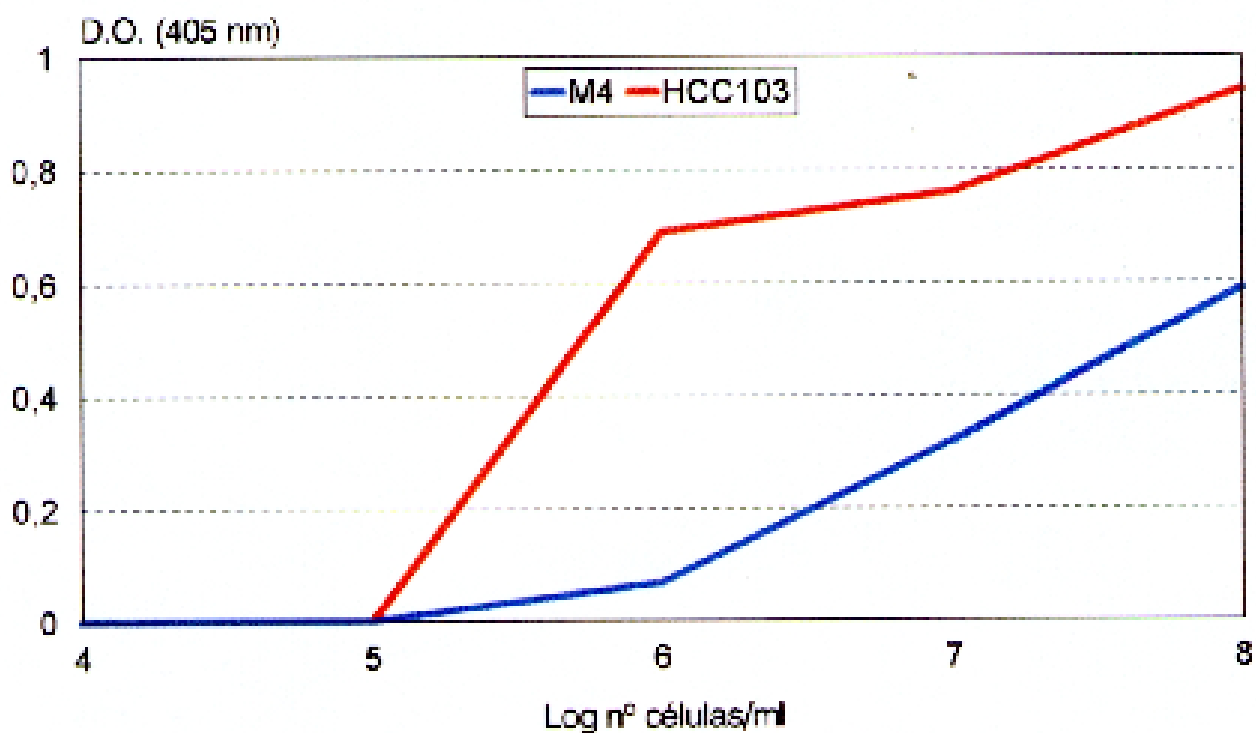


Figura 6: *H. rubrisubalbicans*



Figuras 5 e 6: Nível mínimo de detecção dos antisoros produzidos contra *H. seropedicae* estirpes Z67 e HRC54, e *H. rubrisubalbicans* estirpes M4 e HCC103. Os valores apresentados representam média de 3 repetições.

complexo de alta afinidade avidina-biotina e caracteriza-se pelo acoplamento de moléculas de biotina no anticorpo secundário (biotinilação) e pela ligação covalente de avidina (glicoproteína) a enzima. A biotina ligada ao anticorpo secundário mantém sua afinidade por avidina. Visto que a avidina tem quatro sítios de ligação para biotina e que múltiplas moléculas de biotina podem se ligar ao anticorpo, desse modo o anticorpo biotinilado pode ligar-se a mais de uma molécula de avidina, propriedades estas que indicam potencial para amplificação do sinal e consequente aumento do limite de detecção, que neste caso atingiu 10^4 células.mL⁻¹. Uma outra alternativa para detecção de números baixos da bactéria foi proposta por BASHAN et al. (1991 b) trabalhando com *Azospirillum brasilense* estirpe Cd. Estes autores acoplaram o método tradicional de ELISA a amostras cultivadas por um curto período de tempo em meio de enriquecimento. Um método bastante sensível para detecção de bactérias em baixos números é a imunofluorescência, que pode detectar até mesmo uma única célula bacteriana (SCHLOTER et al., 1993). A técnica de imunofluorescência baseia-se na combinação de anticorpos secundários a fluorocromos (corantes fluorescentes) e observação da formação do complexo em amostras levadas ao microscópio equipado com fonte de luz ultravioleta. A técnica é favorecida pela sensibilidade e especificidade das reações imunológicas aliada a precisão e contrastes nas observações fornecidos pela microscopia ótica de fluorescência (DIEN et al., 1977; SCHANK et al., 1979).

Outro parâmetro importante para subsidiar os estudos subsequentes de imuno-detecção foi a determinação da especificidade dos antisoros purificados na diluição da IgG 1:1000. Esta foi determinada através de testes de reação cruzada contra um amplo espectro de bactérias envolvendo fixadores de nitrogênio, fitopatôgenos da cana-de-açúcar, bactérias do solo e rizosfera entre outras num total de 13 espécies e 40 isolados. Os resultados da reação cruzada encontram-se na Tabela 1 e os valores obtidos foram expressos em percentual de reação cruzada, adotando-se como 100 % os valores de D.O. obtidos para as estirpes que deram origem ao antisoro. Segundo SCHLOTER (comunicação pessoal) para valores acima de 20% recomenda-se pós-tratamento do soro para eliminação da

Tabela 1 - Reatividade cruzada dos anticorpos policlonais contra *H. seropedicae* HRC54 e Z67 e *H. rubrisubalbicans* HCC103, testados contra 40 estirpes de 13 gêneros diferentes. (média de 3 repetições).

ESPÉCIE BACTERIANA	PERCENTAGEM DE REAÇÃO CRUZADA (%)		
	SORO HRC54	SORO HCC103	SORO Z67
<i>Arthrobacterium citreus</i> 1a	3,96	5,80	11,90
<i>Escherichia coli</i> k12	0,0	0,0	5,70
<i>Octrobacter</i> Isol 1a	6,55	14,50	25,80
<i>Pseudomonas</i> PSIA12	6,98	17,60	22,60
<i>Pseudomonas rubrilneas</i> IBSBF774	4,95	18,25	nd
<i>Xanthomonas albilineans</i> IBSBF740	2,70	4,10	nd
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> PR2	7,80	8,90	nd
<i>Acetobacter diazotrophicus</i> PAL 5	5,20	7,60	nd
<i>Rhizobium</i> R39 st	2,16	11,68	18,00
<i>Azospirillum lipoferum</i> Sp59	3,50	8,40	16,60
<i>Burkholderia brasiliensis</i> M130	6,20	7,75	nd
<i>Burkholderia brasiliensis</i> M209	5,20	6,50	nd
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	1,40	0,0	11,40
<i>H.seropedicae</i> Z67	89,30	2,60	100,0
<i>H.seropedicae</i> HCC102	125,00	9,60	71,30
<i>H.seropedicae</i> HRC 52	105,6	8,40	nd
<i>H.seropedicae</i> HRC 54	100,00	16,10	68,90
<i>H.seropedicae</i> HRC 55	85,44	5,97	nd
<i>H.seropedicae</i> HRC 80	95,52	6,60	nd
<i>H.seropedicae</i> HCC100	95,20	2,35	nd
<i>H.seropedicae</i> HCC102	98,08	4,30	nd
<i>H.seropedicae</i> SR Gord3	117,40	12,40	63,60
<i>H.seropedicae</i> RLgord3	84,0	6,12	nd
<i>H.seropedicae</i> SRdig3	92,16	7,22	nd
<i>H.seropedicae</i> RLdig(3)	112,20	18,60	80,60
<i>H.rubrisubalbicans</i> M4	4,20	149,00	19,20
<i>H.rubrisubalbicans</i> B-4362	3,45	98,80	nd
<i>H.rubrisubalbicans</i> HCC103	2,99	100,00	14,40
<i>H.rubrisubalbicans</i> HRC 51	2,20	118,00	18,00
<i>H.rubrisubalbicans</i> HPD1	35,00	7,10	34,70
<i>H.rubrisubalbicans</i> IBSBF 175	9,7	75,5	nd
<i>H.rubrisubalbicans</i> M5	5,24	31,60	nd
<i>H.rubrisubalbicans</i> M1	12,50	40,55	nd
<i>Herbaspirillum</i> sp. ISOL 1	97,10	15,50	83,70
<i>Herbaspirillum</i> sp.ISOL 8	75,52	3,45	nd
<i>Herbaspirillum</i> sp.ISOL 11	92,96	5,02	nd
Isolado Herba-like GSF T1	8,64	14,30	20,11

nd Não determinado

reação cruzada. Observando os valores contidos na tabela 1, podemos concluir que os antissoros HRC54 e HCC103 apresentaram reação cruzada negligenciável contra as 11 espécies bacterianas testadas, porém reagiram com diversas estirpes de suas respectivas espécies. Desse modo podemos concluir que a especificidade destes soros para as condições especificadas no ensaio ELISA encontra-se ao nível de espécie, de modo que o soro anti-HRC54 reconhece todas as estirpes de *H. seropedicae* e o soro anti- HCC103 reconhece especificamente diversas estirpes de *H. rubrisubalbicans*, exceção para a estirpe HPD1.

Analisando ainda a tabela 1, podemos perceber que o antissoro Z67 apresentou graus mais elevados de reação cruzada, atingindo valores críticos para *Octhrobacter* e *Pseudomonas*. Tal soro sofreu um pós-tratamento para eliminação da reação cruzada com ambas bactérias conhecido como purificação por afinidade. O método consistiu na pré-incubação do soro com uma suspensão concentrada da bactéria que primeiramente se desejou eliminar as reações cruzadas por 2 horas, agitando vagarosamente, com posterior centrifugação e recolhimento do sobrenadante. Este procedimento foi feito primeiramente para *Pseudomonas* sp. estirpe PSIA12, onde eliminou-se por completo as reações cruzadas (dados não mostrados). Tal procedimento repetido 2 a 3 vezes, aumenta a especificidade do soro, porém, de outro reduz substancialmente a sensibilidade, visto que vai ocorrendo uma diminuição da população de anticorpos.

Os antissoros produzidos foram utilizados para imuno-deteção de bactérias em seções ultra-finas de amostras preparadas MET, através da técnica de imuno-ouro (ver capítulo 4, figuras 5B, 5D, 10A). Como pode ser observado, grande parte dos epítomos está localizado na matriz de lipopolissacarídeos (LPS) e exopolissacarídeo (EPS). Tal fato não parece ser surpresa, já que o procedimento para produção do anticorpo residiu na injeção de células bacterianas intactas mortas, e desse modo os epítomos de superfície são prontamente acessíveis ao sistema imune da cobaia. No estudo conduzido por LEVANONY & BASHAN (1989b) utilizando imuno-ouro e MET, ficou igualmente demonstrado que antígenos específicos de *Azospirillum brasilense* estirpe Cd localizavam-se na camada de EPS que envolvia cada célula e em proteínas flagelares.

Em uma variante da imunomarcacão com ouro, seções semi-finas (1 µm) embebidas em resina LR White, foram posteriormente tratadas com prata coloidal ("Immunogold with silver enhancement technique"), uma técnica introduzida por DANSCHER (1981) que possibilita observar amostras ao microscópio ótico (neste capítulo, figuras 12C e 13D). A combinao de ferramentas imunológicas com técnicas de anatomia vegetal e microscopia ótica e eletrônica de varredura e transmissão podem revelar detalhes exatos da interao planta-bactéria, associada a identificao específica dos microrganismos observados ou mesmo de biomacromoléculas alvos importantes na interao. Pelo seu amplo potencial de resposta, a técnica de imuno-ouro combinada com MET poderia ser mais explorada no estudo da interao planta-bactéria. Um dos estudos pioneiros envolveu a identificao da bactéria fitopatogênica *Erwinia amylovora* (VAN LAERE et al., 1985). LEVANONY et al., (1989) utilizaram esta técnica para localizao e identificao de *Azospirillum brasilense* Cd na superfície e no interior das raízes de trigo em dois sistemas de cultivo, axnico e não-axnico. Estruturas sub-celulares podem também ser localizadas através desta técnica. JAMES et al. (1991) identificaram e quantificaram glicoproteínas envolvidas no controle da difusão de oxigênio no interior dos nódulos da leguminosa aquática *Neptunia* utilizando anticorpos monoclonais. A enzima nitrogenase foi imunolocalizada através da mesma técnica em plantas de arroz e "kallar grass" inoculadas com a bactéria fixadora de nitrogênio *Azoarcus* estirpe BH72, utilizando um anticorpo policlonal produzido contra a subunidade dinitrogenase reductase obtida de *Rhodospirillum rubrum* (HUREK et al., 1991). Em um estudo citoquímico muito interessante, BOHER et al., (1995) descreveram as diferentes fases do estabelecimento da patogênese de *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis* em um cultivar susceptível de mandioca (*Manihotis utilissima* Pohn.), e monitoraram a degradao de celulose e pectina na planta hospedeira por meio de anticorpos monoclonais específicos para estes compostos. Todos estes trabalhos combinam alto poder de resoluo das imagens ao MET com a deteco específica e até certo ponto semi-quantitativa dos ensaios de imunomarcacão com ouro. No entanto, para laboratórios não equipados com microscópio eletrônico, o técnica de

imuno-ouro pode ser acoplada a amplificação do sinal com íons de prata e visualização ao microscópio ótico (DANSCHER, 1981; DANSCHER & NGÖRGAARD, 1983). VANDEN BOSCH (1986) estudando o metabolismo do nitrogênio em nódulos de soja (*Glicine max*), utilizaram esta técnica de imunomarcagem para detecção da enzima uricase. REINHOLD & HUREK (1988b), interessados em entender o processo de infecção de raízes da planta de “Kallar grass” [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth] por estirpes de *Azoarcus*, utilizaram o imuno-ouro com revelação com prata, ressaltando ‘as vantagens desta técnica com relação a imunofluorescência.

EXPERIMENTO I: INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR POR ESTIRPES DE *H. SEROPEDICAE* E *H. RUBRISUBALBICANS*: SISTEMA IN VITRO.

MEIO DE CRESCIMENTO E CONTAGEM DE BACTÉRIAS NA PLANTA

As vias de infecção e modo de colonização de raízes de cana-de-açúcar por *Herbaspirillum* spp. foram investigadas utilizando como sistema modelo plantas micropropagadas de cana-de-açúcar da variedade SP 70-1143 cultivadas sob condições de laboratório de acordo com REIS (1994). Neste sistema, as plantas foram crescidas em meio MS diluído dez vezes (MURASHIGE & SKOOG, 1962) por 7 dias. De acordo com a composição do meio utilizado (tabela 2) e sabendo-se que *Herbaspirillum* não utiliza sacarose como fonte de carbono e, podemos pressupor que o macronutriente que mais limita o crescimento da bactéria é o carbono ($5,14 \text{ g.l}^{-1}$ de C como ácido cítrico). Considerando que todo carbono adicionado seja utilizado pela bactéria para crescimento e multiplicação, uma perda de carbono média da ordem de 40 % por respiração, um número inicial de bactérias de $1 \times 10^6 \text{ células.ml}^{-1}$ e uma taxa de assimilação de carbono de 0,1 mg por tempo de geração (calculado em função do peso seco médio de uma bactéria), podemos por aproximação de cálculo sugerir que dentro de 24 horas a bactéria torna-se dependente do carbono sintetizado e exsudado pela planta. Tal

aspecto é interessante no estudo da interação bactéria-planta, já que tornaria a bactérias dependente do metabolismo de carbono da plântula.

Observando as figuras 7 e 8, podemos concluir que existe um incremento no número de bactérias presentes nas raízes e na parte aérea das plântulas de cana de açúcar a partir da data de inoculação. Sete dias após a inoculação, o número de bactérias presentes no interior das raízes variou entre $5,5 \times 10^5$ e $7,2 \times 10^7$ células por cm de raiz e na parte aérea variou na ordem de $4,5 \times 10^8$ a $9,5 \times 10^9$ células por g de parte aérea. Os números observados são pelo menos 100 vezes maiores que aqueles obtidos em plantas de cana-de-açúcar crescendo naturalmente em campo, o que pode ser explicado pelas condições altamente favoráveis a multiplicação das bactérias. Tal sistema de inoculação foi desenvolvido por REIS et al. (1994) com o intuito de assegurar a reintrodução de bactérias diazotróficas em plântulas livres de microrganismos, obtidas através de micropropagação.

Tabela 2- Composição do meio MS 1/10 em termos de macronutrientes.

MACRONUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO mg. l ⁻¹
Carbono na forma de: sacarose	771,96
Ácido cítrico	5,14
Nitrogênio	84,03
Potássio	73,96
Cálcio	12,12
Magnésio	3,64
Fósforo	3,87
Enxofre	8,96

ESTUDOS AO MICROSCÓPIO ÓTICO E ELETRÔNICO DAS VIAS DE INFECÇÃO E MODO DE COLONIZAÇÃO DAS RAÍZES DA CANA-DE-AÇÚCAR.

Estudos de adesão radicular: a interação entre as raízes de cana-de-açúcar e *Herbaspirillum* foi estudada através da amostragem ao longo de diferentes tempos após a inoculação de segmentos de raízes de cana-de-açúcar variando de 0,2 a 0,5cm de comprimento, oriundos das diferentes regiões anatômicas de

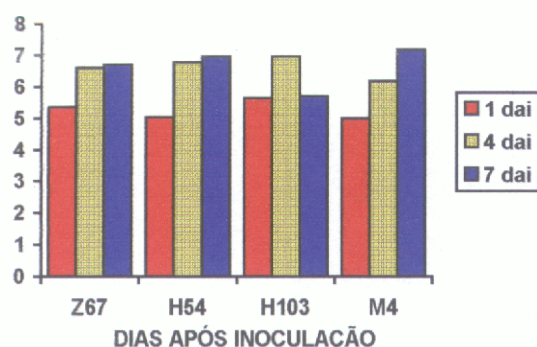


Figura 7- Contagem de *H. seropedicae* estirpes Z67 e HRC54 e *H. rubrisubalbicans* estirpes M4 e HCC103 em raízes de plântulas de cana-de-açúcar var. SP 70-1143 em um sistema monoxênico aos 1, 4 e 7 dias após a inoculação (valores expressos em log n° células cm raiz⁻¹).

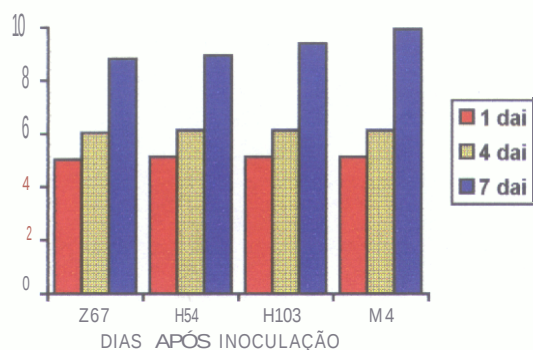


Figura 8- Contagem de *H. seropedicae* estirpes Z67 e HRC54 e *H. rubrisubalbicans* estirpes M4 e HCC103 na parte aérea de plântulas de cana- de - açúcar var. SP 70-1143 em um sistema monoxênico aos 1, 4 e 7 dias após a inoculação (valores expressos em log n° células g parte aérea⁻¹).

desenvolvimento do eixo radicular, preparados para observação ao microscópio eletrônica de varredura (MEV). Um dia após a inoculação das plantas cultivadas em meio líquido, a bactéria foi observada colonizando aleatoriamente todo eixo radicular (Figura 10A). Na figura 9, podemos notar que a distribuição de frequência de adesão das bactérias *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* nas diferentes regiões da superfície radicular de cana-de-açúcar, 1 dia após a inoculação. Podemos concluir que independente da espécie de *Herbaspirillum*, e apesar das bactérias colonizarem todo eixo radicular, as regiões de maior frequência de adesão foram as zonas de diferenciação e alongamento (Região 2, Figura 10C) e a zona de formação de pêlos radiculares (Região 3, Figura 10D). Já a zona meristemática (Região 1) e a superfície dos pêlos radiculares mostraram-se como regiões menos susceptíveis a adesão bacteriana. Na zona de alongamento e diferenciação foram observadas as maiores frequências de adesão, que podem ser explicados pelo fato das mesmas serem as principais zonas de exsudação radicular, sendo cornumente colonizada por numerosos microrganismos de rizosfera (ROVIRA, 1973).

As bactérias, aderidas a superfície das raízes e observadas através do MEV, mediam $1,7 \pm 0,18\mu\text{m}$ de comprimento e $0,43 \pm 0,07\mu\text{m}$ de largura (*H. seropedicae*) e $2,18 \pm 0,39\mu\text{m}$ e $0,40 \pm 0,04\mu\text{m}$ (*H. rubrisubalbicans*). Observações ao MEV, 1 d.a.i., permitiram ainda afirmar que as bactérias aderiram a superfície da raiz por meio de ataque apolar em monocamada, raramente formando agregados e quando comparadas com o controle não inoculado, todas as plantas inoculadas com bactérias aparentemente produziram maior quantidade de material de aspecto mucoso (Figura 10A e 10B). Em condições experimentais idênticas a descrita neste trabalho, *A. diazotrophicus* aderiu-se a superfície radicular de cana-de-açúcar de modo similar a *Herbaspirillum*. Entretanto, embora *A. diazotrophicus* tenha colonizado todo eixo radicular, os principais sítios de adesão foram a zona meristemática e as junções longitudinais entre células epidérmicas e feridas (JAMES et al., 1994; REIS Jr. et al., 1995). LEVANONY et al. (1989) trabalhando com plântulas de trigo (*Triticum aestivum*) crescendo monoxenicamente em tubos de vidro com água estéril e inoculadas com

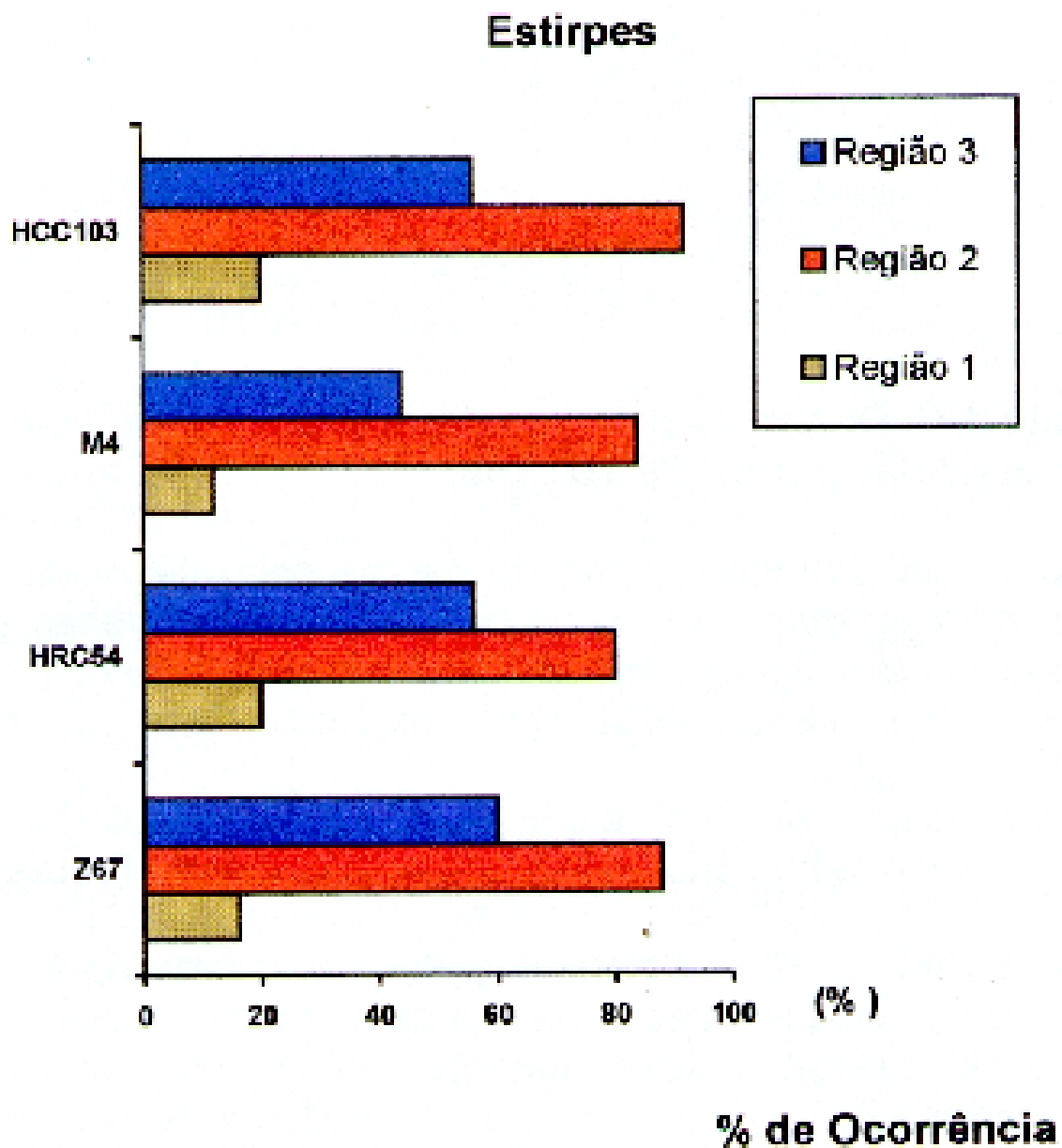


Figura 9 - Frequência de adesão em diferentes regiões da superfície radicular de plântulas de cana-de-açúcar var. SP 70-1143, 1 d.a.i. com estirpes de *H. seropedicae* (Z67 e HRC54) e *H. rubrisubalbicans* (M4 e HCC103). (valores expressos em % de presença da bactéria em um total de 25 observações em segmentos de 100 μ m de comprimento das diferentes regiões por espécie bacteriana). Sendo, Região 1: zona meristemática; Região 2: zona de alongamento e diferenciação e Região 3: zona de formação de pêlos radiculares.

FIGURA 10

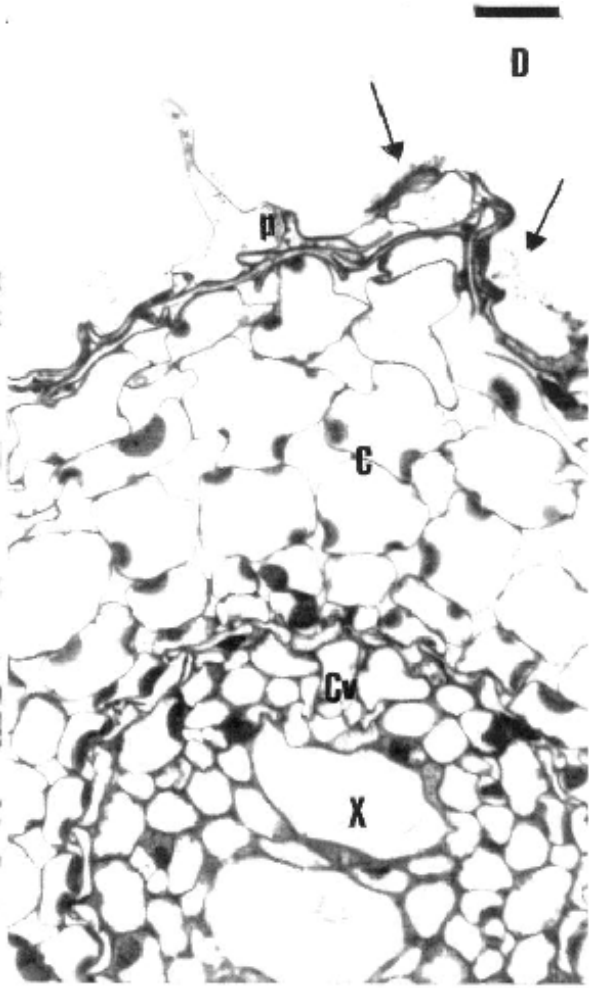
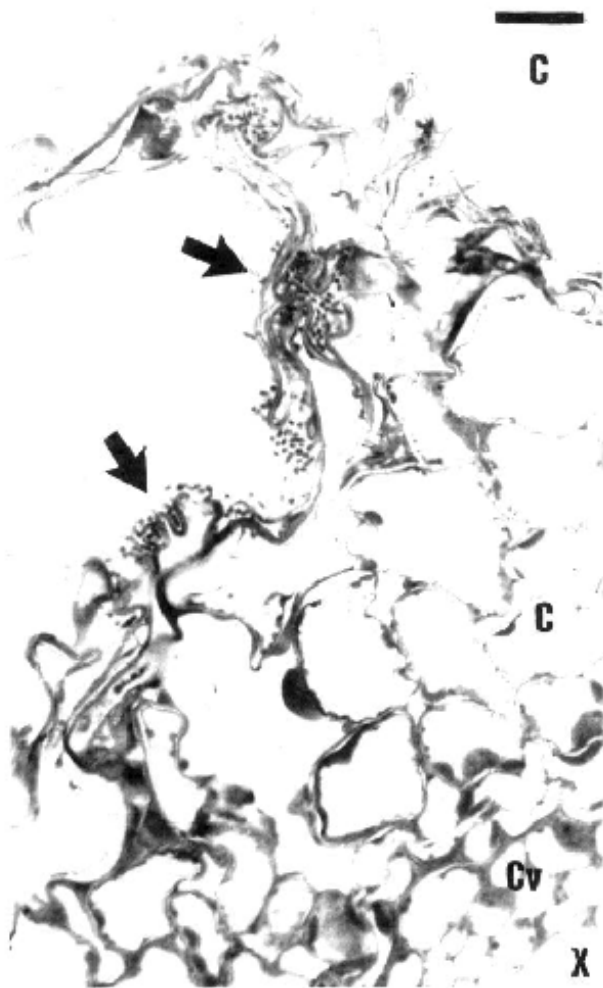
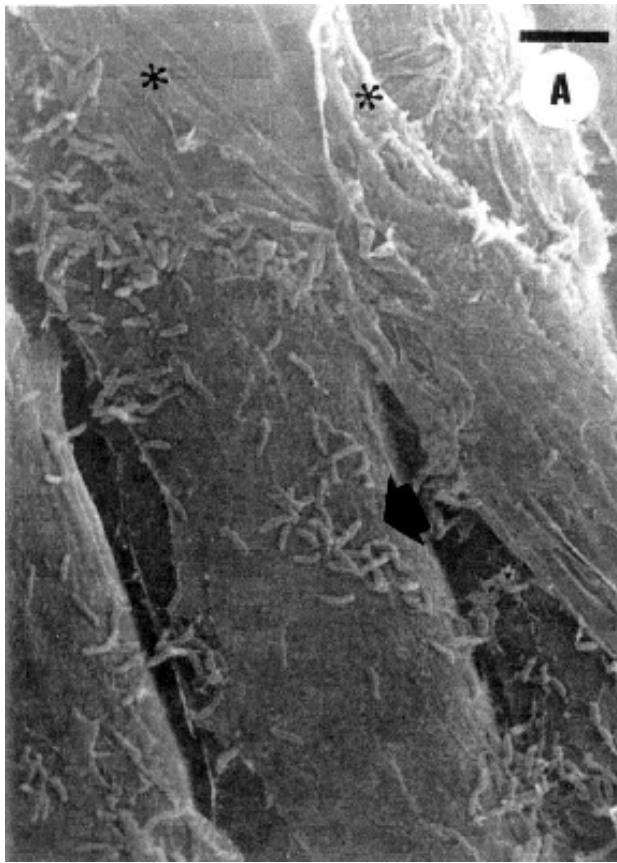
Figura 10A-D: Micrografias de adesão radicular de *Herbaspirillum* spp. às raízes de cana-de-açúcar cv. SP 70-1143.

Figura 10A: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (FMEV) 1 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans* (HCC103). As bactérias (**seta**) estão aderidas a superfície radicular em monocamada e ataque apolar. Observar deposição de material de aparência mucilaginosa na superfície da raiz (*****), **barra = 5 µm**.

Figura 10B: FMEV 1 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans* (HCC103). Observar ancoragem das bactérias a raiz por meio de fibrilas (**setas**), **barra = 5 µm**.

Figura 10C e 10D: Fotomicrografia de microscopia ótica (FMO) de seções radiculares obtidas na zona de alongamento/diferenciação e zona de formação de pêlos radiculares, respectivamente IOC e 10D, mostrando a adesão de *H. seropedicae* Z67 1 d.a.i. as células da epiderme (**setas**), **barra = 10 µm**.

Abreviações: Xilema (X), Cilindro vascular (Cv), Córtex (C) e Pêlo radicular (p).



Azospirillum brasilense estirpe Cd, observaram ao MEV que 1 hora após a inoculação a superfície radicular das zonas meristemática, de alongamento, de diferenciação e de formação de pêlos radiculares foram aderidas pela bactéria. Neste estudo, os autores descreveram que a estirpe Cd ancorou-se as células epidérmicas por meio de um material fibrilar eletrôn-denso. Material idêntico em aparência, foi também observado ligando células bacterianas adjacentes e também ancorando *Herbaspirillum* spp. a superfície radicular no presente estudo (Figura 10B). Todos os trabalhos citados, acima utilizaram o MEV como ferramenta para estudo da adesão a superfície radicular, valendo-se é claro do poder de resolução do microscópio eletrônico de varredura (40-60 nm), aliado a facilidade de descrição e interpretação da imagem tridimensional gerada pelo MEV. Entretanto, cabe ressaltar que devemos nos preocupar com os artefatos que possam vir a ser introduzidos em estudos de descrição de adesão utilizando o MEV. Estes podem contribuir por divergência de descrição observadas na literatura, quando para uma mesma interação bactéria-planta, utiliza-se um outro método de estudo. Como exemplo podemos citar um trabalho recente de VANDE BROEK et al. (1993), que utilizaram estirpes de *A. brasilense* expressando constitutivamente o gene *gusA* (gene repórter GUS) para monitorar os passos iniciais da interação entre *Azospirillum* e trigo. O autor descreveu como sítios iniciais de colonização (1 d.a.i.) a zona de emergência de raízes laterais e a zona de formação dos pêlos radiculares, tanto em raízes primárias como secundárias. Este padrão difere um pouco daqueles relatados por BASHAN et al. (1986b) e LEVANONY & BASHAN (1989a) para *Azospirillum*. Neste sentido, é sempre interessante aliar dois ou mais métodos de estudo na descrição de eventos como adesão, infecção e colonização bacteriana. No presente estudo para *Herbaspirillum* spp., foi utilizado apenas o MEV, porém observações preliminares de OLIVEIRA (com pessoal), trabalhando com estirpes marcadas com uma fusão LacZ em um sistema controlado, revelaram que a bactéria apresenta comportamento similar ao descrita neste estudo.

Infecção e colonização das raízes: a partir de 2 a 7 dias após a inoculação, células de *Herbaspirillum* passaram a ser observadas mais freqüentemente em duas regiões, 1) pontos de emergência de raízes laterais (Figura 11A,11B, 12A) e 2) regiões de ruptura das células da epiderme (não mostrado). Nestas regiões as bactérias aderiram-se inicialmente em monocamada de forma bastante específica, principalmente nas extremidades dos sítios de ruptura das células da epiderme (Figuras 11 C, 11 D, 11E), e posteriormente com o processo de multiplicação, foram observadas colônias bacterianas colonizando as cavidades formadas pela ruptura das células da epiderme (Figura 11F). A infecção das células do parênquima cortical da raiz iniciou-se a partir desses sítios com a multiplicação massiva das bactérias (12B, 12C, 12D) e extenuou-se através da multiplicação das bactérias principalmente nos espaços intercelulares das células do córtex, supostamente em todas as direções (13A, 13B). Aparentemente, nenhuma estrutura da planta está envolvida na condução das bactérias para o interior do córtex ou em direção ao feixe vascular, sugerindo uma multiplicação livre no apoplasto. Seções transversais dos sítios de emergência de raízes laterais exibiram grande número de bactérias colonizando os espaços intercelulares formados pela emergência das raízes secundárias (12B, 12C e 12D). Algumas destas seções foram incubadas com anticorpos específicos, imunomarcadas com ouro e reveladas com prata, mostrando claramente a colonização massiva das junções de raízes secundárias (Figura 12B, 12C). Seções transversais tomadas um pouco acima destes sítios de infecção, revelaram que muitos dos meatos celulares próximos ao cilindro central foram ocupados por microcolônias (Figuras 13C, 13D, 13F), com algumas células do córtex invadidas intracelularmente (13E, 13F, 14A). Seções semi-finas e ultra-finas de raízes infectadas intracelularmente por *Herbaspirillum* spp. foram também imunomarcadas com ouro e ou revelação com prata. Os resultados do ensaio de imunomarcção confirmaram a identidade das bactérias observadas em seções coradas com azul de toluidina (Figuras 13C, 13D, 13E, 13F) e a avaliação dos controles permitiu concluir que não houve reação cruzada com os tecidos da planta, apenas uma deposição negligenciável de partículas de prata. Ainda nas regiões de emissão de raízes laterais, associada a colonização do córtex,

FIGURA 11

Figuras 11A-F: Fotomicrografias de raízes de cana-de-açúcar cv. SP 70-1143.

Figura 11A: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (FMEV) mostrando visão geral da zona de emergência de raízes laterais. Observar as cavidades formadas pela ruptura das células do córtex e epiderme, **barra = 100 μm** .

Figura 11B: FMO de seção transversal da região de emergência de raízes laterais. Observar sítio de atração e infecção das bactérias (**seta**), **barra = 20 μm** .

Figura 11C, 11D, 11 E e 11F: todas FMEV das junções de raízes laterais 2 d.a.i. com *Herbaspirillum* spp.. Observar adesão e acumulação específica de bactérias próximas ou no interior da primeira camada de células abaixo da epiderme rompida (*), **barra = 25 μm , 10 μm , 5 μm e 25 μm** , respectivo a 11C, 11D, 11E e 11F.

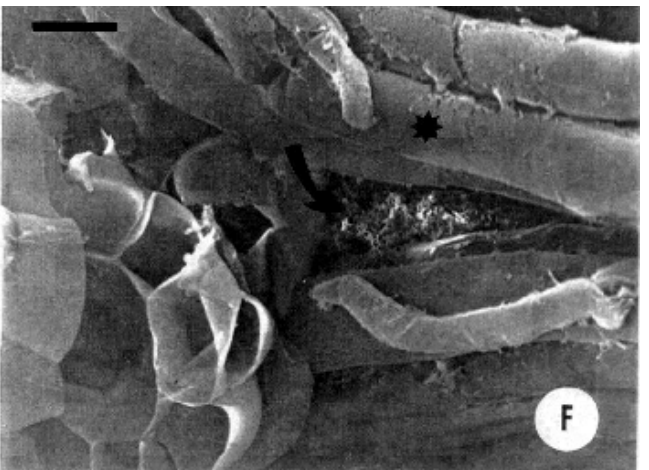
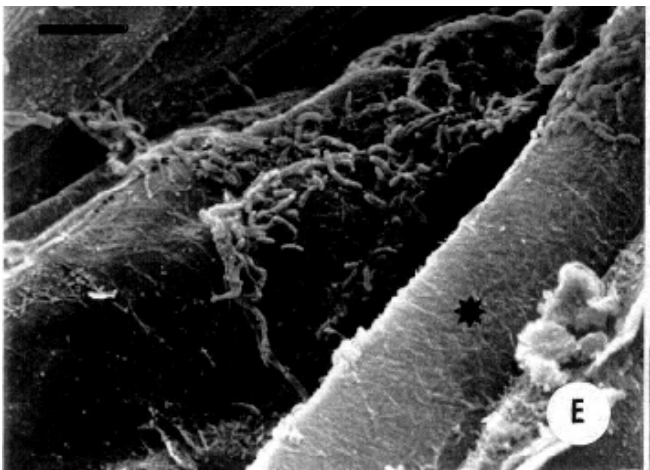
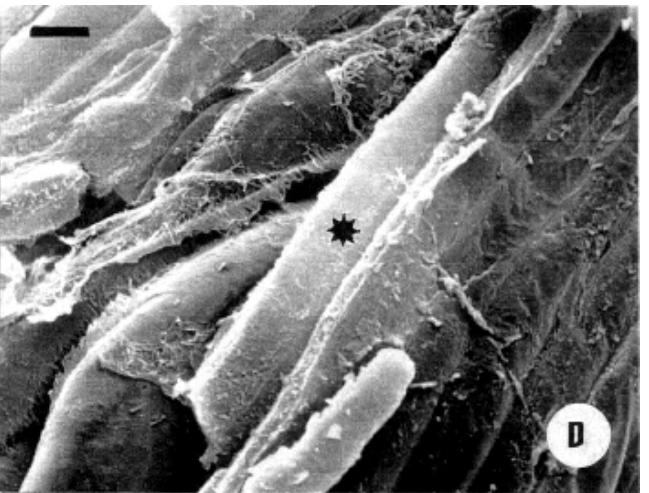
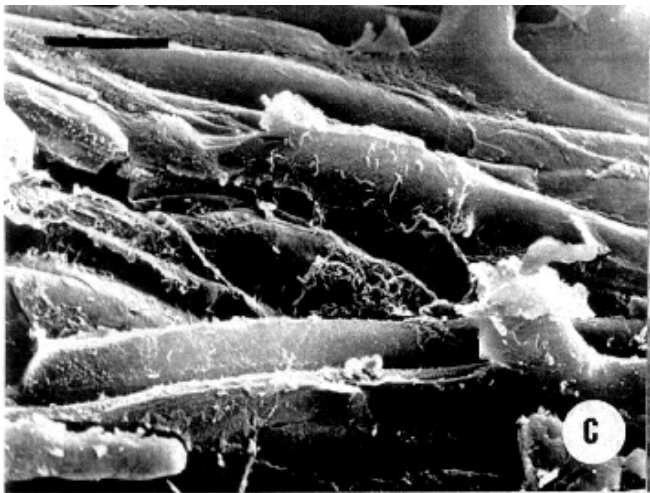
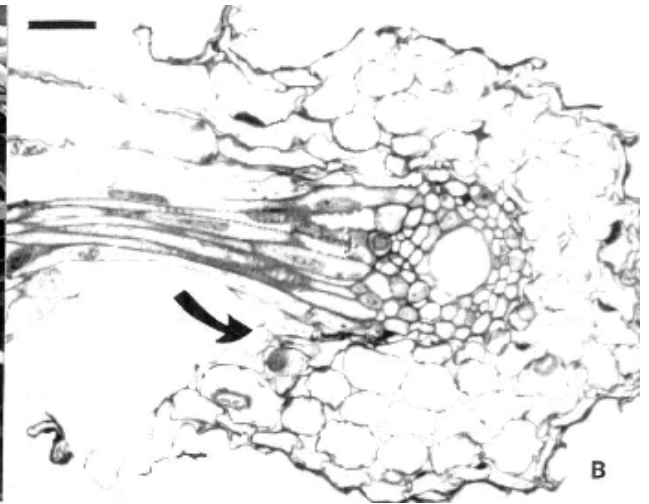
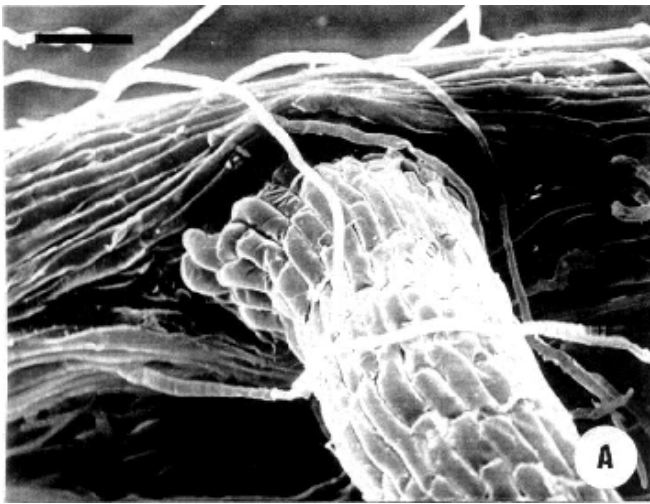


FIGURA 12

Figuras 12A-D: Fotomicrografias de raízes de cana-de-açúcar cv. SP 70-1143.

Figura 12A: FMO mostrando *H. seropedicae* HRC54 2 d.a.i. Início da multiplicação da bactéria nas junções radiculares (**seta**), **barra = 10 μ m**.

Figura 12B: FMO de seção transversal da região de emergência de raízes laterais, incubada com anticorpos policlonais anti-*H. rubrisubalbicans* M4, seguido de imunomarcacão com ouro e precipitaçãocom prata. Notar depósitos escuros indicando acumulacão de *H. rubrisubalbicans* M4 (**setas grandes e pequenas**), **barra = 20 μ m**.

Figura 12C: FMO de seção transversal da região de emergência de raízes laterais 2 d.a.i. com *H. seropedicae* Z67, incubada com anticorpos policlonais anti-*H. seropedicae* Z67, seguido de imunomarcacão com ouro e precipitaçãocom prata. Notar depósitos escuros indicando acumulacão de *H. rubrisubalbicans* Z67 (**setas grandes e pequenas**), **barra = 20 μ m**.

Figura 12D: FMO de seção da região de emergência de raízes laterais aos 2 d.a.i. com *H. seropedicae* HRC54. Observar grande número de bactérias (b) colonizando as cavidades formadas pela emissão de raízes laterais (setas), barra = 20 μ m.

Abreviações: Córtex (C), Raiz secundária (**RS**) e Xilema (X).

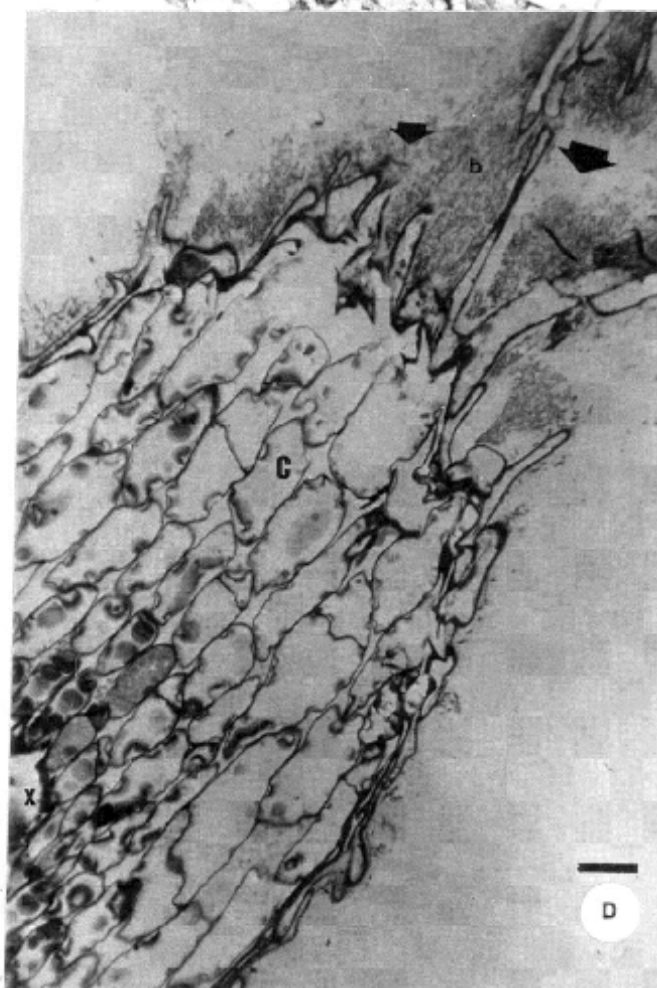
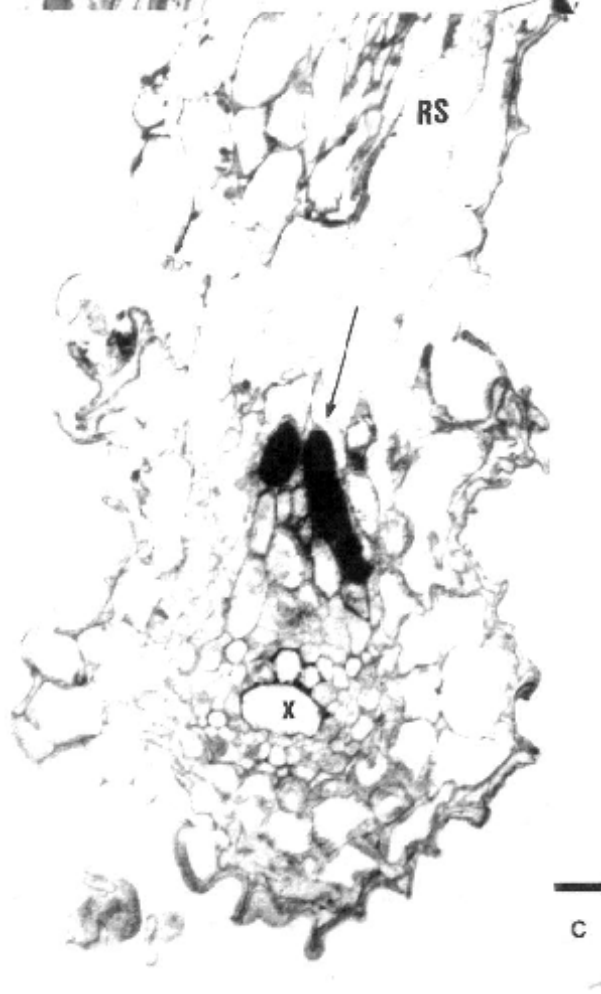
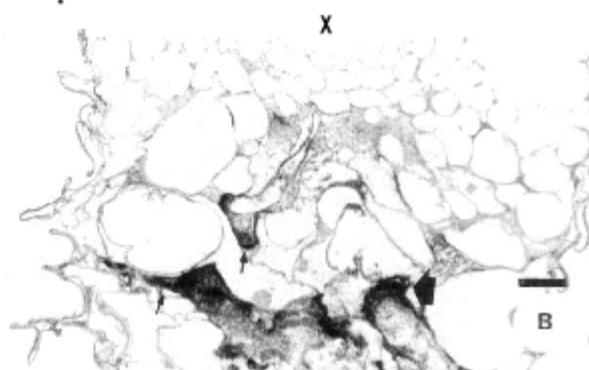
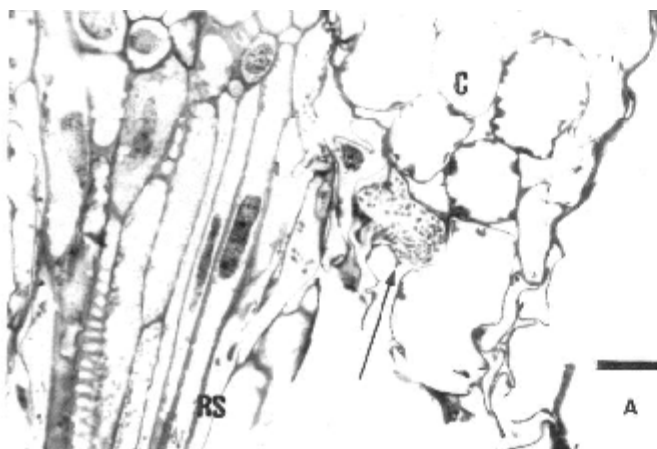


FIGURA 13

Figuras 13A-F: Fotomicrografias de colonização do córtex de raízes de cana-de-açúcar cv. SP 70-1143 aos 4 dias da inoculação com *H. seropedicae* HRC54.

Figura 13A: FMEV mostrando *H. seropedicae* HRC54 multiplicando-se nos espaços intercelulares das células do parênquima cortical, **barra = 10 μ m**.

Figura 13B: Magnificação da FMEV anterior, **barra = 5 μ m**

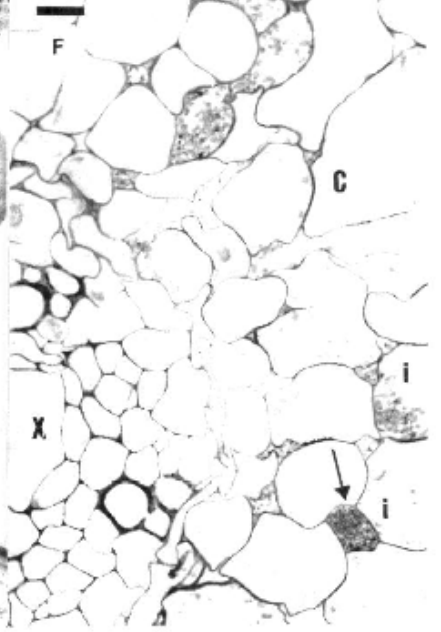
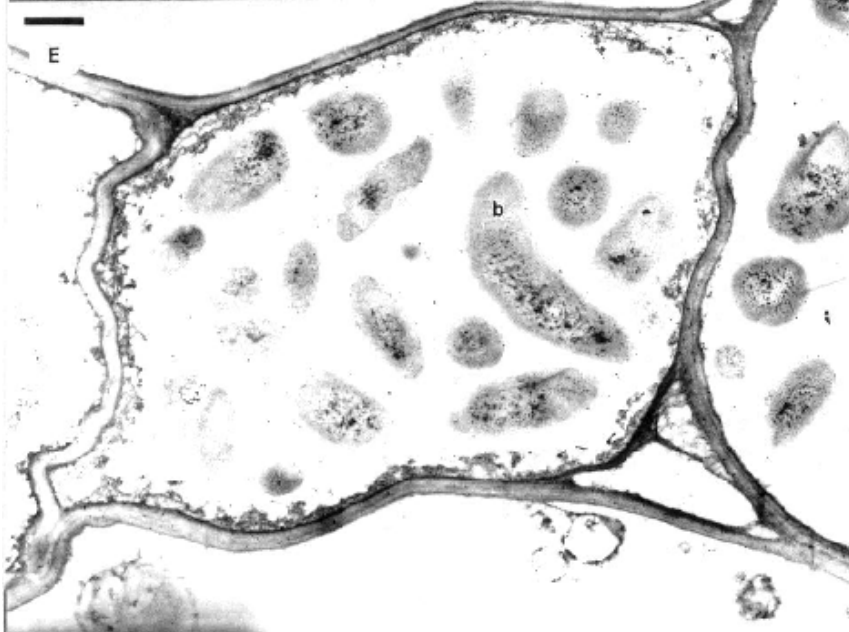
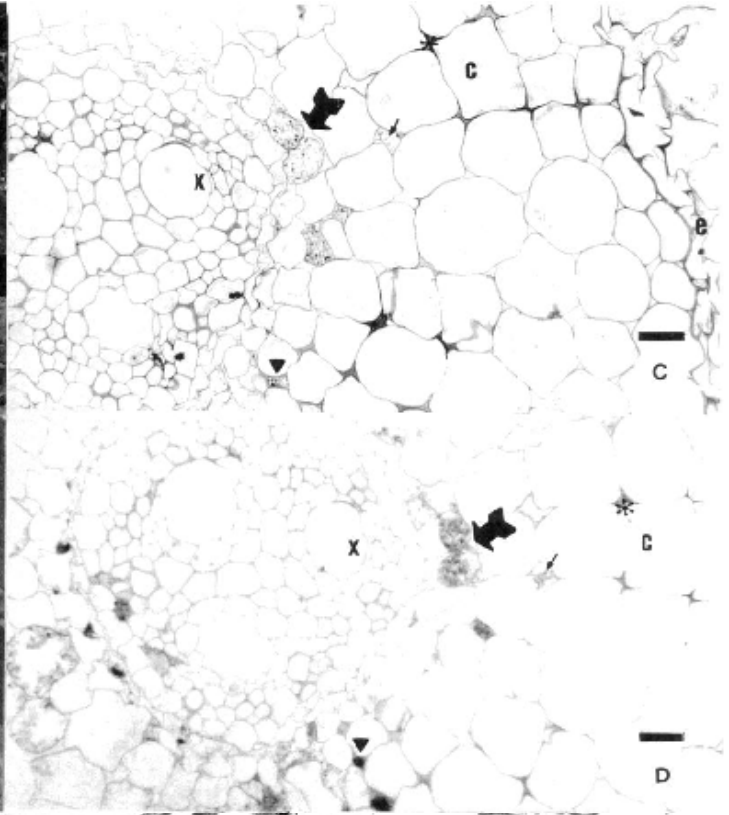
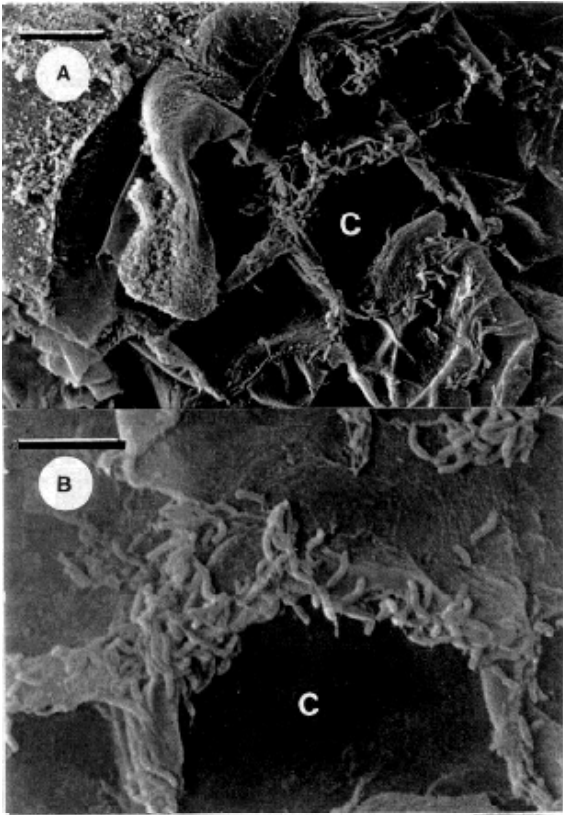
Figura 13C: FMO de seção transversal da raiz mostrando a colonização dos espaços intercelulares (**seta pequena e cabeça de seta**) e ocupação intracelular das células do córtex(**seta grande**), **barra = 20 μ m**.

Figura 13D: FMO de seção similar a anterior (fig. 13C), incubada com anticorpos policlonais anti-*H. seropedicae* HRC54, seguido de imunomarcção com ouro e precipitação com prata. Notar deposição de prata coincidente com os sítios de ocupação de bactérias da FMO anterior (**setas**), corada com azul de toluidina, **barra = 20 μ m**.

Figura 13E: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão (FMET) mostrando a colonização do interior da célula do córtex. As bactérias foram imunomarcadas com ouro, **barra = 1 μ m**.

Figura 13F: Detalhe da fig. 13D. Observar deposição de prata especificamente ao redor do contorno da célula bacteriana (**seta**), **barra = 10 μ m**.

Abreviações: Córtex (C), Raiz secundária (**RS**), Epiderme (**E**), Espaço intercelular (i) e Xilema (X).



observou-se a colonização dos vasos do xilema das raízes laterais (Figuras 14B, 14C), com as bactérias no interior do lúmen do vaso sendo reconhecida pela técnica de imuno-ouro (Figura 14D).

Herbaspirillum spp. foram observadas no cilindro vascular com alta frequência a partir de 4 dias após a inoculação, colonizando os espaços intercelulares e infectando aparentemente intracelularmente algumas células do parênquima xilemático associadas aos vasos condutores (Figura 15B, 15C). Neste momento da interação, avaliando de seções transversais seriadas ao microscópio ótico, tomadas a partir de junções de raízes secundárias até aproximadamente 1000 μm acima, pressupõe-se que a bactéria penetra no interior do feixe vascular passivamente, em sítios onde esta ocorrendo a reorientação da endoderme na zona de emergência de raízes laterais. Nestas zona, podemos perceber claramente o progresso da bactéria do sítio de infecção, passando pelo córtex e cilindro central. Histologicamente, o córtex é separado do tecido vascular pela camada de células da endoderme. A parede celular da endoderme apresenta pronunciada deposição radial de suberina e de acordo com BECKMAN (1987) pode acumular compostos fenólicos, constituindo-se como uma barreira efetiva ao avanço transversal de microrganismos, tal como observado no presente estudo onde em nenhum momento foi observada ruptura da endoderme em plantas infectadas com *Herbaspirillum*. Desse modo, para acessar o cilindro vascular, *Herbaspirillum* deve invadir sítios na raiz onde a endoderme não esteja completamente diferenciada (por exemplo, regiões próximas ao meristema, que não é o presente caso) ou esteja ocorrendo reorientação da endoderme (regiões de emergência de raízes laterais). A reorientação da endoderme ocorre porque, o periciclo, que é a camada de células que origina a raiz lateral encontra-se anterior a endoderme (ESAU, 1972). Desse modo com multiplicação celular e rompimento da endoderme, sítios potenciais a penetração passiva para o interior do tecido central são formados. Estes sítios são de curta duração se fechando com o processo de cicatrização natural da planta. É interessante ressaltar que o sítio de infecção no cilindro vascular é coincidentemente o sítio preferencial de colonização radicular (junções de raízes laterais) para *Herbaspirillum*.

FIGURA 14

Figuras 14A-D: Fotomicrografias de raízes de cana-de-açúcar cv. SP 70-1143 aos 7 dias após a inoculação com *H. seropedicae* Z67.

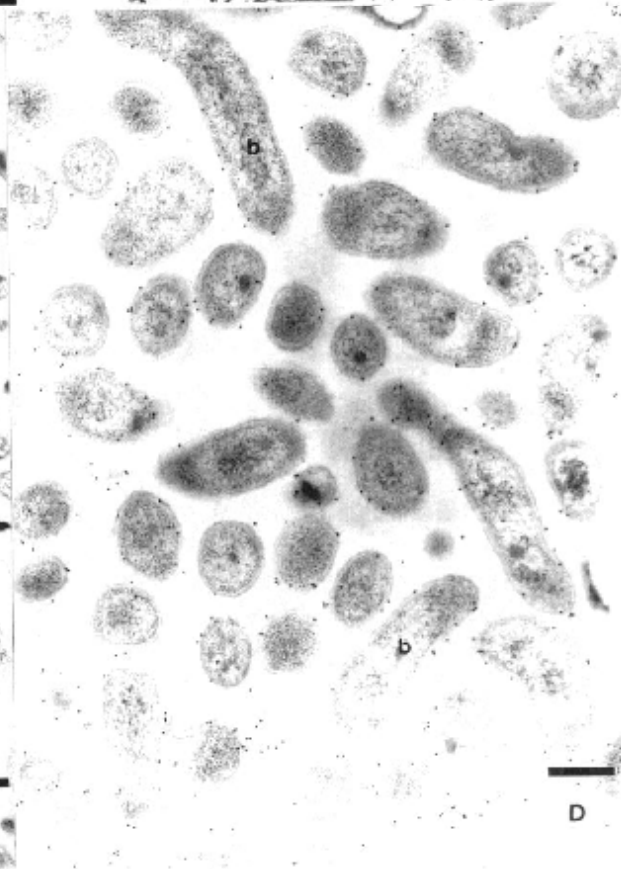
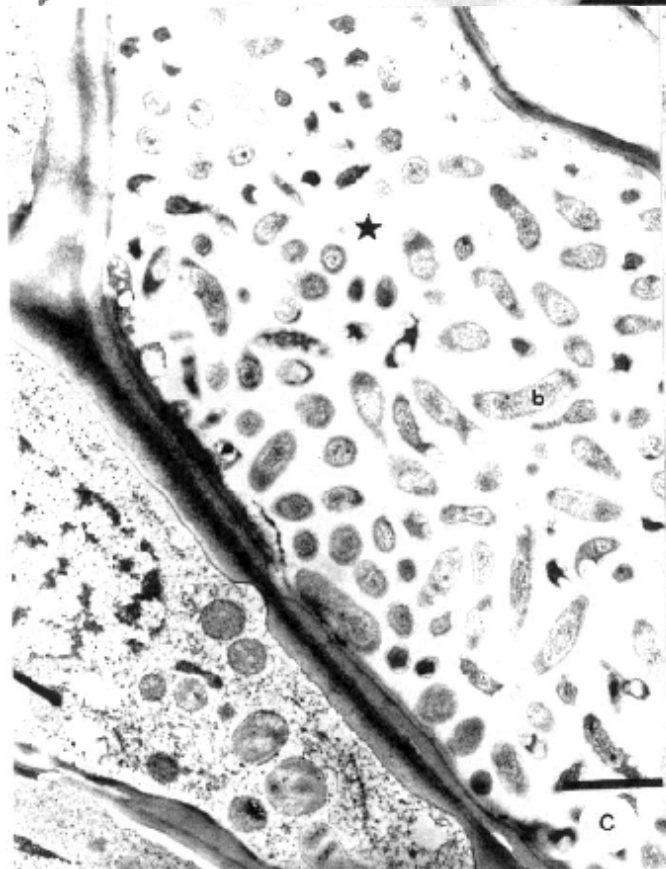
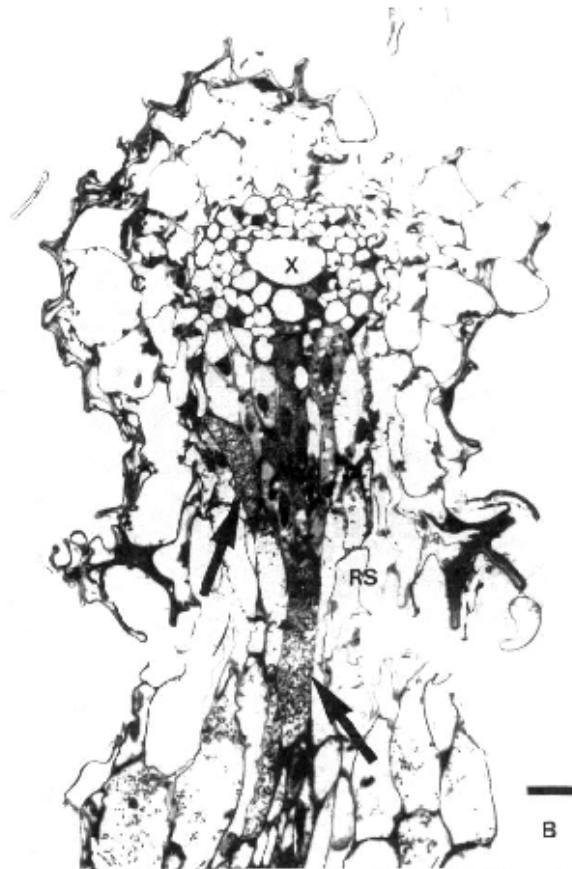
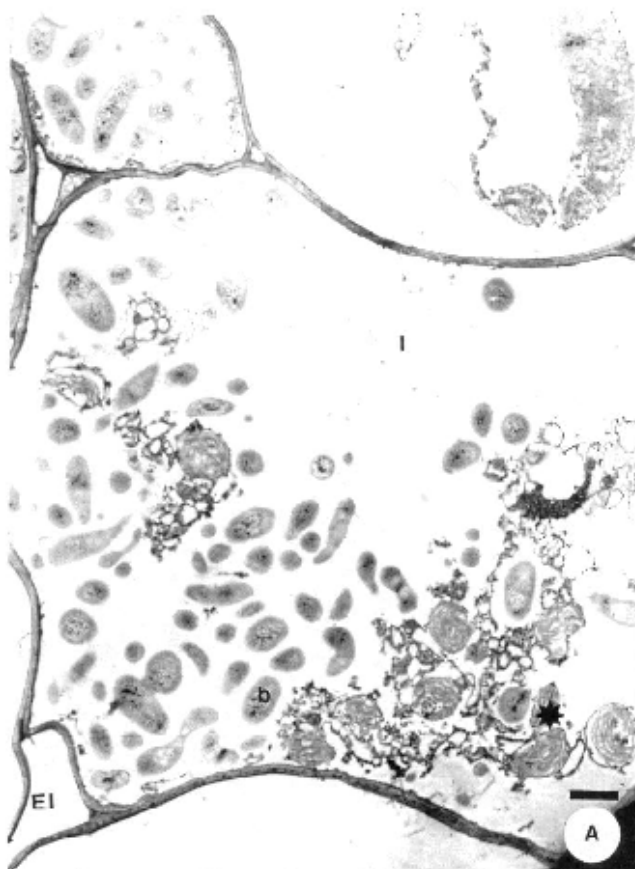
Figura 14A: FMET mostrando a colonização intracelular das células do parênquima cortical pelas bactérias (b). Observar presença de material fibrilar (*), **barra = 2 μ m**.

Figura 14B: FMO de seção longitudinal da raiz secundária, mostrando a colonização dos vasos do xilema (**setas**), **barra = 20 μ m**.

Figura 14C: FMET da seção anterior (fig. 14B) mostrando as bactérias (b) colonizando o lúmen dos vasos do xilema (**★**), **barra = 2 μ m**.

Figura 14D: Magnificação da FMET fig. 14C com as bactérias (b) marcadas com ouro, após a incubação com anticorpos policlonais anti-HRC54, **barra = 500 nm**.

Abreviações: Raiz secundária (**RS**), Epiderme (**E**), Espaço intercelular (**EI**) e Xilema (**X**).



Observando seções transversais obtidas de 100 a 200 μm acima destes sítios de acesso ao feixe vascular, notamos a presença de colônias de bactérias no feixe vascular e a ausência de bactérias no córtex (Figura 15A), o que sugere o deslocamento ascendente destas bactérias a partir destes sítios. A velocidade de deslocamento da bactéria *H. seropedicae* estirpe HRC54 foi estimada nos espaços intercelulares das células do parênquima vascular por meio da contagem de seções seriadas e registro da espessura, chegando-se a um valor aproximado de 350 μm por dia. A possibilidade de bactérias presentes nos espaços intercelulares do córtex penetrarem no tecido central rompendo ativamente a camada de células da endoderme parece pouco provável, embora não deva ser descartada.

Herbaspirillum spp. foram ainda observados na base do colmo aos 7 dias após a inoculação, colonizando células de parênquima associadas aos feixes vasculares, bem como vasos do xilema (Figuras 16B, 16C). A presença de bactérias nos espaços intercelulares e no interior de células do parênquima xilemático vizinhas a vasos do xilema do tecido vascular de raízes (Figuras 15B, 15C), associados a micrografias de MO e MEV (Figuras 14B, 14C, 16B, 16C) sugerem que o estabelecimento no interior dos vasos do xilema seria a principal via de dispersão e colonização da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar por diazotróficos endofíticos do gênero *Herbaspirillum* como relatado para *A. diazotrophicus* (JAMES et al., 1994). Porém, neste trabalho, a despeito das micrografias mostrando *Herbaspirillum* no interior dos vasos do xilema, não foi possível localizar com precisão o sítio exato no qual a bactéria primeiramente penetrou dentro do vaso do protoxilema. Informações relativas aos estágios iniciais da colonização vascular por bactérias fitopatogênicas são extremamente fragmentadas. Para *P. solanacearum* tem sido demonstrado que uma vez no interior do tecido central, as bactérias colonizam células parenquimatosas adjacentes aos vasos do xilema e que a liberação das bactérias para o interior do lúmen dos vasos ocorre pela formação de tiloses (WALLIS & TRUTER, 1978). VASSE et al. (1995) trabalhando com *P. solanacearum*, demonstraram claramente que bactérias colonizando os espaços intercelulares e células de parênquima

FIGURA 15

Figuras 15A-C: Fotomicrografias de microscopia ótica de seções transversais de raízes de cana-de-açúcar var. SP 70-1143 aos 7 dias após a inoculação com *H. seropedicae* estirpe HRC 54.

Figura 15A: Bactérias colonizando as células da endoderme (**seta**). Observar o córtex e a epiderme livres de bactérias, **barra = 10 μ m**.

Figura 15B: Colonização de células do parênquima vascular no interior do feixe vascular por *H. seropedicae* (**setas**), **barra = 10 μ m**.

Figura 15C: Detalhe do fig. 15B mostrando um pacote denso de bactérias presentes no parênquima cortical (**setas**) próximas aos vasos do xilema. Notar colonização de células do córtex (**★**), **barra = 5 μ m**.

Abreviações: Epiderme (E), Córtex (C) e Xilema (X).

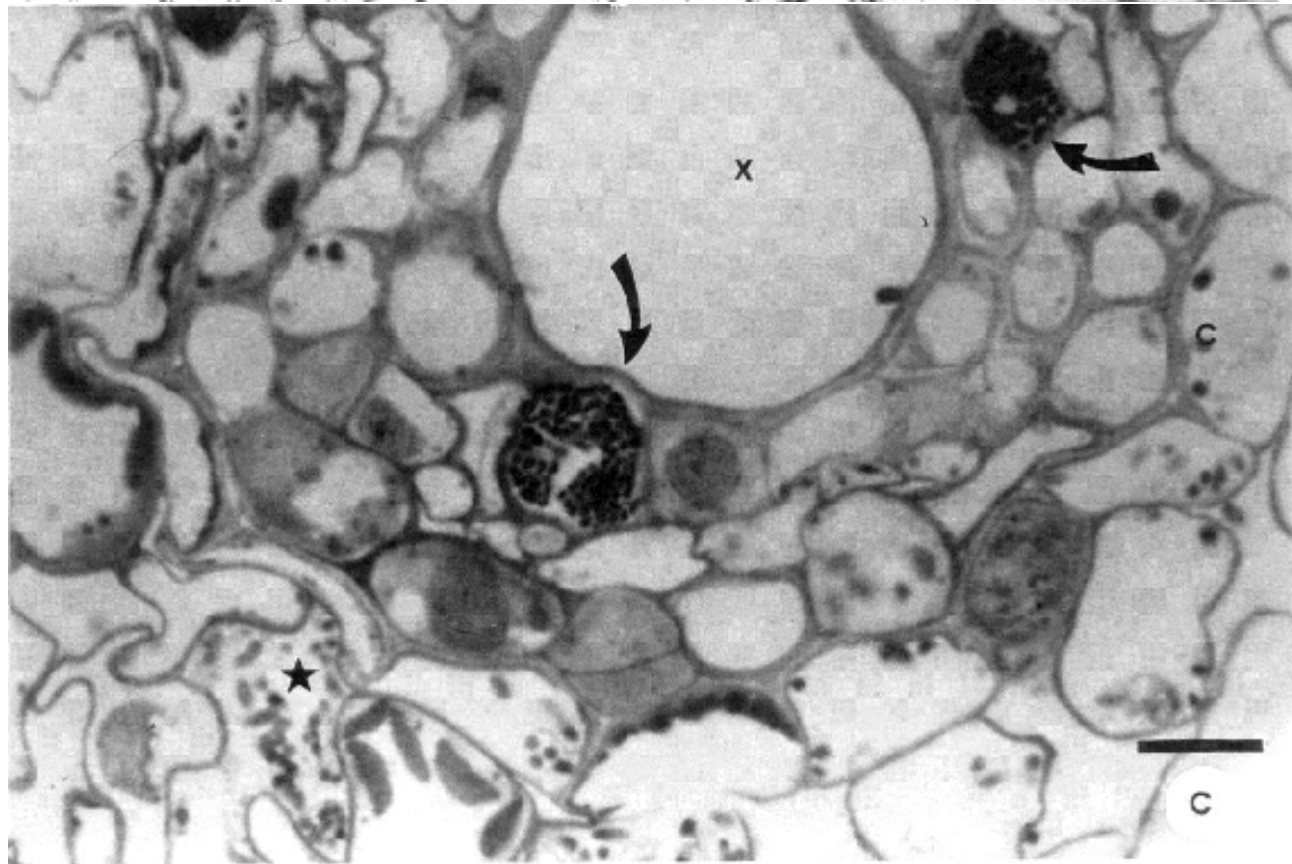
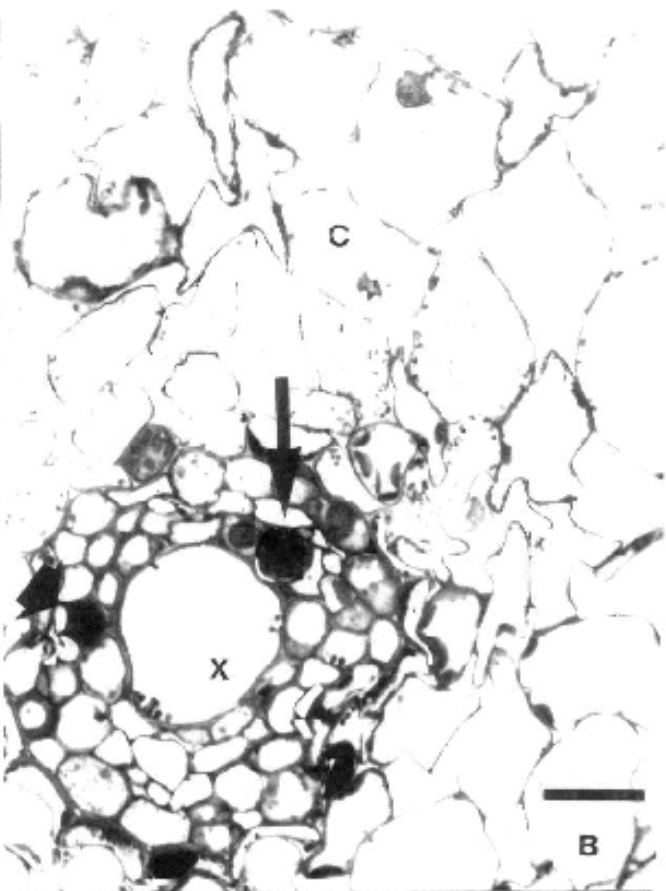
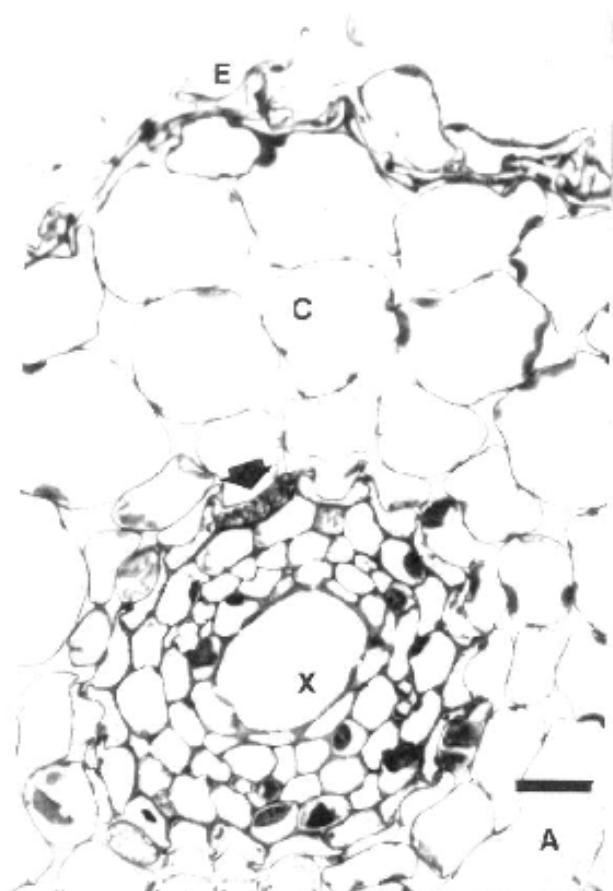


FIGURA 16

Figuras 16A-F: Fotomicrografias são de seções de colmos e folhas de cana-de-açúcar var. SP 70-1143 aos 7 d.a.i. com *Herbaspirillum* spp., exceto fig. 16D.

Figura 16A: FMEV mostrando a colonização de células do parênquima cortical associadas ao feixe vascular de colmos de cana-de-açúcar por *H. seropedicae* Z67, barra = 25 μm .

Figura 16B: FMO de seção transversal da base do colmo, mostrando a colonização dos espaços entre folhas jovens encartuchadas e dos vasos de xilema, barra = 10 μm .

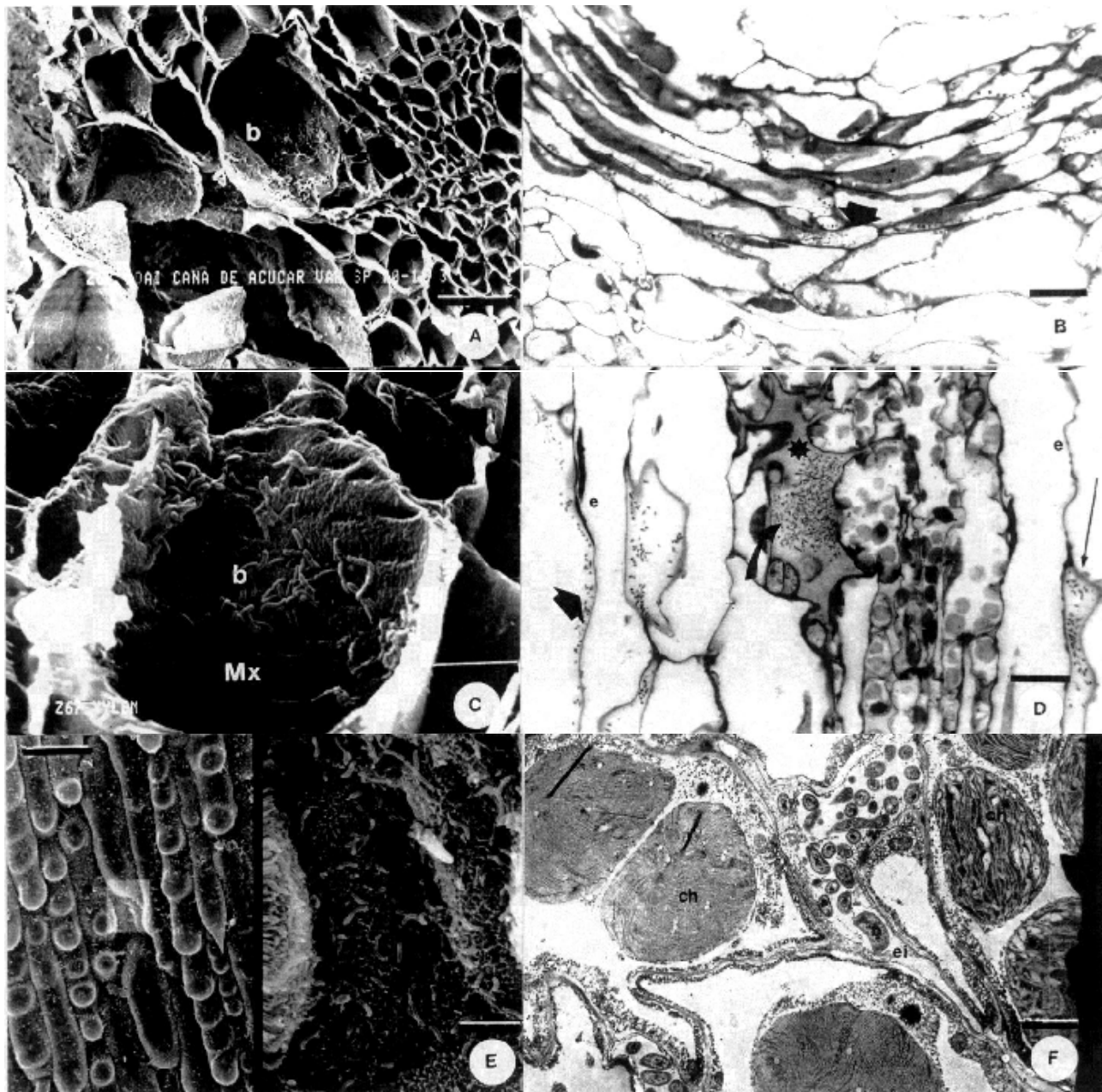
Figura 16C: FMEV de seção transversal da raiz mostrando *H. seropedicae* Z67 colonizando os vasos do metaxilema de colmos de cana-de-açúcar, barra = 5 μm .

Figura 16D: FMO de seção longitudinal de folhas de cana-de-açúcar cv. SP 70-1143, 2 dias após a inoculação com *H. rubrisubalbicans* estirpe M4. Bactérias aderidas a superfície da epiderme (e) em ambas as faces (**setas**) e colonizando o interior do mesófilo, envolvida por material gomoso (*****), barra = 10 μm .

Figura 16E: FMEV mostrando a colonização da superfície do limbo foliar por *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103, barra = 50 μm . Detalhe mostrando a adesão da bactéria a superfície das células guarda do estômato, barra = 5 μm .

Figura 16F: FMET de seção do limbo foliar inoculado com *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC1 03. Bactérias ocupando os espaços intercelulares entre as células do mesófilo e da bainha vascular, barra = 2,5 μm .

Abrev: Cloroplasto (**ch**), Epiderme (**e**), Espaço intercelular (**ei**) e Metaxilema (**Mx**).



xilemático em degeneração, adjacentes ao vaso do xilema, foram capazes de degradar a parede celular primária do elemento de vaso, penetrando e se multiplicando no interior do lúmen do vaso do protoxilema. O envolvimento de enzimas extracelulares de degradação de parede, tais como endoglucanases e endo e exopectinases, neste processo parece claro, visto que *P. solanacearum* é capaz de produzi-las, sendo consideradas como um fator preponderante de virulência (SCHELL et al., 1987). No presente estudo, em todas as seções transversais apresentando infecção do tecido vascular, não foram observados quaisquer sinais de degradação de parede dos elementos do xilema, quando muito apenas ligeira deformação, como se a bactéria estivesse exercendo forte pressão (Figura 15C). Ademais, não há relatos na literatura sobre a capacidade ou não de *Herbaspirillum* produzir enzimas de degradação de parede celular, assim este passo da interação fica sujeito a estudos posteriores.

Outras vias de infecção da planta, tais como infecção dos estômatos e aberturas naturais na parte aérea devem ser consideradas em estudos posteriores. Ressalta-se também que não foram observadas diferenças no modo de infecção e colonização do sistema radicular pelas diferentes estirpes de *H. seropedicae* (267 e HRC54) e *H. rubrisubalbicans* (M4 e HCC103). Porém, ainda neste estudo, em amostras do limbo foliar preparadas para MO, MEV e MET, foi observada a colonização dos espaços intercelulares das células do mesófilo foliar da var. SP 70-1143 por ambas estirpes de *H. rubrisubalbicans* (Figura 16D, 16F), o mesmo não ocorrendo com as estirpes de *H. seropedicae*. Como as bactérias foram observadas em seções do limbo foliar, já aos 2 dias após a inoculação, parece mais plausível pressupor que a colonização do tecido foliar tenha sido via abertura estomática, como observado na Figura 16E, o que é perfeitamente possível neste sistema, já que respingos contendo bactérias em suspensão podem se depositar na superfície foliar. A infecção estomática por estirpes de *H. rubrisubalbicans* foi demonstrado por OLIVARES et al., (1993) e nesta tese (capítulo 4) porém surpreendente é o fato de *H. seropedicae* não infectar o tecido foliar, nem mesmo nestas condições artificiais de cultivo. Tal fato sugere uma incompatibilidade entre tecidos foliares e a bactéria *H. seropedicae*, o que tem sido

confirmado por OLIVARES et al. (1996) em isolamentos conduzidos em canaviais e pela expressão de resposta hipersensível (RH) em folhas de cana artificialmente inoculadas (nesta tese).

Destaca-se que o presente estudo, pioneiro na descrição do processo de infecção de raízes de cana-de-açúcar por *Herbaspirillum*, adotou um modelo experimental sabidamente artificial. As informações aqui geradas devem ser validadas adotando-se outros modelos experimentais. Do ponto de vista anatômico, o sistema radicular das plântulas de cana-de-açúcar possuem uma organização histológica similar a de tecidos meristemáticos de plantas vegetando em condições naturais, embora seja conhecido que em meio líquido as células vegetais sejam mais frouxamente associadas (YU et al., 1969, VASSE et al., 1995). Problemas maiores de erros na descrição do processo de infecção, poderiam advir do excesso de feridas provocados pela manipulação das plantas e de condições extremamente favoráveis a multiplicação das bactérias. Entretanto, VASSE et al. (1995) estudando comparativamente o processo de infecção de raízes de tomate por estirpes virulentas e não virulentas de *P. solanacearum*, adotou um sistema de cultivo em meio MS líquido muito similar ao aqui apresentado. A descrição de todos os eventos da interação patogênica foi similar a observada em outros sistemas de estudo, incluindo sistemas próximos da condição de cultivo do tomate. O autor ainda foi capaz de distinguir os diferentes padrões de colonização das plântulas de tomate em função da virulência da estirpe, mostrando que estirpes avirulentas apresentavam um padrão mais restrito de colonização da superfície e eram incapazes de invadir os tecidos vasculares e os vasos do xilema. A tabela 3, sumariza as diferenças entre *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Acetobacter diazotrophicus* quanto a infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar .

Tabela 3 - Comparação entre *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *Acetobacter diazotrophicus* quanto a adesão, vias de infecção e colonização endofítica de plantas de cana-de-açúcar.

BACTÉRIA	<i>H. seropedicae</i>	<i>H. rubrisubalbicans</i>	<i>A. diazotrophicus</i>
PARÂMETRO			
Adesão radicular	momocamada, apolar, raramente agregados.	momocamada, apolar, raramente agregados.	momocamada, apolar, raramente agregados.
Sítios de infecção nas raízes	zonas de emergência de raízes 2 ^{aria} e feridas na epiderme	zonas de emergência de raízes 2 ^{aria} e feridas na epiderme	zonas de emergência de raízes 2 ^{aria} , feridas na epiderme e zona meristemática
Colonização do interior das raízes	intercelular, com a indução de muco derivado da planta	intercelular, com a indução de muco derivado da planta	intercelular, relatos de infecção intracelular em cél.meristemáticas
Colonização dos vasos do xilema	monocamada ou agregado discretos	monocamada/agregados discretos	monocamada ou pequenos agregados
Colonização de colmos	vasos do xilema e parênquima.	vasos do xilema e parênquima	espaços intercelulares das céls. córtex
Infecção via abertura estomática	não	sim	não
Colonização do mesófilo foliar	não	sim	não estudado
Indução de sintomas em raízes infectadas	não	não	não
Indução de sintomas em folhas inoculadas	não	depende do genótipo da planta	não

CONCLUSÕES

1. Anticorpos policlonais produzidos contra *H. seropedicae* estirpe HRC54, e *H. rubrisubalbicans* estirpe HCC103, após purificação com coluna contendo proteína A, apresentaram título de 1: 1000, limite de detecção entre 10^5 e 10^6 células por ml e reatividade cruzada muito baixa para outros gêneros de bactérias, se mostrando em ensaios imunoenzimáticos de ELISA como espécie-específicos;
2. A adesão de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* a superfície radicular de plântulas ocorre em menos de 24 horas. O modo de ataque foi apolar e predominantemente em monocamada. As bactérias colonizam todo o eixo radicular, embora maior frequência de bactérias tenha sido observada nas zonas de diferenciação / alongamento e de formação de pêlos radiculares, comparada a zona meristemática e a superfície dos pêlos;
3. *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* estabelecem-se endofiticamente através da infecção das raízes nas zonas de emergência de raízes laterais e regiões de ruptura de células da epiderme. A colonização do interior das raízes ocorre pela multiplicação das bactérias nos espaços intercelulares das células do parênquima cortical, com algumas células colonizadas intracelularmente. A colonização do córtex é seguida pela infecção do cilindro central. No tecido vascular, *Herbaspirillum* coloniza os espaços

intercelulares e o interior de células do parênquima vascular, invadindo os vasos do xilema;

4. A técnica de imuno-ouro associada ou não ao enriquecimento com prata, utilizando anticorpos policlonais produzidos contra *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* foi aplicada com grande sucesso na identificação das bactérias observadas em seções preparadas para microscopia ótica e eletrônica.

5. Estirpes de *H. rubrisubalbicans* são capazes de colonizar a parte aérea de plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar, através da infecção das aberturas estomáticas no limbo foliar;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERSHEIM, P. & ANDERSON, A.J. Carbohydrates, proteins, cell surfaces, and the biochemistry of pathogenesis. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 26, p. 31-52, 1975.
- ANDERSON, A. J. Isolation from root and shoot surfaces of agglutinins that show specificity for saprophytic pseudomonads. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 61, p. 3438-3443, 1983.
- ASSMUS, B.; HUTZLER, P.; KIRCHHOF, G.; AMANN, R.; LAWRENCE J.R.; HARTMANN, A. "In situ" localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 1013-1019, 1995.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HORSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M. & DÖBEREINER, J. Inclusion of "**Pseudomonas**" *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, within the genus *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, p. 802-810, 1996.
- BALDANI, V. L. D.; ALVAREZ, M. A. DE B.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 90, p. 35-46, 1986.

- BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Seropédica, UFRRJ, 1996, 234 p. **Tese de Doutorado.**
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 4, p. 57-60, 1987.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F. & DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 65-73, 1992.
- BALOTA, E.L. Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz). Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 281 p., 1994, **Tese de Doutorado.**
- BARRAQUIO, W.L.; LADHA, J.K.; YAO, H.Q. & WATANABE, I. Antigenic relationship of N₂-fixing *Pseudomonas* strain H8 to various known cultures and rice rhizosphere isolates studied by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 32, p. 402-408, 1986.
- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 2120-2131, 1994.
- BASHAN, Y. & LEVANONY, H. Active attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to quartz sand and light textured soil by protein bridging. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v. 134, p. 2269-2279, 1988.
- BASHAN, Y. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v. 132, p. 3407-14, 1986a.

- BASHAN, Y. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 18, p. 297-301, 1986b.
- BASHAN, Y.; MITIKU, G.; ZIV-VECHT, O. & LEVANONY, H. Estimation of minimal numbers of *Azospirillum brasilense* using time-limited liquid enrichment combined with enzyme-linked immunosorbent assay. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 23, p. 135-138, 1991 b.
- BASHAN, Y.; SHARON, E. & OKON, Y. Scanning electron and light microscopy of infection and symptom development in tomato leaves infected with *Pseudomonas tomato*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 19, p. 139-144, 1981.
- BASHAN, Y; LEVANONY, H. & WHITNOYER, R. Root surface colonization of non-cereal plants by pleomorphic *A. brasiliense* Cd. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v. 137, p. 187-196, 1991 a.
- BAUER, W.D. Infection of legumes by Rhizobia. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 32, p. 407-449, 1981.
- BECKMAN, C. H. The nature of wilt diseases of plants. **American Phytopathological Society**, St Paul, Minnesota, 1987.
- BELL, G.I. Models for the specific adhesion of cells to cells. **Science**, Washington, v. 200, p. 618-627, 1978.
- BERG, R. H.; VASIL, V. & VASIL, I. K. The biology of *Azospirillum*-sugarcane association. II. Ultrastructure. **Protoplasma**, New York, v. 101, p. 143-163, 1979.
- BOHER, B.; KPEMOUA, K.; NICOLE, M.; LUISETTI, J. & GEIGER, J.P. Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, p. 777-788, 1995.

- BOONJAWAT, J.; CHAISIRI, P.; LIMPANANONT, J.; SOONTAROS, S.; PONGSAWASDI, P.; CHAOPONGPANG, S.; PORNPATTKUL, S.; WONGWAITAYAKUL, B. & SANDUAN, L. Biology of nitrogen-fixing rhizobacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 137, p. 119-125, 1991.
- BUDDENHAGEN, I. & KELMAN, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 2, p. 203-230, 1964.
- BUELL, C. R.; WHETTON, R.; TARI, P. & ANDERSON, A. J. Characterization of cell surface properties in agglutinable and nonagglutinable mutants of *Pseudomonas putida*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 787-794, 1993.
- CANNY, M.J. Apoplastic water and solute movement New rules for an old space. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 215-236, 1995.
- COOK, A.A.; WALKER, J.C. & LARSON, R. H. Studies on the disease cycle of black rot of crucifers. **Phytopathology**, St. Paul, v. 42, p. 162-167, 1952.
- CROES, C.; MOENS, S.; VAN BASTELAERE, E.; VANDERLEYDEN, J. & MICHIELIS, K. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption-induced to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v. 139, p. 2261-2269, 1993.
- DANSCHER, G. & NØRGAARD, J. O. R. Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 31, p. 1394-1398, 1983.
- DANSCHER, G. Localization of gold in biological tissue: A photochemical method for light and electron microscopy. **Histochemistry**, v. 71, p. 81-88, 1981.
- DAZZO, F. B.; NAPOLI, C. A. & HUBBELL, D. H. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rhizobium*-clover symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 32, p. 166-171, 1976.

- DAZZO, F.B. AND HUBBELL, D.H. Cross-reactive antigens and lectin as determinant of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association. **Applied Microbiology**, Berlin, v.30, p. 1017-1033, 1975.
- DE WEGER, L. A.; VAN LOOSDRECHT, M. C. M.; KLAASEN, H. E. & LUGTENBERG, B. Mutational changes in physicochemical surface properties of plant-growth-stimulating *Pseudomonas* spp. do not influence the attachment properties of the cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, p. 2756-2761, 1989.
- DIEN, H. G.; GODBILLON, G. & SCHMIDT, E. L. Application of the fluorescent-antibody technique to the study of an isolate of *Beijerinckia* in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 23, n. 2, p. 161-165, 1977.
- DÖBEREINER, J. & DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: **Proceedings of the 1st International Symposium on N₂ fixation**. Eds. W. E. NEWTON & C. J. NYMAN, pp 518-38. Washington State University Press, Pullmann, WA., 1976
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, São Paulo. v. 44, p. 310-313, 1992.
- DÖBEREINER, J.; REIS, V.M.; LAZARINE, A.C. New N₂-fixing bacteriana association with cereals and sugar cane. In: **Nitrogen Fixation: hundred years after**. BOTHE, H.; DE BRUJIN, F.J.; NEWTON, W.E. (Eds.), Stuttgart: Gustav Fischer, p. 717-722, 1988.
- DÖBEREINER, J.; REIS, V.M.; PAULA, M.A.; OLIVARES, F.L. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: **New horizons in nitrogen fixation**. PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. (eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 671-676, 1993.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; McCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F. ORTEGA, E. & RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: A new role for the apoplast. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 1139-1147, 1994.

- DONG, Z.; McCULLY, M.E. & CANNY, M. J. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Some anatomical and physiological data. **Annals of Botany**, London, v. 80, p. 147-158, 1997.
- DOUGLAS, C.J.; HALPERIN, W. AND NESTER, E.W. *Agrobacterium tumefaciens* mutants affected in attachment to plant cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 152, p. 1265-1275, 1982.
- DURBIN, R.D. Site of action of disease determinants in relation to symptom expression. In: ASADA, Y.; BUSCHNELL, W.R.; OUCHI, S. & VANCE, C.P. **Plant Infection. The Physiological and Biochemical Basis**. Ed Japanese Science Society Press, Tokyo, p. 15-25, 1982.
- EL-NASSAR, H.; MOORE, L. & GEORGE, R. Enzyme-linked immunosorbent assay quantification of initial infection of wheat by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* as moderated by biocontrol agents. **Phytopathology**, St. Paul, v. 76, p. 1319, 1986.
- ESAU, K. Anatomia das plantas com semente, tradução: Berta Lange de Morretes. São Paulo, Ed. Edgard Blücher, São Paulo, 293 p., 1972.
- FAHRAEUS, G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. **Journal of General Microbiology**, Oxford, v. 16, p. 374-381, 1957.
- FENG, T. Y. & KUO, T. T. Bacterial leaf blight of rice plant. VI. Chemotactic responses of *Xanthomonas oryzae* to water pores on the leaf of rice plants. **Botanical Bulletin Academia Sin.**, v. 16, p. 126-136, 1975.
- FOSTER, R. C. The ultrastructure of the rizoplane and rhizosphere. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 211-234, 1986.
- FOX, R. T. V.; MANNERS, J. G. & MYERS, A. Ultrastructure of entry and spread of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* into potato tubers. **Potato Research**. v. 14, p. 61-73, 1971.

- FOX, R. T. V.; MANNERS, J. G. & MYERS, A. Ultrastructure of tissue disintegration and host reactions in potato tubers infected by *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. **Potato Research**, v. 15, p. 130-145, 1972.
- GELVIN, S.B. Chemical signalling between *Agrobacterium* and its host. In: Molecular Signals in Plant-Microbe Communications, D.P.S. VERNA, eds Boca Raton, Florida: **CRC Press**, p. 137-167, 1992.
- GOODMAN, R. N. The infection process. In: **Phytopathogenic Prokaryotes**, Vol 1, ed. M. S. MOUNT & G. H. LACY, p. 31-62 , New York: Academic. 541 p, 1982.
- GROSS, D.C. & CODY, Y.S. Mechanisms of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, p.403-410, 1985.
- GURLITZ, R.H.G.; LAMB, P.W. AND MATTHYSSE, A.G. Involvement of carrot cell surface proteins in attachment of *Agrobacterium* infection, 1984.
- HAAHTELA, K.; LAAKSO, T. & KORHONEN, T. K. Associative nitrogen fixation by *Klebsiella* spp.: adhesion sites and inoculation effects on grass roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, p. 1074-1079, 1986.
- HALVERSON, L.J. & STACEY, G. Signal exchange in plant-microbe interaction. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 50, p. 193-225, 1986.
- HARTWIG, U. A.; JOSEPH, C. M. & PHILLIPS, D. A. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti* **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, p. 797-803, 1991.
- HENDRE, R.R.; IYOR, R.S.; KOTWALM, M.; KLUSPE, S.S. & MASCARENHAS, A.F. Rapid multiplication of sugar cane by tissue culture. **Sugar Cane**, Port Talbot, v. 1, p. 5-8, 1983.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, p. 339-364, 1994.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; MONTAGU, M. V. & KELLENBERGER, E. Infection of intact roots of Kallar grass and rice seedlings by *Azoarcus*. **Development in Plant Soil Science**, v. 48, p. 235-242, 1991.

JAMES Jr., D. W.; SUSLOW, T. V. & STEINBACK, K. E. Relationship between rapid, firm adhesion and long-term colonization of roots by bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 2, p. 392-397, 1985.

JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; MINCHIN, F.R. & BREWIN, N.J. Intercellular location of glycoprotein in soybean nodules: effect of altered rhizosphere oxygen concentration. **Plant Cell and Environmental**, Oxford, v.14, p.467-476, 1991.

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

JIA, X. M.; MO, W. Y. & QIAN, Z. S. Species and enumeration of nitrogen fixing bacteria in rice root system. **Acta Agricultural University Zhejangensis**, v. 15, p. 57-60, 1989.

KORHONEN, T. K.; TARKKA, E.; RANTA, H. & HAAHTELA, K. Type 3 fimbriae of *Klebsiella* sp.: molecular characterization and role in bacterial adhesion to plant roots. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 155, p. 860-865, 1983.

LEVANONY, H. & BASHAN, Y. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 132, p. 2899-2908, 1989a.

LEVANONY, H. & BASHAN, Y. Localization of specific antigens of *Azospirillum brasilense* Cd in its exopolysaccharide by immuno-gold staining. **Current Microbiology**, New York, v. 18, p. 145-149, 1989b.

- LEVANONY, H.; BASHAN, Y. & KAHANA, Z. Enzyme-linked immunosorbent assay for specific identification and enumeration of *Azospirillum brasilense* Cd in cereal roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 358-364, 1987.
- LEVANONY, H.; BASHAN, Y.; ROMANO, B. & KLEIN, E. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and with in wheat root by immuno-gold labelling. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 117, p. 207-218, 1989.
- LEVANOY, H. & BASHAN, Y. Avidin-biotin complex incorporation into enzyme-linked immunoabsorbent assay (ABELISA) for improving the detection of *Azospirillum brasilense* Cd. **Current Microbiology**, New York, v. 20, p.91-94, 1990.
- LI, R. & MACRAE, I.C. Specif association of diazotrophic Acetobacters with sugarcane, **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 23, p. 999-1002, 1991.
- LI, R.; & MACRAE, I.C. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 24, p. 413-419, 1992.
- LIPPINCOTT, B.B. AND LIPPINCOTT, J.A. Bacterial attachment to a specific wound site as a essential stage in tumour initiation by *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 97, p. 620-628, 1969.
- LIPPINCOTT, J.A. AND LIPPINCOTT, B.B. Nature and specificity of the bacterium-host attachment in *Agrobacterium* infection, In: **Cell Wall Biochemistry Related to Specificity in Host-Plant Pathogen Interaction**, (B. SOLHEIM AND J. RAA, eds.), Universitets-forlaget, Tromso, Norway, p. 439-451, 1976.
- MAAS, J. L.; FINNEY, M. M.; CIVEROLO, E.L. & SASSER, M. Association of an unusual strain of *Xanthomonas campestris* with apple. **Phytopathology**, St. Paul, v. 75, p. 438-445, 1985.

- MALIK, K. A.; ZAFAR, Y. & HUSSAIN, A. Nitrogenase activity in the rhizosphere of Kallar grass [*Diplachne fusca* (Linn.) Beauv.] . **Biologica**, v. 26, p. 107-111, 1980.
- MARTENSON, A.M.; GUSTAFSSON, J.G. & LJUNGGREN, H.D. A modified sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Rhizobium meliloti* strain identification. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v. 130, p. 247-253, 1984.
- MARTINEZ-MOLINA, E.; MORALES, V.M. & HUBBELL, D.H. Hydrolytic enzyme production by *Rhizobium*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 38, p. 1186-1188, 1979.
- MATSUDA, I. & SATO, Z. Bending symptoms of young rice seedlings grown in nursery flat caused by *Pseudomonas avenae*, the causal agent of bacterial stripe of rice. III. Mode of infection. **Bulletins National Institute of Agriculture Research Service Center**, v. 38, p. 169-180, 1983.
- MATTHYSSE, A. G.; WYMAN, P. M. & HOLMES, K. V. Plasmid-dependent attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to plant tissue culture cells. **Infection and Immunology**, v. 22, p. 516-522, 1978.
- MATTHYSSE, A.G.; HOLMES, K.V. AND GURLITZ, R.H.G. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 145. p. 583-595, 1981.
- McCLUNG, C. R.; PATRIQUIN, D. G. & DAVIS, R. E. *Campylobacter nifrofigilis* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 33, p. 605-612, 1983b.
- McCLUNG, C. R.; VAN BERKUM, P.; DAVIS, R. E. & SLOGER, C. Enumeration and localization of N_2 fixing bacteria associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, p. 1914-1920, 1983a.

- MEIER, D. A cytological study of the early infection stages of the black rot of cabbage. **Bulletins Torrey Botanical Club**, v. 61, p. 173-190, 1934.
- MEW, T. W.; MEW, I. C. & HUANG, J.S. Scanning electron microscopy of virulent and avirulent strains of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* on rice leaves. **Phytopathology**, St. Paul, v. 74, p. 635-641, 1984.
- MITCHELL, R.E. The relevance of non host-specific toxins in the expression of virulence by pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 22, p. 215-245, 1984.
- MITCHELLIS, K.; CROES, C. & VANDERLEYDEN, J. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v. 137, p. 2241-2246, 1991.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F.A. Revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, p. 473-497, 1962.
- NAMBIAR PT & ANJIAH, V. Enumeration of rhizobia by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v.58, p. 187-193.
- OLIVARES, F.L., JAMES, E.K., REIS, V.M., BALDANI, V.L.D., BALDANI, J.I. AND DÖBEREINER, J. Colonização do tecido vascular por *Herbaspirillum* spp. em sorgo e cana-de-açúcar. **Fitopatologia Brasileira**, Suplemento, n. 18, p. 313, Sociedade Brasileira de Fitopatologia, Aracaju, Sergipe, 1993.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, p. 197-200, 1996.
- OLIVEIRA, E. Estudo da associação entre bactérias diazotróficas e arroz. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, **Tese de Mestrado**, 1992.

- PANOPOULOS, N.J. & SCHROTH, M.N. Role of flagellar motility in the invasion of bean leaves *Pseudomonas phaseolicola*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 64, p. 1389-1397, 1974.
- PARKER, D.; ORNSTON, N.L. & NESTER, E.W. Chemotaxis to plant phenolic inducers of virulence genes is constitutively expressed in the absence of the Ti plasmid in *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, p. 5336-5338, 1987.
- PATRIQUIN, D. G. & DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 734-742, 1978.
- PATRIQUIN, D. G.; DÖBEREINER, J. & JAIN, D. K. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, n. 8, p. 900-915, 1983.
- PAULA, M.A. & DÖBEREINER, J. Interaction of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugar cane (*Saccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 11, p. 111-115, 1991.
- PETERS, N. K. & LONG, S. R. Alfafa root exsudates and compounds which promote and inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p. 396-400, 1988.
- PINHEIRO, R.O. Estudo da adesão de *Azospirillum* spp. às raízes de trigo. UFRRJ, Seropédica, Rio de Janeiro, 110 p., **Tese de Mestrado**, 1992.
- PUEPPKE, S. G. Adsorption of slow- and fast-growing rhizobia to soybean and cowpea roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 75, p. 924-928, 1984.
- QUISPEL, A. A. Search for signals in endophytic microorganisms. In: **Molecular signals in plant-microbe communications**. Eds. P.S. VERMA, Publisher place, p. 475-491, 1992.

- REINHOLD, B. & HUREK, T. Light microscopical visualization of diazotrophs on and in roots by immunogold-silver staining. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 6, p. 298-301, 1988b.
- REINHOLD, B. & HUREK, T. Location of diazotrophs in the root interior with special attention to the Kallar grass association. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 110, p. 259-268, 1988a.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; NIEMANN, E. G. & FENDRIK, I. Close association of *Azospirillum* and diazotrophic rods with different root zones of kallar grass **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 52, p. 520-526, 1986.
- REIS JR., F.B.; OLIVARES, F.L.; REIS, V.M. AND DÖBEREINER, J. Microscope evidence of the endophytic colonization in sugar cane by the nitrogen fixing bacteria *Acetobacter diazotrophicus*. 3rd Interamerican Conference on Electron Microscopy and XV Meeting of the Brazilian Society for Electron Microscopy. **Acta Microscópica**, vol. 4, p. 282, 1995.
- REIS, V.M. Estudo de infecção e métodos de detecção da bactéria endófito *Acetobacter diazotrophicus* em associação com a cana-de-açúcar. Seropédica, UFRRJ, 1994, 213 p. **Tese de Doutorado**.
- REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M.; FERREIRA, A.C.; REIS, F.B.; ASSIS, J.R.; SALLES, J.F. E WEBER, O.B. Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas. Seropédica: **EMBRAPA-CNPAB**, 11 p., (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 30).
- REIS, V.M.; OLIVARES, F.L. & DÖBEREINER, J. Improved Methodology for Isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and Confirmation of its Endophytic Habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 401-405, 1994.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V.A. & VICTOT, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri TIPO B. **Suma Phytopathologica**, São Paulo, v. 12, p. 16, 1986.

- ROMANTSCHUK, M. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. **Annual Review of Plant Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 225-243, 1992.
- ROSEN, H. R. Mode of penetration and of progressive invasion of fire-blight bacteria into apple and pear blossoms. **Arkansas Agricultural Experimental Stn. Bullets**, v. 331, 68p, 1936.
- ROVIRA, A. D. Zones of exudation along plant roots and spatial distribution of microorganisms in the rhizosphere. **Pesticides Science**, v. 4, p. 361-366, 1973.
- RUPPEL, S. & WACHE, H. Isolation and selection of phytoeffective bacteria. **Zentralbl. Mikrobiol.**, v. 145, p. 599-603, 1989.
- RUPPEL, S.; HECHT-BUCHHOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, O. & SCHMELZER, R. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 145, p. 261-273. 1992.
- SCHANK, S. C.; SMITH, R. L.; WEISER, G. C.; ZUBERER, D. A.; BOUTON, J. H.; QUESENBERRY, K. H.; TYLER, M. E.; MILAN, J. R. & LITTEL, R. C. Fluorescent antibody technique to identify *Azospirillum brasilense* associated with roots of grasses. **Soil Biology Biochemistry**, Exeter, v. 11, p. 287-295, 1979.
- SHELL, M. A. Purification and characterization of an endoglucanase from *Pseudomonas solanacearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, p. 2237-2241, 1987.
- SCHLOTTER, M.; BORLINGHAUS, R.; BODE, W. & HARTMANN, H. Direct identification and localization of *Azospirillum* in the rhizosphere of wheat using fluorescent labelled monoclonal antibodies and confocal scanning laser microscopy. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 171, p. 173-177, 1993.

- SCHLOTER, M.; KIRCHHOF, G.; HEINZMANN, U.; DÖBEREINER, J. & HARTMANN, A. Immunological studies of the wheat-root-colonization by the *Azospirillum* brasilense strains Sp7 and Sp245 using strain-specific monoclonal antibodies. In: **Nitrogen Fixation with Non-Legumes**, (N.A. Hegazi, M. Fayez and M. Monib, Eds.), pp, 291-297. American University in Cairo Press, Cairo, Egypt, 1994.
- SCHMIT, J. Microscopic study of early Stages of infection by *Pseudomonas solanacearum* E.F.S on in vitro grown tomato seedlings. **Proceedings for 4th International Conference of Plant Pathology Bacteriology**, In: Angers: GILBERT-CLAREY, p. 841-856, 1978.
- SCHNEIDER, R. W. & GROGAN, R. G. Tomato leaf trichomes, a habitat for resident population of *Pseudomonas tomato*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 67, p. 898-902, 1977.
- SCHROTH, M. N. & HANCOCK, J. G. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. **Science**, Washington, v. 216, p. 1376-1381, 1982.
- SEQUEIRA, L.; GAARD, G. & DE ZOETEN, G.A. Interaction of bacteria and host cell wall: its relation to mechanisms of induced resistance. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 10, p. 43-50, 1977.
- SPRENT, J.I. & JAMES, E.K. N₂-fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: FENDRIK, I., DEL GALLO, M., VANDERLEYDEN, J. AND DE ZAMAROCZY, M. (eds.) **Azospirillum VI and related microorganisms**. Berlin, Heidelberg:Springer-Verlag, p. 15-30, 1995.
- TANAKA, Y. & NODA, N. Studies on the factors affecting survival of *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith, the causal agent of tobacco wilt disease. **Okayama Tobacco Experimental Station, Bull**, v. 32, p. 81-94, 1973.
- THOMSON, S. V. Stigmatic surfaces of pear flower pistils as source of inoculum for *Erwinia amylovora*. **Proceedings for 4th International Conference of Plant Pathology Bacteriology**, In: Angers: GILBERT-CLAREY, p. 816, 1978.

UMALI-GARCIA, M.; HUBBELL, D. H.; GASKINS, M. H. & DAZZO, F. B. Association of *Azospirillum* with grass roots, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, p. 219-226, 1980.

VAN LAERE, O.; DE WAEL, L. & DE MEY, J. Immuno gold staining (IGS) and immuno gold silver staining (IGSS) for the identification of the plant pathogenic bacterium *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., **Histochemistry**, v. 83, p. 397-399, 1985. .

VANDE BROEK, A.; MICHIELS, J.; VAN GOOL, A.; VANDERLEYDEN, J. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nif* H gene during association. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 6, p. 592-600, 1993.

VANDEN BOSCH, K. A. Light and electron microscopic visualization of uricase by immunogold labelling of sections of resin-embedded soybean. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 143, p. 187-197, 1986.

VANDEN BROEK, A. S. & VANDERLEYDEN, J. The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St Paul, v. 8, p. 800-810, 1995.

VASSE, J.; FREY, P. & TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 8, n. 2, p. 241-251, 1995.

WALLIS, F. M. & TRUTER, S. J. Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 13, p. 307-317, 1978.

WEI, G.; KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by Select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 1508-1512, 1991.

WELLER, D. M. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. **Phytopathology**, St. Paul, v. 73, p. 1548-1553, 1983.

- YAMANAKA, S.; OZAKI, M. & KATO, S. Some observations on angular leaf spot of cucumber with a scanning electron microscope. **Tohoku Journal of Agricultural Research**, v. 30, p. 135-141, 1980.
- YOU, C.B.; LIN, M.; FANG, J.; SONG, J. Attachment of *Alcaligenes* to rice roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Exetere, v. 27, p. 463-466, 1995.
- YU, P.T.; STOLZY, H. & LETEY, J. Survival of plants under prolonged flooded conditions. **Agronomy Journal**, v. 61, p. 844-847.

CAPÍTULO 4

**MICROSCOPIA ÓTICA E ELETRÔNICA DA INTERAÇÃO ENTRE
ESTIRPES DE *HERBASPIRILLUM SPP.* E GENÓTIPOS DE CANA-DE-
AÇÚCAR E SORGO COM DIFERENTES GRAUS DE
SUSCEPTIBILIDADE A DOENÇA ESTRIA MOSQUEADA**

RESUMO

Em experimentos conduzidos em casa de vegetação, plantas de cana-de-açúcar var. SP 70-1143 (resistente) e B-4362 (sensível) contrastantes quanto a susceptibilidade a estria mosqueada e plantas de sorgo das variedades BR 303 e BR 005 (plantas indicadoras), foram inoculadas via injeção no cartucho foliar com diferentes estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* com objetivo de avaliar a fitopatogenicidade dos isolados e a reação da planta a inoculação, bem como comparar o padrão de colonização da parte aérea nas diferentes interações bactéria e planta. Para tal, amostras do limbo foliar foram colhidas para contagem do número de bactérias e preparadas para microscopia ótica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). Em plantas de cana-de-açúcar, 7 e 20 dias após a inoculação, estirpes de *H. seropedicae* foram isoladas somente de pequenas lesões necróticas no ponto de inoculação, as quais foram características de uma reação hipersensível, não havendo desse modo, expressão de sintomas da doença para ambas as cultivares. Em contraste, *H. rubrisubalbicans* foi isolado de toda extensão do limbo foliar, entretanto apenas a var. B-4362 expressou sintomas típicos da doença. Estudos estruturais revelaram diferenças marcantes quanto ao modo de colonização das variedades de cana-de-açúcar por *H. rubrisubalbicans*. Na var. B-4362, o lúmen dos vasos do xilema foi completamente obstruído pela bactéria, associado a produção de um material de aparência mucilagínosa corado de verde-azulado com azul de toluidina. Em contraste, na var. SP 70-1143, os vasos não foram oclusos pelas bactérias e estas apresentavam-se aderidas a parede

secundária do vaso, formando pequenos agregados envolvidos por material fibrilar, e relativamente maior quantidade de material mucilaginoso. Em adição, na var. B-4362, as bactérias colonizaram amplamente os espaços intercelulares das células do mesófilo e as cavidades sub-estomáticas. Já em folhas da var. SP 70-1143, a cavidade sub-estomática e os espaços intercelulares foram colonizados de forma mais restrita pela bactéria, associada a uma forte expressão dos mecanismos de defesa da planta hospedeira que pareceu restringir o avanço da bactéria. Imunomarcacão com partículas de ouro utilizando anticorpos policlonais confirmaram a identidade das bactérias inoculadas, e indicaram também que na interaçã susceptível (B-4362) a bactéria produziu maior quantidade de exopolissacarídeos, quando comparada a interaçã resistente (SP 70-1143). Imunomarcacão do componente II da nitrogenase sugeriu a expressã da mesma pela bactéria em estágios iniciais de infecçã da var. B-4362, mas não em estágios avançados da doençã ou na interaçã com SP 70-1143. Em sorgo, 5 e 14 dias após a inoculaçã, *H. rubrisubalbicans* expressou sintomas típicos da doençã estria vermelha. Diferentemente de cana-de-açúcar, as bactérias encontravam-se restritas aos vasos do xilema, freqüentemente associadas a grande quantidade de muco e a presençã de colônias envolvidas por material de aparência fibrilar, provavelmente de origem da planta. Em adição, os vasos do protoxilema invariavelmente apresentavam-se mais densamente colonizados que os vasos do metaxilema. *H. seropedicae* não incitou sintomas em sorgo, sendo raramente encontrado colonizando os vasos do xilema e aparentemente não eliciando os mecanismos de defesa da planta.

ABSTRACT

Leaves of a mottled stripe disease-susceptible cultivar B-4362 and of a mottled stripe disease resistant cultivar SP 70-1143 of sugar cane were inoculated with the diazotrophic endophytes, *H. rubrisubalbicans* or *H. seropedicae*. At 7 and 20 d.a.i., *H. seropedicae* could be isolated only from a small necrotic area around the point of inoculation, where there was considerable degradation of host cells, and was not detected in any other part of the leaves. This suggested a hypersensitive response by the host to this bacterium, and no disease symptoms formed on either cultivar. By contrast, *H. rubrisubalbicans* could be reisolated throughout the infected leaves of both cultivars at both harvests and produced widespread disease symptoms on the leaves of cv. B-4362. Symptoms consisted of necrotic regions near the point of inoculation, and red stripes and red patches along the vertical axis of the leaves, where the bacteria had spread in the primary and secondary veins. The xylem-conducting elements in diseased regions of leaves were filled with bacteria and, at the edges of disease symptoms, the vessels were filled with a gum which stained blue-green with toluidine blue. This material probably contained phenolic compounds, and was produced as a host defence response. Leaves of cv. SP 70-1143 only developed small red stripes near the point of inoculation. These symptoms did not spread along the leaves, and the infected xylem vessels were never seen to be completely full of bacteria. Instead, the vessels contained encapsulated bacterial colonies attached to secondary wall deposition; these colonies were surrounded by blue-green material that might have been host-defence gums. In cv. B-4362, bacteria were abundant in the intercellular space of mesophyll adjacent to infected xylem, and also filled sub-stomatal cavities. Immunogold labelling using polyclonal antisera raised against *H.*

rubrisubalbicans gave a weak signal with the bacteria in cv. SP 70-1143, showing that few binding sites were available to the antibodies. By contrast, bacteria in cv. B-4362 reacted strongly with the antibody, suggesting that they had a denser coating of immunoreactive mucus. In the later stages of infection of cv. B-4362, lysed bacteria were seen within degraded plant cells surrounded by a matrix of plant gums and bacterial mucus. This matrix reacted strongly to the *H. rubrisubalbicans* antibodies. Immunogold labelling using antibodies against nitrogenase component II showed that nitrogenase was expressed by bacteria in the early stages of infection of cv. B-4362, but not in later stages, or by bacteria infecting cv. SP 70-1143. Leaves of *Sorghum bicolor* were examined at 5 d and 14 d after inoculation with *Herbaspirillum*. Plants inoculated with *H. rubrisubalbicans* expressed symptoms of red stripe disease. Infected leaves showed dense colonisation by *H. rubrisubalbicans* in regions showing red stripe symptoms at 5 d after inoculation. The infection was confined within the vascular system, in particular, the protoxylem and associated lacunae, which were often completely filled with the bacteria, with some the later expressing nitrogenase. The bacteria were recognised using specific antibodies and immunogold labelling, which also showed that the antibodies reacted with material on the surface of the bacteria, and that this mucus was released into the lumen of the xylem. At 14 d after inoculation, disease symptoms were slightly more severe, with both meta- and protoxylem being even more heavily colonised in parts of the leaf showing red stripes. However, a strong host defence response was also apparent at this stage, with gums lining the walls of the vessels and enclosing the bacteria, although the latter were still actively dividing. At the edges of visible disease symptoms, plant gums filled the xylem and bacteria had formed distinct colonies within these gums, with some of the colonies associated with the xylem walls. Plants inoculated with *H. seropedicae* either did not express the disease or showed very mild symptoms close to the inoculation point. In the later case, *H. seropedicae* was localised within protoxylem vessels and the metaxylem was partly occluded with plant-derived gums. In contrast to *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* was also localised in leaves at 14 d without disease symptoms and did not always appear to elicit a host response, i.e. they colonised the walls of metaxylem, with the xylem vessels themselves remaining unoccluded and largely free of gums.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Interações entre plantas e bactérias variam de relações puramente saprofíticas a interações mais sofisticadas como a simbiose envolvendo leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium* (VANCE, 1983; BREWIN, 1991) ou parasitismo especializado entre a bactéria fitopatogênica *Agrobacterium tumefaciens*, agente causal de galhas radiculares em dicotiledôneas e gimnospermas (BINNS & THOMASHOW, 1988). Por um longo período, pesquisadores da área de fitopatologia consideraram a existência de duas possibilidades de resposta da planta a invasão por bactérias, o estabelecimento da bactéria nos tecidos da planta e consequente expressão de doença ou contrariamente, seu reconhecimento pela planta hospedeira, expressão de mecanismos de defesa específicos ou de uma resposta hipersensível, com consequente falha no estabelecimento da bactéria nos tecidos da planta (OUCHI, 1983; GROSS & CODY, 1985; MCKHANN & HIRSCH, 1994; MELLOR & COLLINGE, 1995;). No entanto, a descrição de interações novas, tais como as associações envolvendo rizobactérias promotoras de crescimento (RBPC) ou bactérias fixadoras de N₂ e plantas superiores (VANCE, 1983; DJORDJEVIC et al., 1987; REIS, 1994; PEROTTO et al., 1994; MCKHANN & HIRSCH, 1994; MELLOR & COLLINGE, 1995; OLIVARES et al., 1996; BALDANI, 1996), leva-nos a considerar uma gama mais complexa de possibilidades de resposta da planta hospedeira a infecção e colonização bacteriana, que não sejam necessariamente maléficas ou eliminem a bactéria invasora. Neste contexto, a distinção entre parasitismo, comensalismo, mutualismo e simbiose tem sido cada vez menos

clara, visto que interações tidas como simbióticas podem produzir interações parasitárias e vice-versa. O tênue limiar do que caracteriza uma associação benéfica ou parasítica pode ser exemplificado através da alteração da composição de polissacarídeos da superfície de bactérias do gênero *Rhizobium* em simbiose com ervilha (*Pisum sativum*). Neste caso, bactéria alterada não fixa N_2 e induz uma resposta de defesa da planta hospedeira (PEROTTO et al., 1994). Já STAEHELIN et al. (1992) observaram uma grande acumulação de compostos químicos de defesa e enzimas tais como fitoalexinas e quitinases em nódulos de soja induzidos por estirpes de *Bradyrhizobium* não fixadoras. Em um caso mais drástico, AMARAL et al. (1995) demonstraram que a eliminação de um plasmídeo criptico em *Rhizobium tropici* estirpe CB899, alterou a performance simbiótica da bactéria, que incitou a produção de nódulos inativos quanto a fixação biológica de nitrogênio em plantas de feijão.

De outro lado, bactérias reconhecidamente patogênicas como *Agrobacterium rhizogenes*, tem sido utilizadas em inoculação simples ou conjunta com fungos micorrízicos arbusculares (FMA). A bactéria induz hiper-enraizamento na planta, aumentando as taxas de germinação, pegamento de mudas, absorção de nutrientes e crescimento da parte aérea e por produzir grande número de raízes finas aumenta os sítos de infecção micorrízica (STROBEL et al., 1988). Bactérias fitopatogênicas apresentando virulência baixa ou nula tem sido também utilizadas em programas de controle de fitomoléstias (ARAUJO et al., 1996; GIGLIOTI et al., 1996). Neste caso as bactérias exerceriam o controle da população de fitopatogenos pela ocupação de nichos específicos na planta hospedeira, produção de compostos antimicrobianos ou mesmo indução de genes de defesa, mecanismo conhecido como indução de resistência (OUCHI, 1983).

Diante dessa gama de interações, podemos pressupor que, para que se estabeleça uma interação compatível entre bactérias e plantas, resultando em simbiose ou em parasitismo especializado, ambos organismos devem coevoluir para sobrevivência mútua, através da compatibilização dos mecanismos de ataque da bactérias e os mecanismos de defesa da planta hospedeira. (FLOR, 1971; OUCHI, 1983). DJORDJEVIC et al., (1987) sugeriram que muitos patógenos

através do longo período de evolução, tornaram-se tão compatíveis a planta hospedeira que no decorrer deste período causaram cada vez menos danos a planta, podendo eventualmente promover algum benefício. não seria impossível pressupor que isto esteja ocorrendo com *Herbaspirillum* spp. Estas bactérias possuem uma interação do tipo endofítica com plantas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1992; OLIVARES et al., 1996), que pode resultar na expressão de doença nas folhas (PIMENTEL et al., 1991) ou benefícios a planta hospedeira através da transferência de nitrogênio fixado pela bactéria ou promoção do crescimento radicular (DÖBEREINER et al., 1995; BODDEY et al., 1995; OLIVARES, nesta tese).

1) MECANISMOS DE RESPOSTA DA PLANTA AO ATAQUE DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

Como em animais, plantas estão continuamente expostas ao ataque de patógenos. Porém, tendo em vista a inexistência de resposta imune mediada por anticorpos, estas desenvolveram durante o processo de evolução, mecanismos diferenciados de defesa. Em contraste com células animais, cada célula vegetal é capaz de defender-se através da combinação de mecanismos de defesa constitutivos e induzíveis (LAMB et al., 1989). Mesmo sendo continuamente expostas a um grande número de organismos potencialmente patogênicos, resistência a doença em plantas é regra e susceptibilidade é exceção. Esta situação é explicada pelo fato das plantas possuírem mecanismos versáteis de resistência ao ataque de patógenos e pela interação de mais de um mecanismo de resistência para que ocorra a inibição da invasão do patógeno. Por exemplo, a resposta hipersensível pode ocorrer concomitantemente com a síntese de fitoalexinas. Entretanto, ambas respostas de defesa são independentes. A resistência a fitopatogenos pode ser dividida em dois sistemas de defesa básicos, resistência geral ou básica e a resistência específica (GABRIEL & ROLFE, 1990) e se manifesta através de uma variedade de mecanismos que serão sumariamente discutidos a seguir.

1.1) RECONHECIMENTO DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

A habilidade para reconhecer é um atributo geral de todos organismos, sendo um mecanismo básico para que atividades fundamentais nos seres vivos se processem, tal como a fertilização, o desenvolvimento, a diferenciação celular e respostas imunológicas. Para fitopatologistas, SEQUEIRA (1978) definiu reconhecimento como um evento específico que causa uma resposta rápida no hospedeiro, facilitando ou impedindo a multiplicação do fitopatógeno. O reconhecimento de bactérias fitopatogênicas e seus produtos são eventos primários e essenciais para indução da expressão dos mecanismos de resistência ou suscetibilidade. Este é mediado por interações complementares entre biomacromoléculas presentes na superfície da bactéria e nas plantas, como por exemplo interações envolvendo lectinas da planta hospedeira (glicoproteínas) e resíduos de oligosacarídeos presentes na superfície de bactérias (SCHMIDT, 1979) ou mais recentemente troca de sinais moleculares (flavonóides, isoflavonóides e outros polifenóis) como eliciadores da síntese de fatores de nodulação (DALY, 1984, HUNGRIA, 1994). O reconhecimento de produtos do patógeno, tal como polissacarídeos de superfície ou liberados ou mesmo glicoproteínas, por receptores da célula vegetal elicia as etapas subsequentes da interação. O contato direto pode não ser essencial para o reconhecimento, mas muitas das respostas da célula hospedeira microscopicamente observáveis ocorrem após do contato com o patógeno.

1.2) RESPOSTA HIPERSENSÍVEL (RH)

A inoculação de plantas com uma bactéria fitopatogênica incompatível ou uma bactéria não patogênica pode induzir mudanças drásticas na atividade metabólica das células vegetais ao redor do sítio de invasão do patógeno e levar a indução de resistência. Este mecanismo é conhecido como resposta hipersensível (RH), sendo um dos mecanismos de resistência mais efetivos e importantes da natureza. Este é caracterizado pela restrição e limitação do crescimento da bactéria no sítio de infecção, associada a mudanças na célula hospedeira que incluem alterações na permeabilidade da plasmalema, rápido movimento e

agregação citoplasmática, elevação das taxas de respiração, liberação de eletrólitos e materiais eletrôn-densos e síntese de fitoalexinas, que resultam na formação rápida (menos de 24 horas após a inoculação) de halos necróticos ao redor do sítio de invasão e o consequente confinamento do fitopatógeno (KLEMENT, 1982; TOMIYAMA, 1983). Tem sido amplamente aceito que a expressão de RH resulta da interação entre um eliciador específico produzido pela bactéria ao nível de parede celular e um receptor específico presente na parede da célula da planta hospedeira. Entretanto, o eliciador da resposta hipersensível não seria expresso constitutivamente, sendo necessário o íntimo contato entre a célula bacteriana e a parede celular do hospedeiro. Evidências nesse sentido foram obtidas por SEQUEIRA et al. (1977) trabalhando com estirpes virulentas e não virulentas de *Pseudomonas solanacearum* em plantas de fumo inoculadas via infiltração de células do mesófilo com uma suspensão bacteriana. A análise de detalhes ultraestruturais do relacionamento entre as bactérias e a parede celular da célula hospedeira revelaram que estirpes avirulentas e incompatíveis eram prontamente aderidas a parede celular das células do mesófilo de fumo, sendo envolvidas por um material fibrilar e granular liberados pela parede da célula hospedeira. No sítio de adesão, processava-se então a resposta hipersensível. Em contraste, estirpes virulentas não se aderiam a parede celular, permanecendo livre e multiplicando-se nos espaços intercelulares.

1.3) BARREIRAS BIOQUÍMICAS COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA A FITOPATÓGENOS

As barreiras bioquímicas das plantas a invasão por fitopatógenos podem ser divididas em constitutivas (compostos pré-formados), ou induzíveis, as quais são sintetizadas a partir da presença do patógeno ou de seus produtos, sendo induzidas por eliciadores ou inibidores alocados na superfície do microrganismo em interação com receptores presentes na planta por meio de fenômenos de reconhecimento. Numerosas moléculas presentes na parede celular podem mediar a indução dos mecanismos bioquímicos de resistência a doenças. Dentre os quais destacam-se eliciadores da síntese fitoalexinas, presença de lectinas

como sítios de reconhecimento e aglutinação e eliciadores da acumulação de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, ácido salicílico, bem como estresse oxidativo e a síntese de inibidores de proteinases.

1.3.1) Compostos pré-formados: durante o crescimento e desenvolvimento da planta, uma série de compostos com ação anti-microbiana são naturalmente sintetizados e acumulados em compartimentos específicos ou na parede celular vegetal, entre os quais ha uma série de compostos fenólicos e enzimas.

1.3.2) Fitoalexinas: fitoalexinas são sintetizadas pelas plantas em resposta a infecção por fungos e bactérias, sendo fator importante na resistência a doenças de plantas. Caracteriza-se como uma molécula de composição química heterogênea, baixo peso molecular e com propriedades antimicrobianas (LYON & WOOD, 1975). Sua síntese pode ser induzida não só por compostos presentes na parede de alguns microrganismos, mas também por compostos presentes na própria parede celular dos vegetais, como P-glucanos presentes na parede celular de fungos (ANDERSON & JASALAVICH, 1978) glicoproteínas (KEEN & LEGRAND, 1980) e ácidos graxos componentes da parede celular (BOSTECK et al., 1982). Pectinases de origem microbiana funcionam também como eliciadores indiretos da síntese de fitoalexinas, e sua ação se dá por atuação na liberação de fragmentos de pectina da parede vegetal. Tais fragmentos são conceituados de eliciadores endogenos, por não serem ativos constitutivamente, sendo necessária sua liberação da estrutura da parede e posterior ligação covalente com a parede celular para ser efetivamente um eliciador (DAVIS et al., 1984; LEE & WEST, 1981). Desse modo, a planta tem a capacidade de reconhecer moléculas sinais presentes na superfície do microrganismo e em sua própria parede, as quais podem eliciar a síntese de fitoalexinas. Muitos fitopatógenos secretam enzimas que degradam pectina. Isto não é surpreendente, visto que a parede celular é uma barreira que deve ser quebrada por muitos patógenos. Em vários casos estudados, endo-pectinanases são as primeiras enzimas de degradação a serem secretadas pelos patógenos (JONES et al., 1972). Parece provável que algumas dessas enzimas funcionem como eliciadores ao mesmo tempo que elas degradem a parede celular de seu hospedeiro. As evidências acumuladas sugerem que este

mecanismo de defesa da planta é largamente difundido e fisiologicamente muito importante.

1.3.3) Lectinas: lectinas podem também ser importante na resistência de plantas a doenças. Estas são proteínas não catalíticas que interagem com resíduos de carboidratos específicos. Lectinas funcionam como efetores nas respostas de defesa do hospedeiro, aglutinando o patógeno e impedindo sua multiplicação. O papel de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina na aglutinação de bactérias incompatíveis, como um pré-requisito para iniciação da resposta hipersensível, foi demonstrada pelo trabalho de SEQUEIRA & GRAHAM (1976).

1.3.4) Acumulação de ácido salicílico: além da clássica resposta hipersensível, plantas possuem mecanismos de defesa induzíveis conhecidos genericamente por resistência sistêmica adquirida (RSA). A resistência a doença induzida é um fenômeno no qual a planta exibe um incremento nos níveis de resistência a infecção com fitopatógenos depois de estímulos específicos. DELANEY et al. (1994) demonstraram que a acumulação de ácido salicílico é essencial para expressão dos mecanismos de resistência responsáveis pelo estabelecimento da RSA. Estes autores trabalharam com plantas transgênicas de fumo e arábida, as quais expressavam a enzima bacteriana salicilato hidroxilase, e desta forma não poderiam acumular o ácido salicílico. Como resultado, as plantas não só não induziram RSA, sendo então mais susceptíveis a fitopatógenos compatíveis como *Pseudomonas syringae*, *Phytophthora* e *Cercospora*, como também a fitopatógenos incompatíveis. Dessa forma a expressão dos genes que impediram a acumulação de ácido salicílico na planta produziram um fenótipo altamente susceptível a doenças e a supressão da resistência genética. O tratamento destas plantas transgênicas com um análogo químico do ácido salicílico, o ácido isonicotínico (INA) antes da inoculação com o patógeno restituiu a capacidade de indução da resistência adquirida. Os autores demonstraram ainda que o estado de resistência é dependente da síntese endógena de ácido salicílico, sendo esta acumulação crítica para a indução do conjunto de genes ligados a resistência sistêmica adquirida. Estes genes incluem genes que codificam a síntese de “pathogenesis-

related (PR) proteins” (VAN LOON, 1985) muitos dos quais possuem ação antimicrobiana e serão abordados a seguir.

1.3.5) Síntese de proteínas PR (“pathogenesis-related proteins”): a infecção de plantas com microrganismos fitopatogênicos é frequentemente acompanhada pelo incremento da síntese de um grande número de proteínas. Estas proteínas induzíveis pertencem a um grupo conhecido como “pathogenesis-related (PR) proteins” e estão envolvidas em fenômenos de resistência adquirida (LINTHORST, 1991). A correlação entre os fenômenos de resistência adquirida e a síntese de proteínas PR sugere o envolvimento das últimas no controle da multiplicação de fitopatógenos no tecido da planta hospedeira. Apesar dos estudos pioneiros nesta área basearem-se principalmente em plantas de tabaco, é reconhecida a expressão destas PR proteínas em muitas outras plantas. Estas proteínas são divididas em dois grandes grupos, proteínas PR ácidas, que são solúveis e estáveis em pH 3, bem como resistentes a enzimas proteolíticas, predominando no fluído dos espaços intercelulares das células do mesófilo foliar (HOGUE & ASSELIN, 1987). Tais características são importantes na funcionalidade destas proteínas, já que estando presente no fluído intercelular, estão sujeitas a condições de baixo PH e ação de enzimas proteolíticas como resultado, durante a patogênese, do colapso de células hospedeiras e extravasamento do conteúdo dos vacúolos. O outro grupo de proteínas PR é igualmente resistente a ação de proteases. Várias destas proteínas já são conhecidas, dentre as quais estão quitinases e β -1,3-glucanases. A acumulação e atividade destas enzimas concomitante a invasão do patógeno e a aquisição de resistência ao ataque subsequente de fitopatógenos tem levado muitos pesquisadores a relevar o papel das proteínas PR no fenômeno de resistência adquirida. Esta assunção tem sido subsidiada pela ação hidrolítica de muitas destas enzimas a polissacarídeos presentes na parede celular de muitos fitopatógenos (LEGRAND et al., 1987; KAUFFMANN et al., 1987).

Uma outra classe de proteínas induzidas por fitopatógenos é a das glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, conhecidas como extensina (proteína estrutural). Sua acumulação se dá ao nível de parede celular na região

diretamente afetada pelo patógeno (ESQUERRE-TUGAYE & LAMPORT, 1979). Aumentos no conteúdo de extensina tem sido correlacionados com aumento dos níveis de resistência. Desse modo plantas susceptíveis ao patógeno não respondem com o incremento no conteúdo de extensina em sua parede. Estas proteínas são secretadas por tecidos da planta feridos e são encontradas na superfície das células do parênquima, vasos do xilema, células da epiderme e do colênquima (STUART & VARNER, 1980; LEACH et al., 1982). De acordo com CASSAB & VARNER (1988) um papel fisiológico para as extensinas seria na proteção da planta contra o ataque de patógenos e dessecação de superfícies feridas. A extensina se constitui em uma barreira estrutural que provê uma matriz para deposição de lignina junto ao sitio de invasão, inibindo a passagem do patógeno. Aumentos no conteúdo de lignina da parede celular também foram observados por HAMMERESCHMIDT et al. (1984). Além disso tais proteínas funcionam como agentes capazes de aglutinar bactérias (ANDERSON & JASALAVISH, 1978) estando envolvidas por exemplo na ligação de estirpes incompatíveis com a superfície da planta hospedeira.

Uma série de outras glicoenzimas tem sido detectadas ao nível de parede celular vegetal, como por exemplo diversas formas isoenzimáticas das peroxidases. Outras enzimas, as hidrolases, também com papel na defesa, podem estar localizadas ao nível de parede ou no espaço entre a plasmalema e a parede. A localização destas enzimas parece ser apropriada para a função de defesa, visto que patógenos necessitam atacar as células por fora e freqüentemente tem que penetrar a parede do hospedeiro para iniciar a infecção. Algumas hidrolases são secretadas no apoplasto. Estas tem sido encontradas nos compartimentos da parede celular, dentre as quais citamos: β -1, b-glucanase, celulases, arabinosidase, b-frutofuranosidases, β -galactosidases, a-galactosidases, fosfatases ácidas entre outras. Estas enzimas hidrolíticas são geralmente expressas localizadamente, circundando o sítio de infecção (FRY, 1995). Muitas destas enzimas da parede celular estão envolvidas também na eliciação de moléculas. Em tomate (*Lycopersicum esculentus*), oligogalacturonidas produzidas

na parede celular da planta em regiões feridas, induzem a síntese de inibidores de proteinases (RYAN, 1987).

Proteínas PR da classe das tioninas são restritas a família das gramíneas. Estas são usualmente constituídos por polipeptídeos pequenos e ricos em cisteína, sendo abundantes em sementes e folhas de uma série de cereais (LINTHORST, 1991). Recentemente foi relatado que tioninas são acumuladas em folhas em resposta a infecção com fungos fitopatogênicos e possuem ação citotóxica contra uma série de microrganismos fitopatogênicos, incluindo bactérias e fungos (ELKINS, 1982).

1.3.6) Produção de radicais livres (estresse oxidativo): durante o metabolismo normal da célula vegetal o oxigênio é incorporado em moléculas orgânicas e vários compostos citotóxicos como peróxido de hidrogênio, superóxido e radicais de oxigênio e hidroxílicos são gerados. Destes, os radicais livres são os mais tóxicos atuando principalmente sobre a membrana plasmática, mas também sobre enzimas, ácidos nucléicos e pigmentos. Em plantas, existe naturalmente uma série de sistemas para prevenção contra os efeitos negativos do acúmulo destes radicais. A membrana das bactérias é igualmente sensível a radicais livres, e desse modo o estresse oxidativo é considerado como parte das estratégias de defesa das plantas na limitação da colonização pelo patógeno invasor (ELSTNER, 1982). Os tecidos da planta respondem a invasão por bactérias fitopatogênicas através da elevação da produção de H_2O_2 e radicais superóxido e hidroxílicos que podem inibir o desenvolvimento da doença. A capacidade de bactérias fitopatogênicas se multiplicarem nos tecidos da planta pode ser, em parte devido a capacidade de destoxificar o meio ao redor do sítio de infecção da presença de H_2O_2 , o qual dentre os compostos de oxigênio, é o que penetra mais facilmente através da membrana, afetando uma série de processos celulares. O provável candidato para modulação da ação de H_2O_2 é a enzima catalase, que converte H_2O_2 em H_2O e O_2 . KLOTZ & HUTCHESON (1992) trabalhando com estirpes do fitopatógeno *Pseudomonas syringae* verificaram que estas bactérias eram capazes de resistir a concentrações mais elevadas de H_2O_2 quando comparadas a bactérias não-patogênicas, com taxas de atividade de catalase a

níveis variando de 10 a 100 vezes. Estes mesmos autores verificaram ainda a presença de múltiplas atividades da catalase no espaço periplasmático e no fluído citoplasmático da bactéria e sugeriram que esta alta atividade da catalase, associada a indução de múltiplas formas isoenzimáticas da catalase e em diferentes locais da célula são decisivos para o combate ao estresse oxidativo, sendo um fator de virulência determinante no sucesso da colonização destas bactérias.

1.4) BARREIRAS FÍSICAS COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA A FITOPATÓGENOS

Além do aparato bioquímico de resistência a invasão mediada por receptores na superfície da parede, plantas podem reagir a invasão microbiana sintetizando substâncias que reforcem a parede celular, dificultando ou mesmo impedindo o avanço de microrganismo por um efeito puramente físico. Além da restrição da infecção de sítios específicos da planta. Estas barreiras físicas ou respostas morfológicas da planta, podem ser agrupadas em barreiras intrínsecas (a qual é naturalmente produzida pela planta) ou pode ser induzida pela presença do patógeno ou de seus produtos. Tendo em vista sua estrutura rígida e complexa, a presença de parede celular “per si” e a deposição de cutícula, suberina e lignina na parede celular constituem barreira efetiva a muitos patógenos potenciais. No entanto uma série de compostos podem ser sintetizados em virtude da presença do patógeno nos tecidos da planta.

1.4.1) Síntese de géis e gomas em resposta a infecção vascular: plantas restringem o avanço da colonização dos vasos do xilema por patógenos através da deposição de géis e gomas ou materiais fibrilares no lúmen dos vasos. Géis e gomas são produzidos nas placas perfuradas, nas terminações das paredes celulares e nas pontuações de membrana dos vasos por um processo de distensão dos constituintes da parede primária e lamela média, sendo considerado um fenômeno geral de resposta a infecção vascular (VANDERMOLLEN et al., 1977, KAO & DAMANN, Jr. 1980). Em adição, materiais

fibrilares sintetizados pela planta hospedeira ou produzidos como produtos de degradação da parede celular, possuem um papel na resistência a doenças, como mecanismo de prevenção e retardamento do espalhamento e multiplicação do patógeno. Em experimentos conduzidos por BRETSCHEIDER et al. (1989), trabalhando com duas variedades de couve (*Brassica oleraceae*) com níveis de resistência diferentes a podridão negra causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, grande quantidade de material fibrilar foi encontrado associado aos sítios de colonização da bactéria. Diversos autores relatam a presença de taninos, fenois, glicoproteínas, lectinas, calose e outros agentes de defesa antimicrobianos (OUCHI, 1983; BESTWICK et al., 1995).

1.4.2) Deposição de parede celular (cordões de infecção): um exemplo de infecção localizada se dá pela síntese de uma estrutura que advém da simbiose de *Rhizobium*-leguminosas. Neste caso, o endossimbionte ao acessar o interior do pêlo radicular é circundado por uma estrutura tubular formada pelo depósito de constituintes da parede celular. Esta estrutura é conhecida como cordão de infecção, que conduz as bactérias através das células do córtex, liberando-as no interior de células recém divididas. Tais estruturas são restritas a interações simbióticas envolvendo leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium*, entretanto estruturas similares a cordões de infecção tem sido relatadas em interações envolvendo gramíneas (JAMES et al., 1994; REINHOLD-HUREK & HUREK, 1993).

1.4.3) Papilas. lignificação e calose: uma série de compostos que restringem a invasão tem sido descritos, tais como a secreção de compostos similares a lignina (VANCE et al., 1980), silicone (HEATH, 1981) celulose (FRITZ, 1937) bem como formação de camadas de calose na parede celular como mecanismo de restrição a infecção (ALLISON & SHALLA, 1974). A deposição de calose (1,3- β -glucano) ocorre na parede oposta ao sítio de infecção e é acompanhada por posterior lignificação. Esta tem sido considerada como um mecanismo geral de defesa da planta, no entanto tal fenômeno pode, de fato, ser determinante na direção da resistência ou susceptibilidade na interação patógeno-planta hospedeira, já que existem diferenças quantitativas na resposta (BECKMAN et al., 1982; BECKMAN et al., 1989). Outra resposta morfológica muito freqüente também é a formação de

papila, caracterizada como um espessamento hemisférico da superfície interna da parede celular no sítio de penetração da hifa fúngica. A presença de papila é freqüentemente associada a falha na colonização do fungo na planta hospedeira (AIST, 1977).

1.4.4) Características anatômicas do vegetal: diferenças anatômicas entre genótipos da planta podem ser determinantes no sentido da resistência ou susceptibilidade. HARRISON & DAVIS (1988) trabalhando com plantas de cana-de-açúcar com diferentes graus de susceptibilidade ao raquitismo das soqueiras verificaram que genótipos susceptíveis apresentavam uma pequena ramificação dos vasos do xilema que atravessam a região dos nos e intercomunicam entre-nos vizinhos, ao passo que variedades resistentes apresentavam um grau maior de ramificação dos tecidos condutores. Desse modo, prejuízos no fluxo da seiva seriam mais drásticos nos genótipos de cana-de-açúcar que apresentam menor ramificação dos vasos. A morfologia e a estrutura dos estômatos tem um papel importante na resistência a doenças impondo limitações a penetração de patógenos. McLEAN (1921) trabalhando com duas espécies de citrus e o agente causal do cancro cítrico, *Xanthomonas campestris* pv. citri, conclui que a base da resistência ao patógeno estava na abertura máxima do poro estomático, que na variedade resistente não passava de 1,5 µm, enquanto que na susceptível poderia atingir 11 µm. Não só diferenças no diâmetro dos poros estomáticos poderiam constituir-se como um fator de resistência natural, mas também a densidade de estômatos por unidade de área como demonstrado por DAUB & HAGEDORN (1979).

2) ESTRATÉGIAS DE ATAQUE DESENVOLVIDAS POR FITOPATÓGENOS

Patógenos, por outro lado, tem desenvolvido uma variedade de mecanismos para sobrepor as barreiras físicas e químicas das plantas, estabelecendo-se e provendo sua sobrevivência. Bactérias produzem vários compostos para infectar a planta hospedeira e causar sintomas. Toxinas, EPS, enzimas de degradação de parede e certos hormônios são alguns produtos de fitobactérias responsáveis pelo estabelecimento da bactéria na planta.

2.1) Síntese de exopolissacarídeos (EPS): muitos papéis para produção de EPS em bactérias fitopatogênicas tem sido relatados, como aumento da sobrevivência fora e no interior dos tecidos do hospedeiro, quelante de metais, matriz para retenção de nutrientes e água. Entretanto, o papel do EPS no bloqueio do reconhecimento de sítios de ligação da bactéria a sítios receptores específicos na parede do hospedeiro e o consequente impedimento da iniciação dos mecanismos de resistência da planta parece o papel mais significativo (SEQUEIRA & GRAHAM, 1976, EL-BANOBY & RUDOLPH, 1979). SEQUEIRA et al. (1977) trabalhando com estirpes virulentas e não virulentas de *Pseudomonas solanacearum* em plantas de fumo inoculadas via infiltração no mesófilo verificaram que estirpes avirulentas e estirpes incompatíveis eram aglutinadas pela parede das células do mesófilo de fumo, sendo envolvidas por um material fibrilar e granular liberado pela parede da célula hospedeira. Em contraste, estirpes virulentas não foram aderidas, podendo multiplicar-se livremente nos espaços intercelulares. A aparente falta de adesão da forma compatível a parede celular do hospedeiro, seguida de sua livre multiplicação nos meatos foi amplamente correlacionada com a maior capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares (EPS). Ficou claro que EPS presentes na parede celular bacteriana, preveniram a interação entre estes compostos eliciadores, não ocorrendo adesão nem expressão dos mecanismos iniciais de defesa da planta, o que permitiu a multiplicação da bactéria compatível no interior da planta. Mais evidências foram obtidas por SEQUEIRA & GRAHAM (1976) investigando a aglutinação de estirpes virulentas a não virulentas de *P. solanacearum* por lectinas de batata. Neste trabalho 34 estirpes avirulentas foram aglutinadas e 55 estirpes virulentas foram fracamente ou não aglutinadas. A incapacidade de aglutinação de estirpes virulentas foi atribuída a presença de EPS, que quando removido por lavagem, resultou em aglutinação. Em adição técnicas de imunofluorescência revelaram a presença de lectinas na parede celular de células do mesófilo de batata e fumo (LEACH et al., 1982). A análise dos resultados sugeriu o papel de glicoproteínas no processo de doença. Em alguns casos, EPS produzidos pela bactérias participam

na indução de sintomas, como no caso da murcha bacteriana por *Pseudomonas solanacearum*, no qual os EPS, devido sua viscosidade elevada, inibem o movimento de água no interior dos vasos do xilema.

2.2) Síntese de toxinas: as toxinas excretadas por bactérias durante a patogênese tem papel fundamental no estabelecimento da infecção e desenvolvimento de sintomas, pois comprometem varias vias metabólicas da planta hospedeira, facilitando a multiplicação nos tecidos ou danificam alvos específicos na planta, suprimindo a expressão das reações de defesa iniciais e incitando sintomas específicos (DURBIN, 1982). São ativas em concentrações muito pequenas, possuindo baixo peso molecular, geralmente atuam como inibidoras de enzimas vegetais. De acordo com GROSS & CODY (1985) a grande maioria das toxinas relatadas na literatura estão restritas aos diversos patovares de *Pseudomonas syringae* (Ps), um fitopatógeno causador de necrose foliar, principalmente em plantas de regiões temperadas. GROSS & CODY (1985) e MITCHELL (1981) descreveram o mecanismo de ação de uma série de toxinas, entretanto a estrutura química de muitas destas toxinas não é bem conhecida. A título de exemplo citamos, *Siringomicina* (agente biocida de amplo espectro, induz clorose, necrose e anasarca), Coronatina (produzida por patovares de Ps que afetam gramíneas), Phaseolotoxina (produzida por *P.s. phaseolicola*, sendo caracterizado como um tripeptídeo sistêmico que bloqueia a síntese de arginina, induz extensos halos cloróticos e necróticos), Tabtoxina (dipeptídeo produzido por *P.s. tabaci* inibe a ação da glutamina sintetase).

2.3) Enzimas de degradação da parede celular: muitos fitopatógenos são capazes de produzir enzimas que degradam polissacariídeos, Desse modo, podem alterar ou degradar carboidratos poliméricos encontrados na parede celular das plantas superiores. Tais enzimas facilitam a penetração da parede celular, maceração de tecidos e desmembramento de componentes da parede, representando parte dos mecanismos de ataque de fungos e bactérias fitopatogênicas (BATEMAN, 1976). Dentre as enzimas que degradam substâncias pécticas temos enzimas que quebram ligações α -1,4 entre resíduos de uronida em pectinas e ácidos pécticos, incluindo hidrolases e liases, como exemplo

poligalacturonases (PGA's) e pectatos liases que quebram ligações α -1,4 galacturonida, pectina metil esterases que hidrolizam terminações metil esterres do ácido urônico. Dentro das enzimas hemicelulases temos endo- β -1,4-xilanases e xilobiases, que degradam a cadeia de xiloglucano. A degradação de celulose a glucose envolve um complexo de enzimas, originalmente designadas C₁, C_x (endo- β -1,4-glucanase) e celulases. Não existe dúvida sobre a capacidade de alguns patógenos em excretar enzimas que degradam a parede celular em tecidos infectados, ou a capacidade de alteração e disrupção da parede celular por tais enzimas durante a patogênese. No entanto existe uma necessidade de apurar o envolvimento destas enzimas nos estágios iniciais de infecção pelo patógeno. COOPER (1983) afirma que a dissolução da parede celular no sítio de infecção tem como principal objetivo colocar a superfície do patógeno em íntimo contato com a plasmalema do hospedeiro, permitindo o reconhecimento e eliciando uma resposta específica. Em muitos casos, a perda de capacidade da hidrólise de componentes da parede celular implica em perda de virulência, como citado por BOCCARA et al. (1988) em *Erwinia chrysanthemi*.

2.4) Produção de hormônios vegetais: alguns fitopatógenos produzem hormônios vegetais “in vitro”. Porém em associação com a planta tem-se observado que a estimulação do aumento da síntese de hormônios pela planta hospedeira induzido pelo patógeno parece mais importante. Por exemplo, *Pseudomonas solanacearum* produz AIA e etileno “in vitro”, mas induz mudanças na planta hospedeira no sentido da acumulação de triptofano e consequente aumento de AIA e etileno. Qualquer que seja a origem destes fatores de crescimento, muitos dos sintomas externos e internos de murcha são atribuídos aos níveis anormais destes hormônios (BUDDENHAGEN & KELMAN, 1964). No caso do parasitismo refinado envolvendo *Agrobacterium tumefaciens* e plantas dicotiledóneas, a bactéria produz níveis baixos de reguladores de crescimento “in vitro”, porém através da inserção do plasmídeo Ti em células da planta e consequente transformação de seu genoma, grandes quantidades de hormônio

são produzidas, ocorrendo proliferação não controlada de células vegetais e formação de galhas radiculares.

3) ESTRIA MOSQUEADA DA CANA-DE-AÇÚCAR

3.1) HISTÓRICO

A enfermidade Estria Mosqueada da cana-de-açúcar foi reconhecida na Louisiana (EUA) em 1927 e seu agente causal descrito por CHRISTOPHER & EDGERTON, (1932). Posteriormente teve sua ocorrência registrada em mais de 24 países, incluindo vários países no continente africano e nas Américas (TOKESHI, 1980; PALLERONI, 1984). Foi relatada também ser fitopatogênica a sorgo (*Sorghum bicolor*) sob condições naturais na Nova Zelândia e após inoculação artificial (HALE & WILKIE, 1972a,b). No Brasil esta moléstia foi constatada primeiramente em Pernambuco, sendo posteriormente relatada nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará através de levantamentos conduzidos pelo PLANALSUCAR nos anos de 1975 a 1978 (LIU et al., 1979). Recentemente MARIANO & WANG (1992) isolaram a bactéria causadora da estria mosqueada da variedade B-4362 em Palmares (PE). Seus danos são de pouca importância econômica por se restringir a variedade B-4362.

3.2) SINTOMATOLOGIA

A estria mosqueada é uma doença restrita ao limbo foliar e em condições naturais nunca foi encontrada atacando outras partes da planta. Os sintomas se manifestam na cana-de-açúcar sob a forma de estrias vermelhas estreitas (1 a 3 mm de largura e comprimento variável podendo atingir toda extensão do limbo) acompanhando as nervuras secundárias. As estrias vem acompanhadas de um fundo mosqueado de verde e amarelo. Com a evolução dos sintomas as estrias se coalescem e se desenvolve extensa clorose seguida de necrose e secamento precoce da lâmina foliar. Mesmo em condições de inoculação artificial não causa morte do meristema apical do colmo. A doença não tem sido observada em outras plantas hospedeiras, mas após inoculação artificial foi patogênica ao sorgo (*Sorghum bicolor*) e capim massambará (*Sorghum*

halapense) (TOKESHI, 1980). A transmissão do patógeno se dá por respingos de chuva e mudas contaminadas

3.3) CLASSIFICAÇÃO E OCORRÊNCIA DO AGENTE CAUSAL DA ESTRIA MOSQUEADA DA CANA-DE-AÇÚCAR

O agente causal da Estria Mosqueada já recebeu várias denominações. Inicialmente CHRISTOPHER & EDGERTON (1932) classificaram este organismo como sendo *Phytomonas rubrisubalbicans*. Em 1935, BURGUITS reclassificou-o como *Bacterium rubrisubalbicans* e SAVULESAI (1947) incluiu no gênero *Xanthomonas*. KRASILNIKOV (1949) após estudos morfológicos e culturais, achou mais correto incluí-lo no gênero *Pseudomonas* e sugeriu a denominação *P. rubrisubalbicans*. Recentemente BALDANI et al. (1996) incluíram a bactéria no gênero *Herbaspirillum* sendo denominada *H. rubrisubalbicans* sinonímia *Pseudomonas rubrisubalbicans* (CHRISTOPHER & EDGERTON, 1932 & BALDANI et al., 1996). Apesar da escassez de relatos envolvendo a enfermidade no Brasil, alguns autores tem relatado a presença de *H. rubrisubalbicans* em plantas ditas assintomáticas. SUDO (1980) trabalhando com bactérias associadas ao raquitismo das soqueiras da cana-de-açúcar isolou estirpes de *H. rubrisubalbicans* de colmos das variedades IAC 52-326, Q 28 e CP 44-101. OLIVARES et al. (1993) isolaram *H. rubrisubalbicans* de raízes, colmos e folhas de plantas de cana-de-açúcar aparentemente sadias em levantamentos conduzidos em MG, SP e RJ. Além do mais, PIMENTEL et al. (1991) conduzindo ensaios de fitopatogenicidade concluíram que as principais variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil naquela época (SP 70-1143, CB 54-3, NA 5679) eram resistentes a enfermidade mesma em ensaios de inoculação artificial sob condições de casa de vegetação. A ocorrência da bactéria no interior da planta associada a escassez de relatos da doença sugerem que o estabelecimento de uma interação endofítica entre *H. rubrisubalbicans* e plantas de cana-de-açúcar, na qual a bactérias vive, pelo menos parte de seu ciclo, no interior dos tecidos da planta sem incitar sintomas de doença, podendo promover um benefício a planta hospedeira.

OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial fitopatogênico e o padrão de colonização da parte aérea de plantas de cana-de-açúcar e sorgo após a inoculação com diferentes isolados de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, utilizando variedades contrastantes quanto a sensibilidade a doença estria mosqueada.

MATERIAL E MÉTODOS

BACTÉRIAS:

As estirpes de *Herbaspirillum* spp. utilizadas no experimento de fitopatogenicidade (Tabela 1) foram previamente crescidas por 24 horas em meio líquido sintético caldo nutriente (extrato de carne 3 g.l⁻¹ peptona 5 g.l⁻¹) suplementado com glicerol (10 g.l⁻¹). Posteriormente, tomou-se uma alíquota de 0,1 ml e inoculou-se em meio JNFb Líquido (BALDANI et al., 1992) isento de ácido málico, porém suplementado com glicerol e manitol (5 g.l⁻¹) como fontes de carbono e extrato de levedura (0,1 mg.l⁻¹) e NH₄Cl como fontes de nitrogênio. As bactérias foram cultivadas por 24 horas, sob agitação contínua (140 rpm) a uma temperatura de 30 °C. O inóculo foi preparado a partir desse crescimento, de onde tomou-se uma alíquota de 4ml, centrifugou-se por 3 minutos a 2000 g e ressuspendeu-se em aproximadamente 2ml de solução salina contendo 1/4 dos sais do meio JNFb, ajustando-se para uma concentração final de 10⁸ células.ml⁻¹, que corresponde a 90% de transmitância lida em um colorímetro AusJena (λ = 600nm).

PLANTAS E MONTAGEM DO EXPERIMENTO:

Foram utilizadas sementes de sorgo (*Sorghum bicolor*) variedades BR303 e BR005 oriundas do CNPMS-EMBRAPA e toletes de uma gema das variedades de cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum*) B-4362 (sensível a estria mosqueada, oriunda de Barbados) e SP 70-1143 (resistente a estria mosqueada, oriunda da Copersucar, São Paulo, Brasil). O ensaio foi

Tabela 1 - Designação e origem das estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* utilizadas no ensaio de fitopatogenicidade.

ESTIRPES	DESIGNAÇÃO	ORIGEM
	LMG	
<i>H. seropedicae</i>		
Z67(ATCC 35892)	6514	Raízes esterilizadas de arroz-Brasil
Z78 (ATCC 35893)	6513	Raízes esterilizadas de sorgo-Brasil
HRC54	-	Raízes lavadas de cana-Brasil
HCC102	-	Colmos de cana-de-açúcar-Brasil
<i>H. rubrisubalbicans</i>		
M4	2286	Folhas de cana-de-açúcar-EUA
M1	1278	Folhas de cana-de-açúcar-Mauricius
M5	6415	Folhas de cana-de-açúcar-Reunion
M6	6420	Folhas de cana-de-açúcar-Jamaica
IBSBF 175	10462	Folhas de cana-de-açúcar-Mauricius
HCC1 03		Colmos de cana-de-açúcar-Brasil

conduzido em condições de casa de vegetação com 4 repetições por tratamento para plantas de sorgo, e 3 repetições por tratamento para plantas de cana-de-açúcar, utilizando potes plásticos preenchidos com 3 kg de solo oriundo do horizonte superficial de um solo classificado como PVd série Itaguaí, fertilizado com o correspondente a 20 kg.ha⁻¹ de N na forma de sulfato de amônio, 200 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ como superfosfato simples e 100 kg.ha⁻¹ de K₂O como sulfato de potássio. Plantou-se 8 sementes ou 2 toletes por pote, deixando após a germinação duas plantas por pote.

INOCULAÇÃO, AVALIAÇÃO DOS SINTOMAS E REISOLAMENTO:

Plantas de sorgo com 14 dias após a germinação e plantas de cana-de-açúcar com 35 dias após a germinação tiveram suas folhas podadas (toalete) e em seguida inoculadas por meio de injeção no cartucho foliar. Para tal foi utilizada uma seringa hipodérmica estéril e aplicou-se 0,5 ml de uma suspensão bacteriana (10⁸ células.ml⁻¹) por planta seguindo a metodologia proposta por EIRA (1972). As plantas foram mantidas sob condições de câmara úmida por 24 horas. A avaliação dos sintomas foi visual, atribuindo-se o sinal negativo “-” para ausência de sintomas e o sinal positivo “+” para a presença de estrias vermelhas no limbo foliar, associada a descrição sumarizada da evolução dos sintomas. As avaliações realizaram-se aos 7 e 20 dias após a inoculação para cana-de-açúcar e capim elefante e aos 7 e 14 dias após a inoculação para sorgo, sendo acompanhada pelo reisolamento das bactérias em meio JNFb semi-sólido sem nitrogênio como descrito por BALDANI et al. (1992), utilizando fragmentos do limbo foliar (0,2 x 0,5cm) inoculados em meio JNFb semi-sólido, com 3 repetições por tratamento, superficialmente desinfetadas com álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio solução 30% v/v por 30 segundos e lavado em água estéril por três vezes dentro de um período de 5 minutos. *Herbaspirillum* foi reconhecido pela formação de película em meio JNFb semi-sólido, morfologia celular e movimento ao microscópio de contraste de fase, bem como formação de colônias típicas do gênero em meio JNFb sólido contendo o triplo da concentração de azul de bromotimol (BALDANI et al., 1992). O controle constou de plantas que receberam o

mesmo tratamento acima descrito, porém foram inoculadas apenas com solução salina estéril.

MICROSCOPIA ÓTICA E ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO E VARREDURA:

As amostras do limbo foliar de sorgo var. BR 303 e cana-de-açúcar variedades SP 70-I 143 e B-4362 foram transportados ao laboratório em sacos plásticos mantidos a baixa temperatura e imediatamente segmentos do limbo foliar variando de 1,0 a 10 mm² foram preparados como descrito no capítulo III desta tese.

IMUNOMARCAÇÃO COM PARTÍCULAS DE OURO PARA MICROSCOPIA ÓTICA E ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO:

Foi feita como descrita no capítulo III desta tese.

FOTOGRAFIA E REVELAÇÃO:

Como descrito no capítulo III desta tese.

CONTAGEM DE PARTÍCULAS DE OURO:

Seções do limbo foliar das variedades de cana-de-açúcar SP 70-1143 e B-4362 infectadas por *H. rubrisubalbicans* estirpe M4 foram preparadas para MET e imunomarcadas com ouro como descrito anteriormente. A contagem das partículas de ouro associadas as bactérias foi feita em micrografias com aumentos de 30.000 a 40.000 vezes produzidas ao MET. Utilizou-se 10 repetições por tratamento, considerando apenas bactérias expostas em seção transversal. As médias de tratamento foram estatisticamente comparadas pelo teste t de Student ($\alpha = 1\%$), utilizando o programa MSTATC.

CONTAGEM DE CLOROPLASTOS:

Seções transversais semi-finas de segmentos do limbo foliar de cana-de-açúcar das variedades SP 70-1143 e B-4362 oriundos de 5 blocos diferentes por tratamento, foram coradas com azul de toluidina sol. 1% e levadas ao

microscópio ótico para avaliação do número de cloroplastos presentes em células da bainha foliar associadas aos feixes vasculares primário e secundário. Foram comparadas plantas inoculadas contra plantas não inoculadas aos 20 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans* estirpe M4 de ambas variedades. Os resultados obtidos foram média de 25 repetições para células da bainha associadas a nervura primária e 50 repetições para células da bainha associadas a nervura secundária. O teste de comparação de média utilizado foi o teste t de Student com nível de significância $\alpha = 1\%$ e os dados analisados utilizando o programa MSTATC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

REISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS E EXPRESSÃO DOS SINTOMAS DA DOENÇA:

Estria mosqueada da cana-de-açúcar:

Ambas espécies de *Herbaspirillum* foram reisoladas dos tecidos foliares das variedades SP 70-1143 e B-4362 próximos ao ponto de inoculação aos 7 e 20 dias após a inoculação (Tabela 2) sendo cultivadas em meio JNFb semi-sólido (BALDANI et al., 1992). Plantas inoculadas com estirpes de *H. seropedicae* não incitaram sintomas da doença em nenhuma das variedades testadas (Tabela 3), observou-se apenas o desenvolvimento de uma pequena área necrótica ao redor do ponto de inoculação no limbo foliar. Os tecidos adjacentes ao local de inoculação apresentavam-se sadios, sem desenvolvimento de clorose ou estrias vermelhas. Em contraste, o ponto de inoculação no limbo foliar de ambas variedades inoculadas com *H. rubrisubalbicans* apresentava-se avermelhado e extensiva anasarca desenvolveu-se no ponto inicial de inoculação na região do cartucho foliar. Todas as estirpes de *H. rubrisubalbicans* produziram sintomas visíveis da doença estria mosqueada aos 7 dias após a inoculação apenas na variedade sensível B-4362 (Figura 1A e Tabela 3). Os sintomas caracterizaram-se pelo desenvolvimento de um forte mosqueado, seguido de necrose na região de maior severidade da doença e estrias vermelhas ao longo das nervuras no limbo foliar, similares aqueles reportados por CHRISTOPHER & EDGERTON (1932). Aos 20 dias após a inoculação, a doença atingiu seu pico na var. B-4362, não

Tabela 2 - Reisolamento de *Herbaspirillum* spp. de amostras de folhas próximas ao ponto de inoculação em meio JNFb semi-sólido aos 7 e 14 d.a.i. para sorgo e 7 e 20 d.a.i. para cana-de-açúcar.

	Saccharum spp. var.				S. bicolor	
ESTIRPES	SP 70-1143		B-4362		var.BR 303	
d.a.i.	7	20	7	20	7	14
<i>H. rubrisubalbicans</i>						
M4	3 ^{AC}	2	3	3	2	2
IBSBF 175	3	3	3	3	2	2
MI	3	3	3	3	2	2
HCC103	3	2	3	3	3	1
<i>H. seropedicae</i>						
Z67	3	1	3	1	2	2
Z78	3	0	3	0	2	2
HRC54	3	2	3	1	2	0
HCC102	3	1	3	1	2	1
CONTROLE	0	0	0 ^B	0	0	0

^A Os resultados de reisolamento expressos acima foram obtidos pela conjugação de dois experimentos, sendo que apenas no segundo foram colhidas amostras para microscopia ótica e eletrônica.

^B No primeiro ensaio *Herbaspirillum* foi isolado de folhas de cana-de-açúcar da var. B-4362 pertencentes ao controle não inoculado em números variando de 10^5 a 10^6 células.g⁻¹, em testes bioquímicos e moleculares a bactéria foi classificada como o de 10^5 a 10^6 *H. rubrisubalbicans* (estirpe B-4362).

^C Nº frascos positivos num total de 3.

Tabela 3- Avaliação dos sintomas da doença estria mosqueada/estria vermelha em plantas de cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum*) aos 20 dias após a inoculação e sorgo (*Sorghum bicolor*) aos 14 dias após inoculação.

ESTIRPES	<i>Saccharum</i> spp. var.		<i>S. bicolor</i> var.	
	SP 70-1143	B-4362	BR 303	BR 005
<i>H. rubrisubalbicans</i>				
M4	1 ^A	2	2	2
IBSBF 175	1	3	2	1
M1	1	3	2	2
HCC103	1	2	1	1
<i>H. seropedicae</i>				
Z 6 7	0	0	1	1
Z78	0	0	0	0
HRC54	0	0	0	0
HCC102	0	0	0	0
CONTROLE	0	0	0	0

^A Escala de intensidade de sintomas variando de 0 a 3

Nota 0: ausência de anasarca no cartucho foliar, presença de halo necrótico ao redor do ponto de inoculação e ausência de mosqueado e estrias vermelhas no limbo foliar;

Nota 1: anasarca menor que 2mm de diâmetro no cartucho, presença de halo avermelhado ao redor do ponto de inoculação associada a ausência de mosqueado e estrias vermelhas < 2mm de comprimento;

Nota 2: anasarca entre 2 e 5 mm de diâmetro, presença de halo avermelhado ao redor do ponto de inoculação no limbo foliar, estrias vermelhas de até 50 mm e mosqueado próximo ao ponto de inoculação;

Nota 3: anasarca maior que 100 mm de diâmetro, presença de halo avermelhado ao redor do ponto de inoculação e desenvolvimento contínuo de área necrótica e mosqueado associados a estrias vermelhas maiores que 50 mm;

Obs: em sorgo não há expressão de sintomas de mosqueado

FIGURA 1

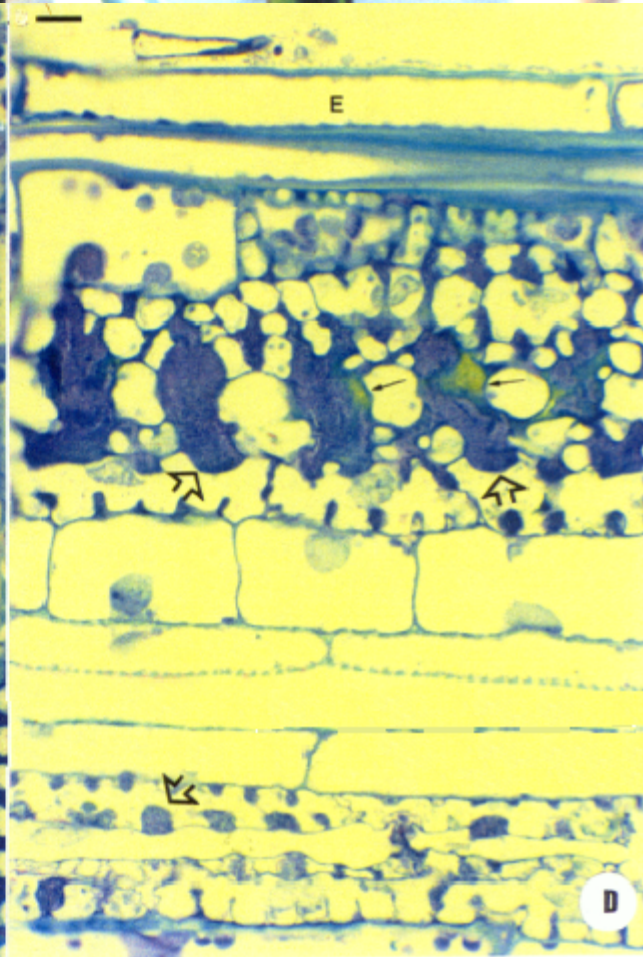
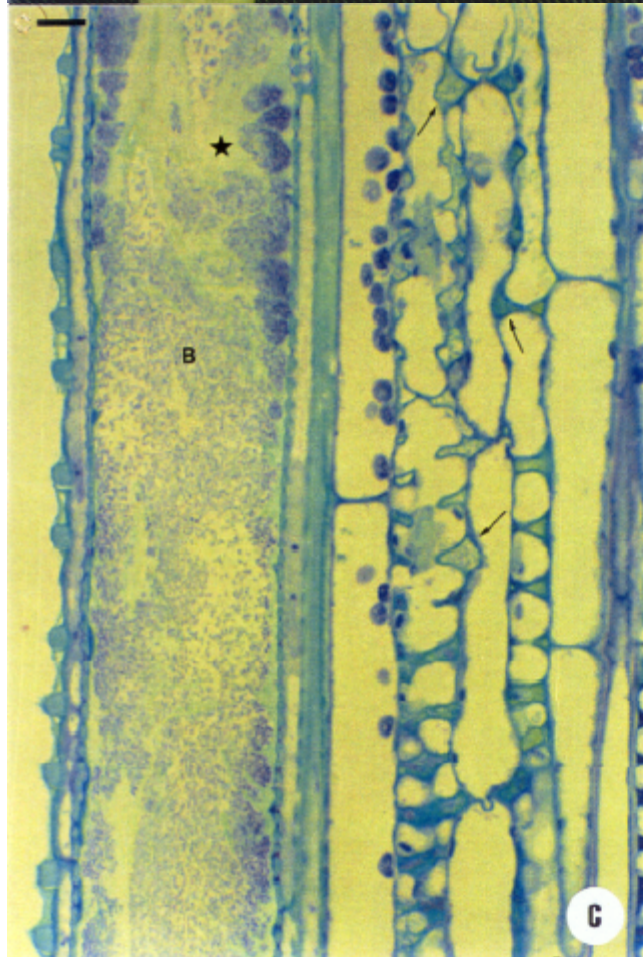
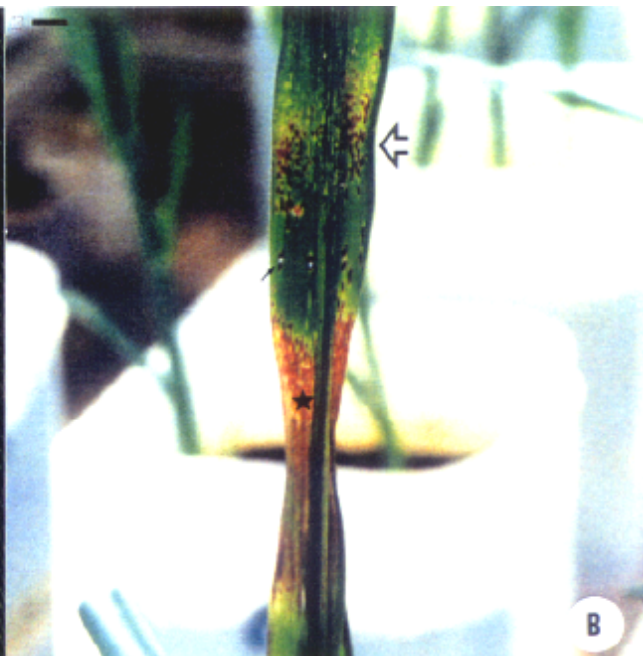
Figura 1A: Folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) cv. B-4362, após 7 dias da inoculação com *H. rubrisubalbicans* estirpe IBSBF 175 (direita), comparada com o controle (inoculado com solução salina). Estrias vermelhas se desenvolvendo ao longo das nervuras a partir do ponto de inoculação (seta), barra = 5 mm.

Figura 1B: Folhas de cana-de-açúcar cv. B-4362 aos 20 dias após a inoculação com *H. rubrisubalbicans* estirpe M4 mostrando sintomas típicos de estria mosqueada, observar necrose e mosqueado (setas grandes e estrela), acima e abaixo do ponto de inoculação (seta pequena), barra = 5 mm.

Figura 1C: Fotomicrografia de microscopia ótica (FMO) de seção longitudinal do mesofilo foliar de cana-de-açúcar cv. B-4362 aos 7 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans*. Vaso do protoxilema colonizado pela bactéria (B) e produção de goma (★), corado de verde-azulado com azul de toluidina. Notar colonização dos espaços intercelulares do mesófilo (setas), barra = 10 μ m.

Figura 1D: FMO de seção longitudinal do mesófilo foliar da cana-de-açúcar cv. B-4362 infectado com *H. rubrisubalbicans* (20 d.a.i.). Os espaços intercelulares das células do mesófilo são densamente colonizados por bactérias (setas grandes) e produção de gomas coradas de verde-azulado (setas pequenas), barra = 10 μ m.

Abreviações: epiderme (E).



sendo necessário realizar colheitas posteriores para investigar o progresso da doença. Nesta etapa, todos os estágios da doença tinham sido observados, incluindo necrose próximo ao ponto de inoculação, estrias vermelhas coalescentes associadas a um fundo clorótico e estrias vermelhas evoluindo ao longo das nervuras em ambas direções (Figura 1A, 1B). Plantas da var. B-4362 apresentando sintomas não morreram, porém observou-se uma redução na vida útil de folhas expressando sintomas, que tiveram seu processo de senescência acelerado. Na variedade SP 70-1143 (resistente a estria mosqueada), *H. rubrisubalbicans* não incitou sintomas da doença em nenhuma das épocas de colheita, desenvolvendo apenas esporadicamente estrias vermelhas de no máximo 2mm de comprimento ao redor do ponto de inoculação (Tabela 3).

Estrias Vermelhas em sorgo (*Sorghum bicolor*):

Ambas espécies de *Herbaspirillum* spp. foram reisoladas de folhas de sorgo das variedades BR 303 e BR 005, próximo ao ponto de inoculação aos 5 e 14 dias após a inoculação, sendo cultivadas em meio JNFb semi-sólido (Tabela 2). Entretanto, apenas plantas inoculadas com estirpes de *H. rubrisubalbicans* expressaram sintomas típicos da enfermidade, caracterizada pela presença de estrias vermelhas de comprimento variável ao longo das nervuras do limbo foliar (Figura 2A, 2C e Tabela 3). Plantas inoculadas com *H. seropedicae* não desenvolveram sintomas da doença, embora algumas estrias muito pequenas tenham sido observadas (< 3mm) próximas ao ponto de inoculação em plantas inoculadas com a estirpe Z67, o que não ocorreu no controle não inoculado (Figura 2B). Ademais, em contraste com plantas inoculadas com *H. seropedicae* cujo ponto de inoculação no cartucho foliar apresentou-se necrótico, plantas inoculadas com *H. rubrisubalbicans* apresentaram áreas circulares de cor vermelha com indução de anasarca. Os sintomas observados foram similares aqueles descritos por HALE & WILKIE (1972b). PIMENTEL et al. (1991) em trabalhos anteriores, demonstraram que ambas espécies de *Herbaspirillum* poderiam induzir estrias vermelhas em sorgo após a inoculação artificial, embora estirpes de *H. rubrisubalbicans* fossem invariavelmente mais virulentas. Tais

FIGURA 2

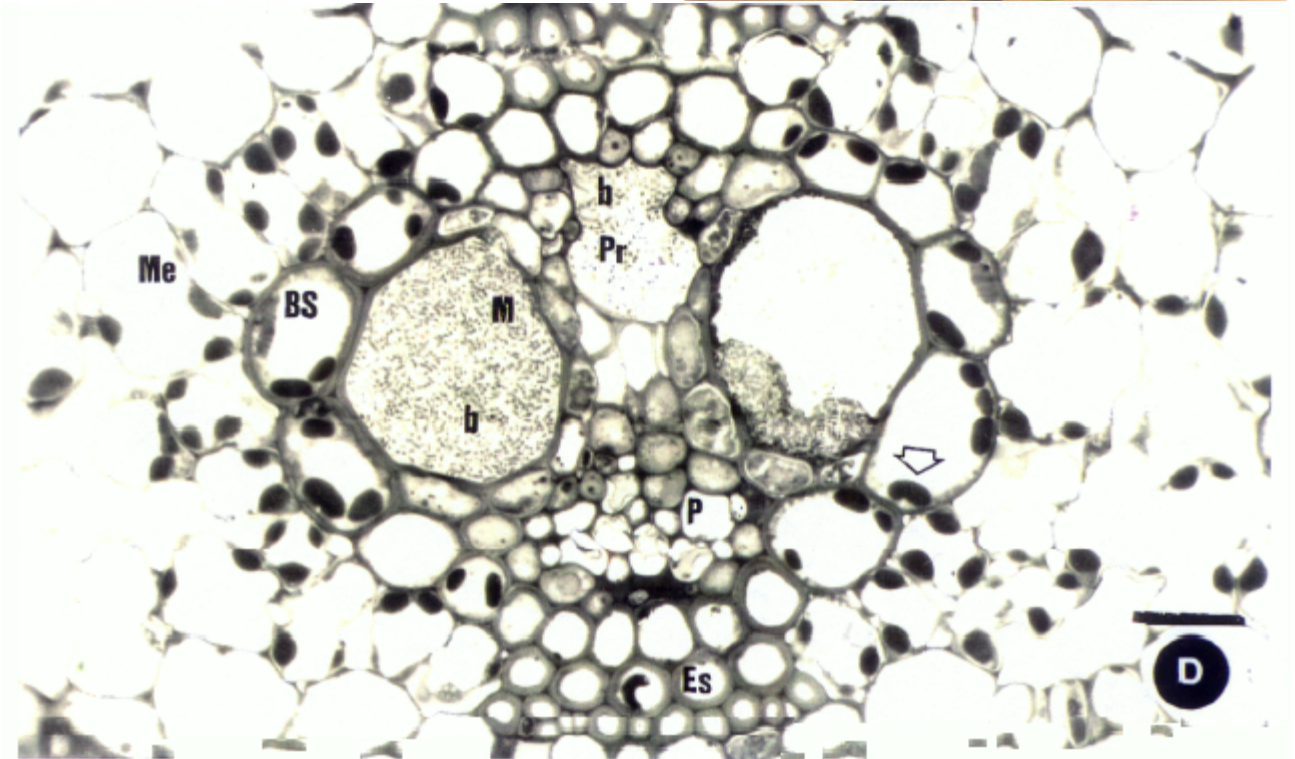
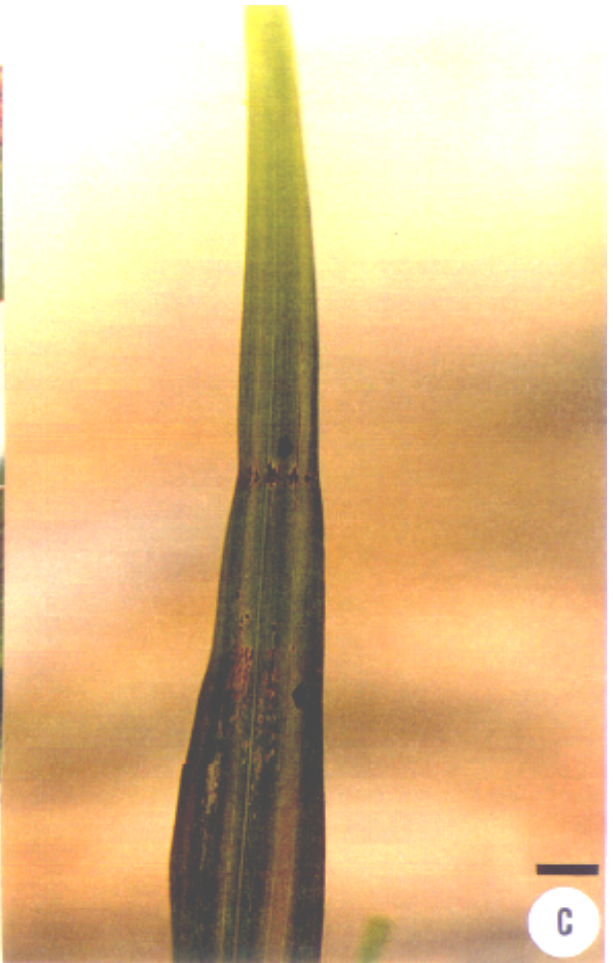
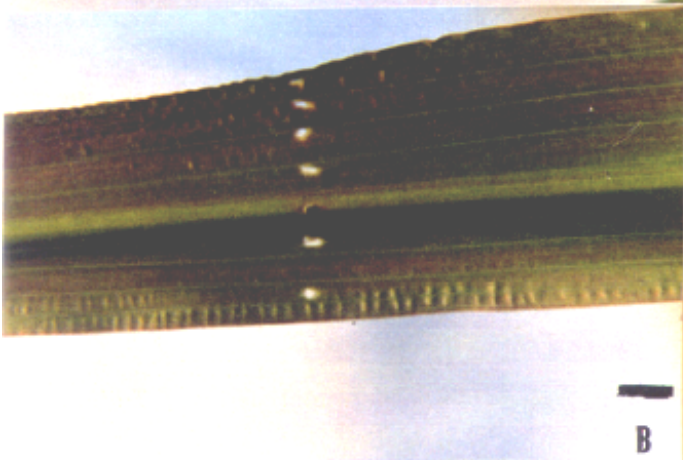
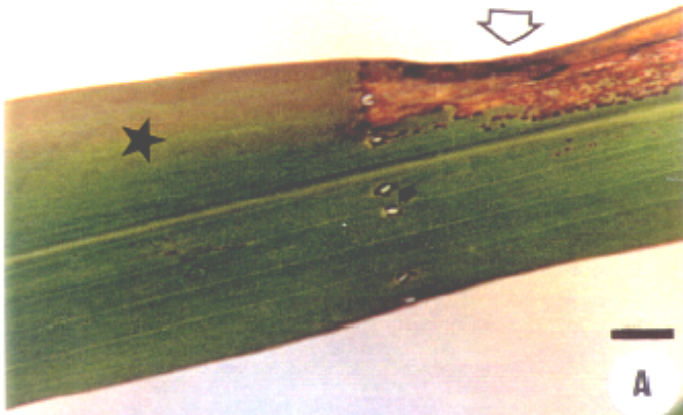
Figura 2A: Folha de sorgo mostrando sintomas de estria vermelha aos 14 dias após a inoculação com *H. rubrisubalbicans*. Observar cor avermelhada do ponto de inoculação (seta cheia pequena) e as estrias vermelhas podem ser vistas acima e abaixo do ponto de inoculação (setas vazias grande e pequena) coincidentes com as nervuras secundárias. Observar área necrótica imediatamente abaixo do ponto de inoculação (★), barra = 5 mm.

Figura 2B: Folha de sorgo após inoculação com solução salina (tratamento controle). Observar ausência de cor vermelha ao redor do ponto de inoculação (seta), barra = 5mm.

Figura 2C: Folha de sorgo inoculada com *H. rubrisubalbicans* mostrando evolução das estrias ao longo da nervura (setas), barra = 10 mm.

Figura 2D: FMO de seção transversal do limbo foliar de sorgo 5 dias após a inoculação com *H. rubrisubalbicans* estirpe M4. Observar colonização restrita aos vasos do protoxilema e metaxilema. Cloroplastos (setas), barra = 20µm.

Abreviações: Metaxilema (**M**), Bainha vascular (**BS**), Mesófilo (**Me**), Protoxilema (**Pr**), Floema (**P**), Esclerênquima (**Es**), (**b**) bactéria, bar = 20µm.



resultados diferem em parte dos obtidos no presente estudo. Estas diferenças podem ser explicadas pela redução da concentração de inóculo e por diferenças ambientais na casa de vegetação, já que o ensaio do presente estudo foi conduzido no período de inverno. Aos 14 dias após a inoculação todos os estágios da doença já tinham sido observados, ocorrendo degradação e necrose em regiões do limbo foliar próximas ao ponto de inoculação e estrias vermelhas evoluindo em ambas direções do limbo foliar (Figura 2C). Importante destacar que em se tratando de uma doença de caráter secundário (TOKESHI, 1980) danos a planta se restringem as folhas inoculadas que tem seu processo de senescência acelerado.

Comparando a expressão de sintomas em cana-de-açúcar e sorgo, podemos destacar que *H. rubrisubalbicans* incitou sintomas de doença em ambas plantas, respectivamente estria mosqueada da cana-de-açúcar e estria vermelha do sorgo. Entretanto, existe uma diferença importante entre as duas gramíneas com relação a resposta a infecção, qual seja a capacidade de *H. seropedicae* colonizar e causar sintomas leves (infrequentes) de estria vermelha em sorgo, mas não em cana-de-açúcar. PIMENTEL et al. (1991) relataram que nenhuma variedade de cana-de-açúcar expressou sintomas de doença quando inoculada com *H. seropedicae*, e isto foi confirmado no presente estudo, onde *H. seropedicae* induziu resposta hipersensível quando inoculado em folhas de cana-de-açúcar. Outra diferença entre sorgo e cana-de-açúcar, que será discutida posteriormente, esta na localização das bactérias no tecido do hospedeiro. Em sorgo ambas espécies de *Herbaspirillum* colonizaram apenas os vasos do xilema (Figura 2D), enquanto que em cana-de-açúcar, *H. rubrisubalbicans* colonizou também o mesófilo foliar (Figura 1C, 1D). Este aspecto é determinante na aparência dos sintomas, já que as estrias vermelhas características da doença em sorgo correspondem a colonização do sistema vascular pela bactéria, sendo a necrose posterior devido a deficiência de nutrientes e água causada pelo bloqueio dos vasos e não por patogênese direta dos tecidos do limbo foliar. Enquanto que, em cana-de-açúcar, as estrias vermelhas (fruto da colonização dos vasos) estão associadas a um fundo mosqueado verde-amarelo, correspondente a invasão dos

espaços intercelulares das células do mesófilo e degradação de cloroplastos pela bactéria.

LOCALIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS E RESPOSTA DE FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR E SORGO A INFECÇÃO POR ESTIRPES DE *H. seropedicae*

A inoculação artificial de folhas de cana-de-açúcar das variedades SP 70-1143 e B-4362 com diferentes estirpes de *H. seropedicae* não incitou sintomas da doença estria mosqueada. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por PIMENTEL et al. (1991) que realizaram ensaios de fitopatogenicidade em casa de vegetação utilizando diferentes genótipos comerciais de cana-de-açúcar. A observação de um grande número de seções do limbo foliar ao microscópio ótico revelaram ausência de colonização dos tecidos foliares. Paradoxalmente, *H. seropedicae* foi reisolado em meio de cultura de folhas inoculadas, aos 7 e 20 dias após a inoculação. Avaliações posteriores demonstraram que as bactérias reisoladas em meio semi-sólido provinham de regiões contendo tecidos desorganizados e de aparência necrótica que se formavam ao redor do ponto de inoculação, confinando as bactérias e não permitindo a colonização de outras regiões do limbo foliar (Figuras 3A, 3B, 3C, 3D e 3E). O desenvolvimento deste halo necrótico ocorreu dentro de 48 horas após a inoculação com *H. seropedicae* em ambas variedades testadas e não foi observado no tratamento controle ou inoculado com *H. rubrisubalbicans*. Resposta necrótica deste tipo é indicativo de uma resposta hipersensível (RH), que caracteriza-se como uma resposta de defesa da planta de natureza necrótica e rápida, bastante efetiva contra infecção por bactérias incompatíveis (SEQUEIRA et al., 1977, MCKHANN & HIRSCH, 1994). Uma hipótese para indução de RH por uma bactéria aparentemente “compatível”, a qual é encontrada naturalmente em gramíneas (BALDANI et al., 1992; OLIVARES et al., 1996), incluindo cana-de-açúcar como planta hospedeira, poderia ser explicado por uma incompatibilidade natural entre os tecidos foliares de cana-de-açúcar e *H. seropedicae*. Estudos recentes de infecção de raízes de plantas de cana-de-açúcar micropropagadas conduzidos por OLIVARES (nesta tese), demonstraram que seções de raízes e

FIGURA 3

Figuras 3A-D: Resposta hipersensível de folhas de cana-de-açúcar cv. SP 70-1143 após inoculação com *H. seropedicae* estirpe Z67.

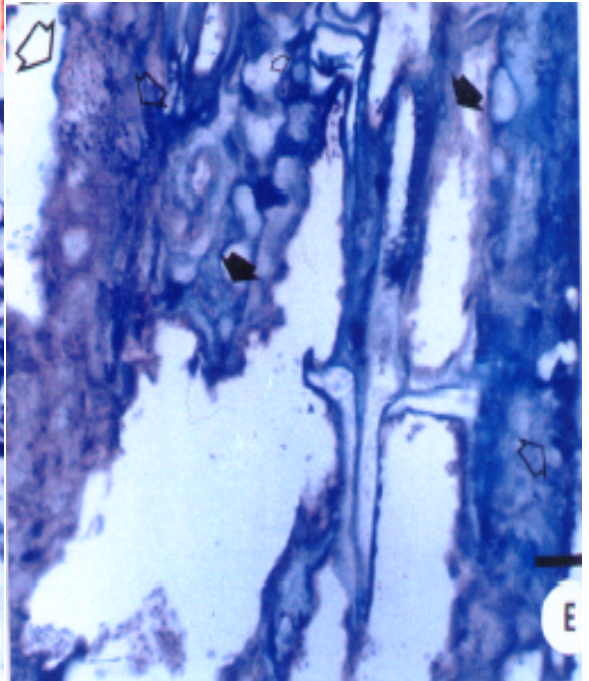
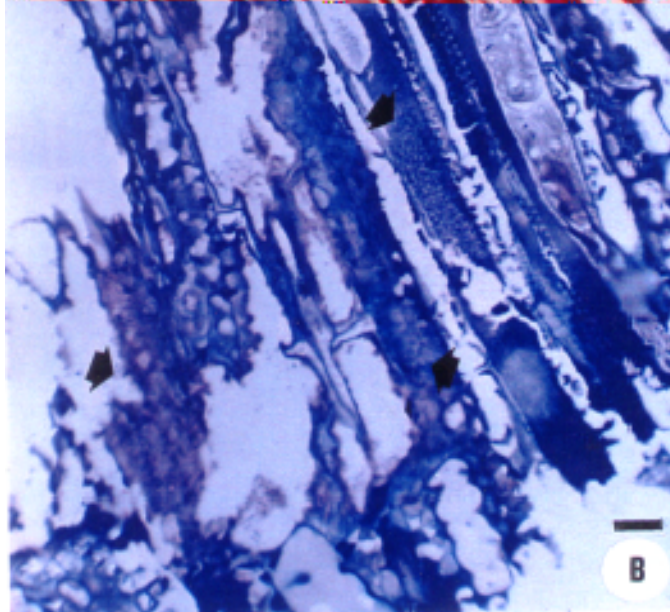
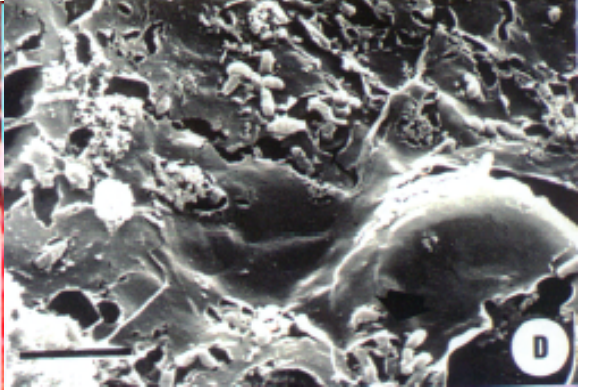
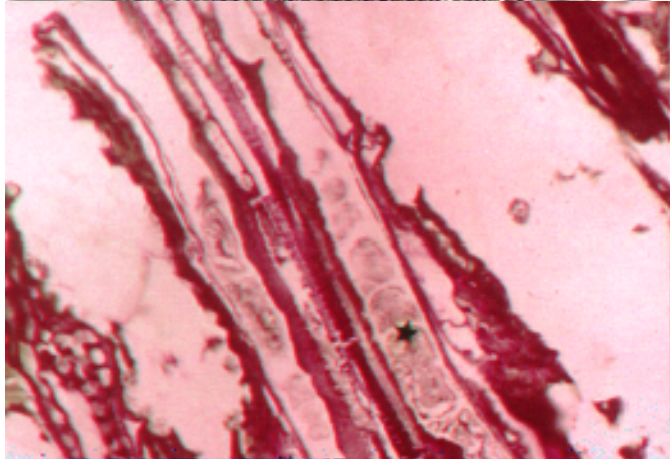
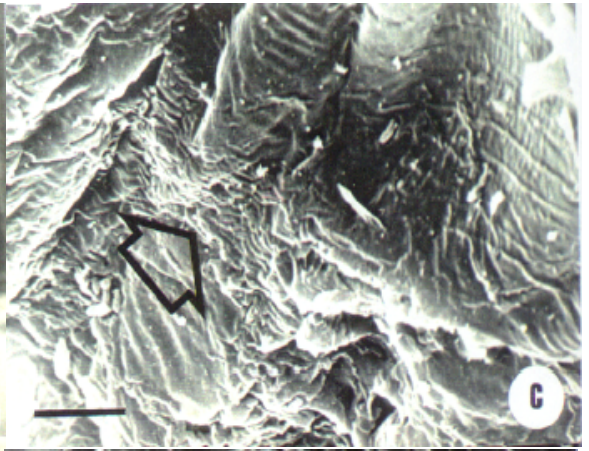
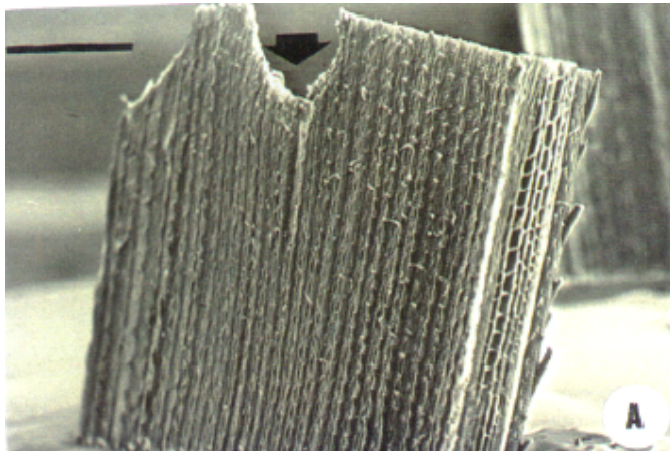
Figura 3A: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (FMEV) mostrando o sítio de inoculação no limbo foliar (seta), bar = 5 mm.

Figura 3B: FMO de seção longitudinal do limbo foliar. Observar coagulação do conteúdo citoplasmático (★), necrose e deformação celular associada a massa densa de bactérias (setas), bar = 5 µm.

Figura 3C: FMEV mostrando as bactérias aderidas a parede celular, aparentemente cementadas (setas), barra = 20 µm.

Figura 3D: FMEV mostrando a parede celular das células do mesófilo com bactérias, barra = 5 µm.

Figura 3E: FMO de detalhe da Fig. 3B. Observar bactérias (setas) embebidas em uma matrix amorfa, aparentemente de células vegetais degradadas, bar = 10 µm.



colmos, mas não de folhas, foram amplamente colonizadas por *H. seropedicae*. Nestes estudos de infecção radicular, não foram observados sinais de uma reação patogênica, pelo contrário foi observado um incremento no alongamento e peso da matéria seca de raízes comparadas com o controle não inoculado. Em adição, em levantamentos de ocorrência conduzidos a campo por OLIVARES et al., (1996) *H. seropedicae* foi isolado de raízes a colmos de diversas variedades de cana-de-açúcar, mas não de folhas, o que sugere que os tecidos foliares talvez não sejam sitios naturais de colonização para *H. seropedicae* em cana-de-açúcar. Uma segunda hipótese para a indução de RH por *H. seropedicae* em folhas de cana-de-açúcar resulta da análise sobre a artificialidade do método de inoculação, que coloca um número muito grande de bactérias em contato com os tecidos foliares gerando uma resposta hipersensível, o que fatalmente não ocorreria sob condições naturais. É bem documentado na literatura que a RH é dependente da concentração do inóculo, é que em concentrações elevadas de inóculo, bactérias fitopatogênicas compatíveis a uma dada planta hospedeira podem incitar uma resposta hipersensível (BRETSCHENEIDER et al., 1989).

A avaliação de segmentos do limbo preparados para observação ao microscópio permitiram concluir que em plantas de sorgo com 5 dias após a inoculação, *H. seropedicae* foi observado no tecido foliar com menor frequência que *H. rubrisubalbicans*, colonizando os vasos e lacuna do protoxilema e não sendo observado no mesófilo foliar (Figuras 4D, 5D). As colônias de *H. seropedicae* não se apresentavam muito densas, não obstruindo o lúmen dos vasos, ademais observou-se a liberação de muco extracelular pela bactéria no interior dos vasos, o qual foi reconhecido por anticorpos específicos para *H. seropedicae* (Figura 5D). Aos 14 dias após a inoculação, a colonização dos vasos do metaxilema por *H. seropedicae* foi mais frequente e a bactéria foi observada associada intimamente as deposições de parede secundária dos vasos do metaxilema, formando pequenas camadas. Nesta época não foram observadas gomas ou mesmo bactérias ocluindo o lúmen dos vasos e estas regiões do limbo apresentavam-se assintomáticas (Figura 7D).

FIGURA 4

Figura 4A: Seção transversal do limbo foliar de sorgo 5 dias após a inoculação com *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Esta seção foi incubada com anticorpos específicos e imunomarcadas com ouro, seguido de enriquecimento com prata, e mostrando a bactéria (setas) ocupando o protoxilema/lacuna e metaxilema (M), não infectando nenhum outro tecido, barra = 20 μm .

Figura 4B: Seção similar a anterior incubada com soro pré-imune (controle), ao invés de anti-*H. rubrisubalbicans*. Notar a ausência de deposição de prata (setas). Metaxilema (M), barra = 20 μm .

Figura 4C: Seção similar a fig. 4A, incubada com anticorpo policlonal contra o componente II da nitrogenase. A bactéria na lacuna associada ao metaxilema (M) foi imunomarcada (seta grande), mas aquelas colonizando o protoxilema não (setas pequenas), barra = 20 μm .

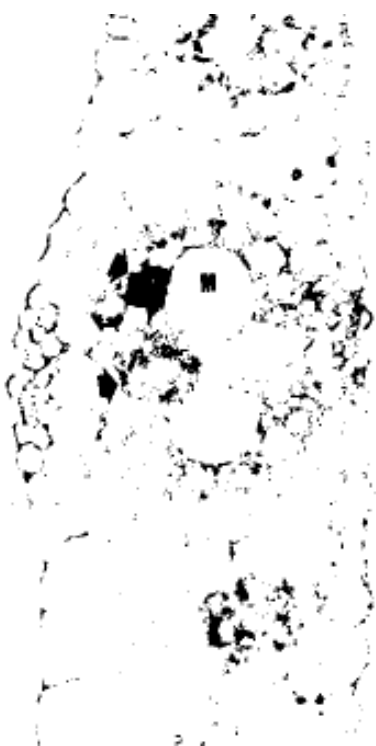
Figura 4D: Seção transversal do limbo foliar de sorgo 5 dias após a inoculação com *Herbaspirillum seropedicae*. Esta seção foi incubada com anticorpos específicos e imunomarcadas com ouro, seguido de enriquecimento com prata. A bactéria (setas) ocupa o protoxilema (seta), barra = 20 μm .



A



B



C



D

FIGURA 5

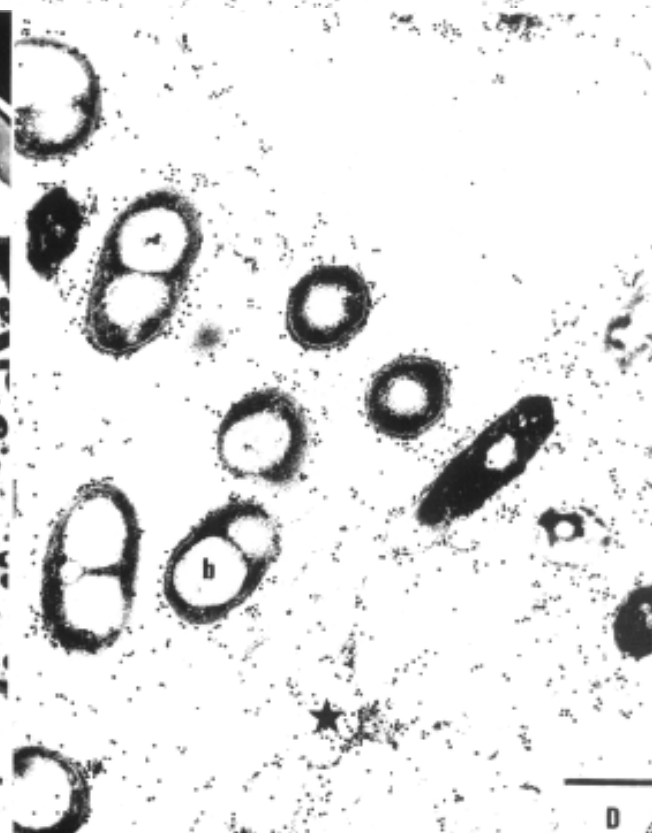
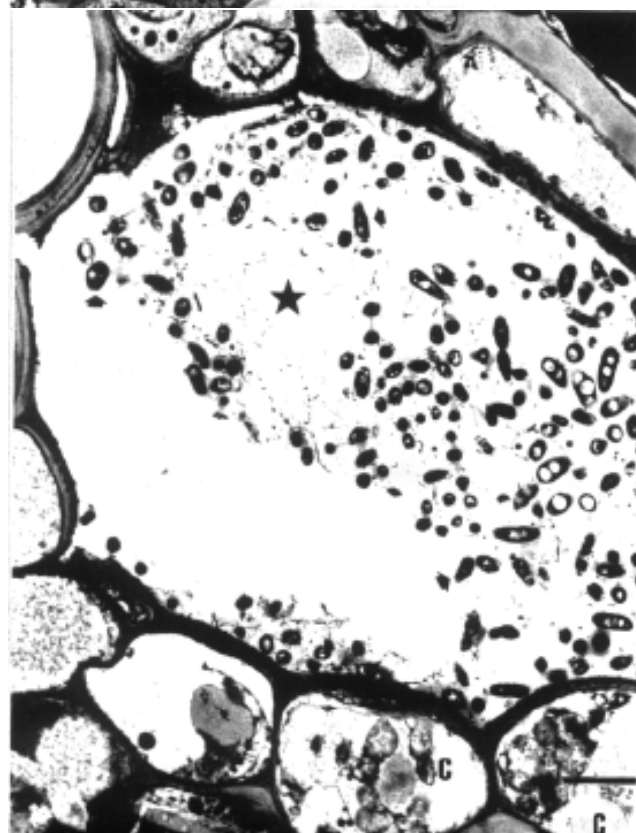
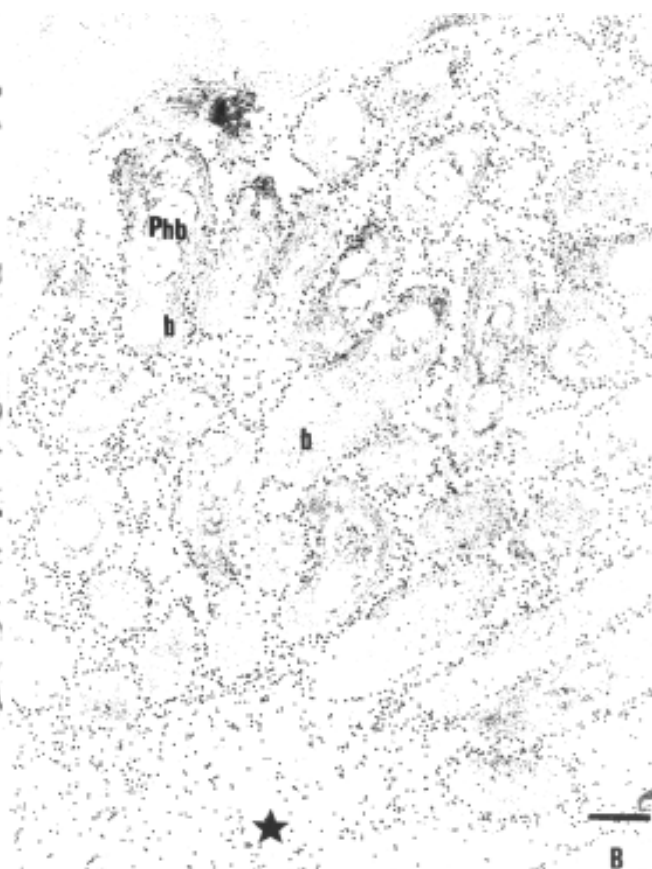
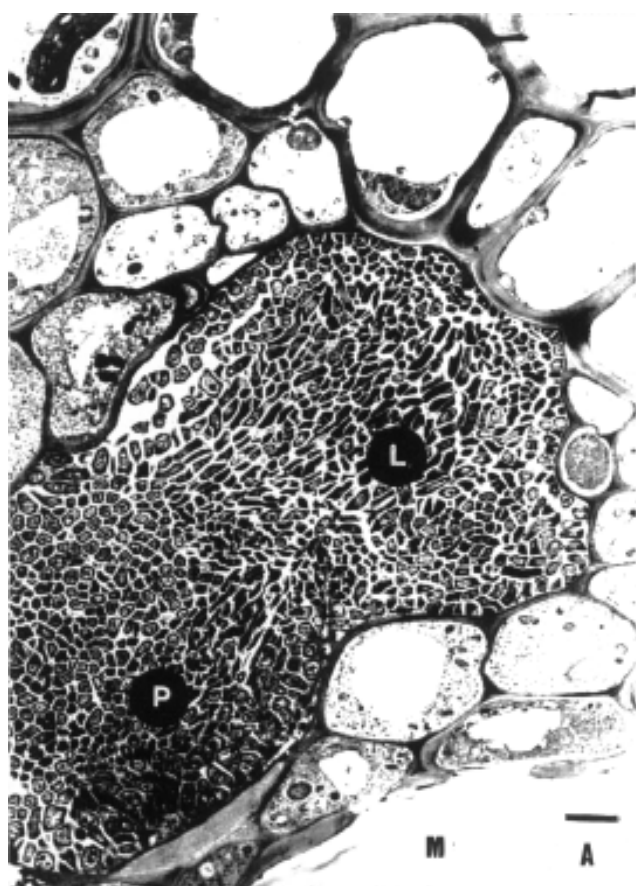
Figura 5A: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão (FMET) mostrando *H. rubrisubalbicans* colonizando o protoxilema (P) e a lacuna (L) de folhas de sorgo, 5 d.a.i., barra = 2 μ m.

Figura 5B: FMET de *H. rubrisubalbicans* no protoxilema de sorgo, 5 d.a.i.. A bactéria (b) foi imunomarcada com ouro. Notar que a região não infectada do lúmen dos vasos do protoxilema contendo material denso, foi também imunomarcada com ouro (*), barra = 500 nm.

Figura 5C: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de transmissão (FMET) mostrando *H. seropedicae* colonizando o protoxilema (P) de folhas de sorgo, 5 d.a.i. A bactéria (setas) encontra-se em menor densidade que *H. rubrisubalbicans*. Observa-se também a presença de muco no interior dos vasos (*). Célula do feixe vascular (C) em processo de senescência, barra = 2 μ m.

Figura 5D: Magnificação da seção anterior mostrando o reconhecimento da bactéria (b) utilizando anticorpos policlonais anti-*H. seropedicae* e imunomarcção com ouro. Notar reação com o muco liberado pela bactéria dentro do vaso (*), barra = 500 nm.

Abreviações: Metaxilema (M), Parede celular (W).



De modo diferente a interação com cana-de-açúcar, *H. seropedicae* em sorgo coloniza os tecidos xilemáticos do limbo foliar, bem como não elicia uma resposta de defesa severa, tal como RH ou sintomas de doença.

LOCALIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS E RESPOSTA DE FOLHAS DE SORGO E CANA-DE-AÇÚCAR A INFECÇÃO POR ESTIRPES DE *H. rubrisubalbicans*.

COLONIZAÇÃO DOS VASOS DO XILEMA EM SORGO

H. rubrisubalbicans foi facilmente localizado nos tecidos foliares de sorgo ao microscópio ótico em ambas épocas de colheita (5 e 14 dias após a inoculação) através de preparação e cortes de seções apresentando estrias vermelhas. Em seções transversais aos 5 d.a.i., a bactéria pôde ser observada em grandes números dentro dos vasos do protoxilema e na lacuna, geralmente bloqueando o lúmen (Figuras 4A, 4B e 5A). Estas bactérias foram confirmadas ser *H. rubrisubalbicans* através da técnica de imunomarcacão com ouro utilizando anticorpos específicos (Figura 5B). Observadas ao MET aos 5 d.a.i, as bactérias mediam de 0,5 a 1,0 μm de comprimento e localizavam-se preferencialmente nos vasos e lacunas do protoxilema, apresentando-se organizadas em microcolônias envolvidas por material de aspecto fibrilar (Figura 5A). Nestes estágios iniciais da interação, as bactérias não mostraram sinais de lise ou ataque da planta hospedeira. A superfície das bactérias reagiu fortemente com anticorpos para *H. rubrisubalbicans* e a bactéria foi envolvida por um muco, provavelmente EPS/LPS, os quais reagiram com o anticorpo. Material marcado com ouro (presumivelmente EPS) foi também encontrado disperso no lúmen do vaso contendo bactérias (Figura 5B).

Aos 14 dias após a inoculação, seções de regiões da nervura em transição entre estria vermelha e a área sem sintomas, observou-se deposição de grande quantidade de gomas sintetizadas pela planta que foram coradas de verde com azul de toluidina (Figura 6A), o que sugere a presença de compostos fenólicos e taninos nesta matrix. A síntese destes compostos não foi aparente até 14 d.a.i., no entanto sua produção em larga escala pelo hospedeiro foi

responsável pelo confinamento de *H. rubrisubalbicans* em colônias dentro dos vasos e supostamente a redução do espalhamento da doença dentro dos vasos (Figura 6A). É interessante destacar que a goma produzida não somente impediu o espalhamento das bactérias, mas também envolveu e definiu microcolônias de bactérias (Figura 6B). Algumas destas estruturas pareciam estar envolvidas por membrana, ademais dentro das colônias não foram visíveis gomas da planta hospedeira e as bactérias pareciam saudáveis (Figura 6C). As bactérias encontravam-se intimamente associadas a parede celular dos vasos do xilema, com microcolônias frequentemente em íntima associação com pontuações de vaso (Figura 6C), sendo também observadas embebidas em matrix fibrilar nas junções entre os vasos do protoxilema e do metaxilema (Figura 6D). Microcolônias de bactérias também foram observadas nos tecidos condutores de plantas de cana-de-açúcar colonizadas por *Clavibacter xyli* subsp *xyli* agente causal do raquitismo das soqueiras (KAO & DAMANN, 1980). Em regiões densamente colonizadas das folhas, particularmente áreas próximas ao ponto de inoculação de *H. rubrisubalbicans*, a bactéria ocupou completamente o lúmen dos vasos (Figura 7A, 7B). Foi observada que a densidade de bactérias dentro dos vasos do protoxilema foi sempre superior que dentro dos vasos do metaxilema, os quais apresentavam bactérias mais difusas e menor intensidade de coloração. Como observado em regiões em estágios iniciais da doença, ocorreu síntese de gomas (Figura 7B). Entretanto, a despeito da síntese desses compostos, as bactérias localizadas no interior dos vasos apresentavam estrutura intacta, sem sinais de ataque do hospedeiro, acumulando grânulos de poli-hidroxibutirato (PHB) e dividindo-se ativamente (Figura 7C).

Considerando a evolução da necrose foliar em regiões do limbo foliar em estágios mais avançados da doença e a presença de grande número de bactérias no interior dos elementos de vaso do xilema, é intrigante que o mesófilo adjacente a estes sítios não tenha sido infectado por nenhuma das espécies de *Herbaspirillum*.

FIGURA 6

Figuras 6A-D: Seções foram tomadas da região de interface entre a presença de estria vermelha e não (setas brancas pequenas na figura 2A), em folhas de sorgo aos 14 dias após a inoculação com *H. rubrisubalbicans*.

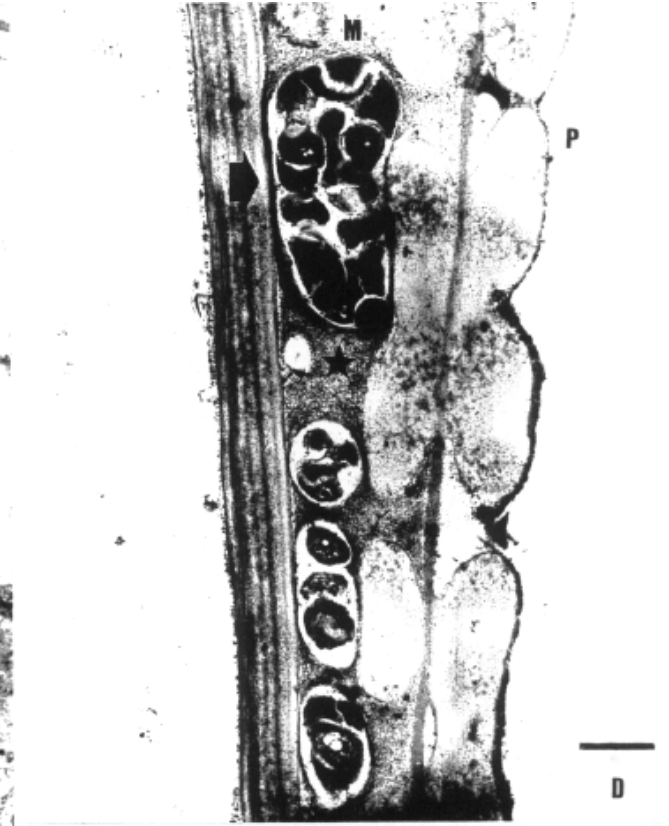
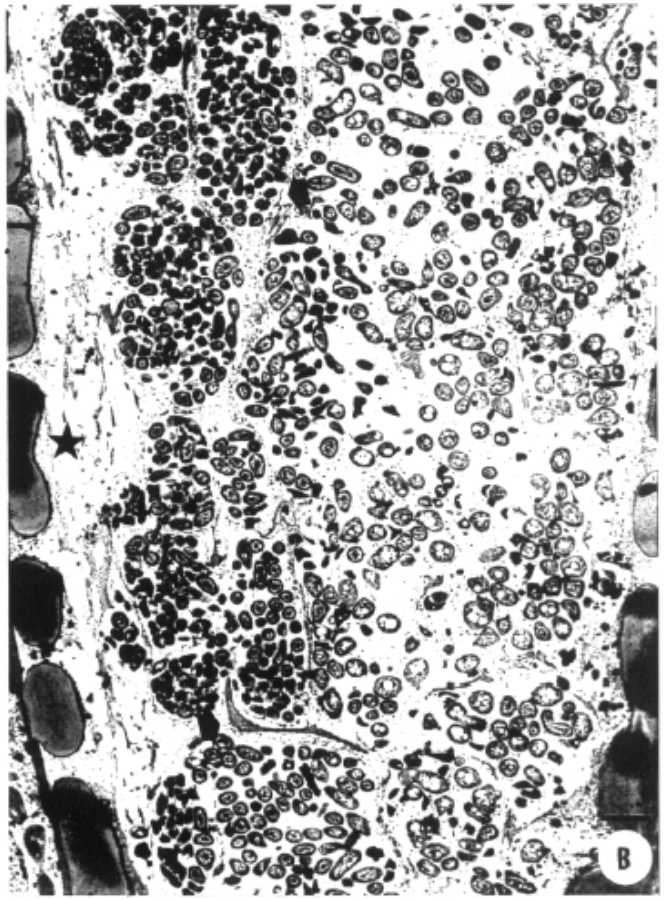
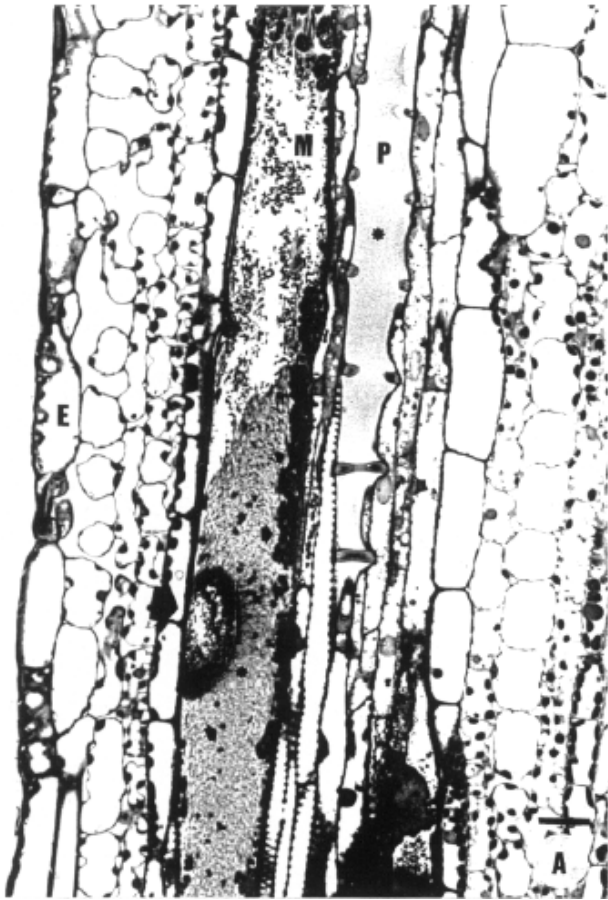
Figura 6A: Seção longitudinal mostrando os vasos do metaxilema (M) contendo gomas produzidas pela planta, a qual envolve colônias grandes de bactérias (setas grandes) e colônias pequenas (setas pequenas). O protoxilema (P) parece não colonizado, porém está preenchido com gomas, barra = 20 μm .

Figura 6B: FMET mostrando *H. rubrisubalbicans* dentro do metaxilema (M). O lúmen do vaso apresenta deposição de goma (*), a qual envolve bactérias individuais e colônias (setas), barra = 2 μm .

Figura 6C: FMET de detalhe de uma microcolônia de *H. rubrisubalbicans* associada a pontuação (p) da parede do vaso do metaxilema (M). Observar as bactérias aparentemente saudáveis (b) envolta por uma membrana (seta), barra = 500nm.

Figura 6D: FMET mostrando *H. rubrisubalbicans* envolto por material gomoso (asteriscos), na junção entre as paredes celulares dos vasos do protoxilema (P) e metaxilema (M), barra = 1 μm .

Abreviação: Epiderme (E).



COLONIZAÇÃO DOS VASOS DO XILEMA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Em contraste com *H. seropedicae*, a inoculação de folhas de cana-de-açúcar com estirpes de *H. rubrisubalbicans* resultou na expressão da doença estria mosqueada. A severidade dos sintomas dependeu da variedade de planta, e a extensão da colonização dos tecidos foliares foi um indicativo da suscetibilidade relativa a doença. Somente a variedade B-4362; relatada como sensível (TOKESHI et al., 1980) produziu os sintomas típicos da doença. Entretanto, em ambas variedades de cana-de-açúcar foi fácil localizar *H. rubrisubalbicans* no interior dos tecidos foliares por meio de microscopia ótica e eletrônica. Comparando a colonização de *H. rubrisubalbicans* nas variedades resistente e sensível, observou-se um padrão distinto de colonização dos vasos do xilema e dos espaços intercelulares das células do mesófilo, função do grau de sensibilidade a doença.

Comparando primeiramente a colonização dos vasos do xilema, observou-se que aos 7 dias após a inoculação, na variedade sensível a estria mosqueada (B-4362) a bactéria foi encontrada colonizando parcialmente o lúmen dos vasos do protoxilema e os vasos do metaxilema em regiões do limbo foliar apresentando estrias vermelhas (Figura 8A). Aos 20 dias após a inoculação, muitos vasos foram completamente obstruídos (Figura 8B). Curiosamente, vasos do protoxilema apresentavam uma densidade de colonização bacteriana maior que os vasos do metaxilema. Este último apresentava ao microscópio ótico, células bacterianas mais espaçadas entre si e coloração menos intensa com azul de toluidina, o que foi também observado em sorgo.

Na variedade resistente (SP 70-1143) observações ao microscópio ótico do xilema em regiões do limbo foliar próximo ao ponto de inoculação, revelaram a presença de uma combinação de colônias bacterianas encapsuladas (envoltas por material membranoso) aderidas a parede celular secundária dos vasos do metaxilema e a secreção de um material de aspecto mucoso, corado de verde pelo uso de azul de toluidina no interior do lúmen do vasos do xilema (Figura 8C, 8D). Este material foi observado também na var. B-4362, porém foi aparentemente sintetizado em menor quantidade e associado a regiões de menor

FIGURA 7

Figuras 7A-C: Seções obtidas de regiões do limbo foliar de sorgo 14 dias após a inoculação com *H. rubrisubalbicans*, exibindo sintomas avançados de estria vermelha (setas brancas grandes na fig. 2A).

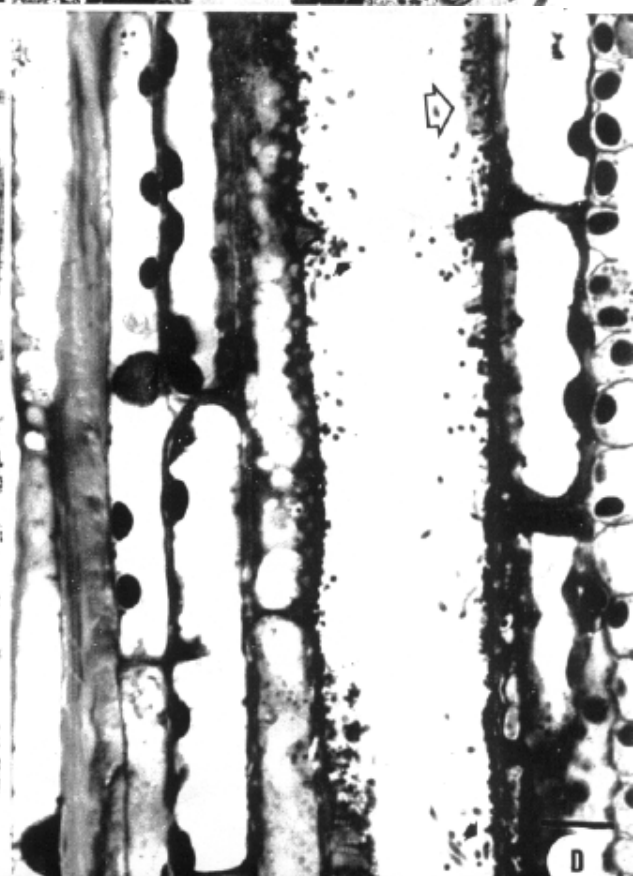
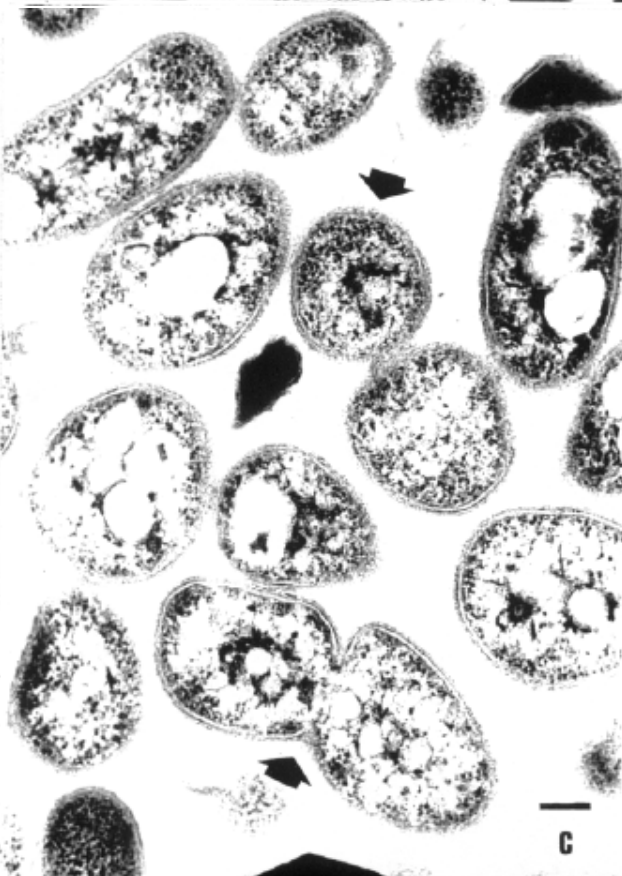
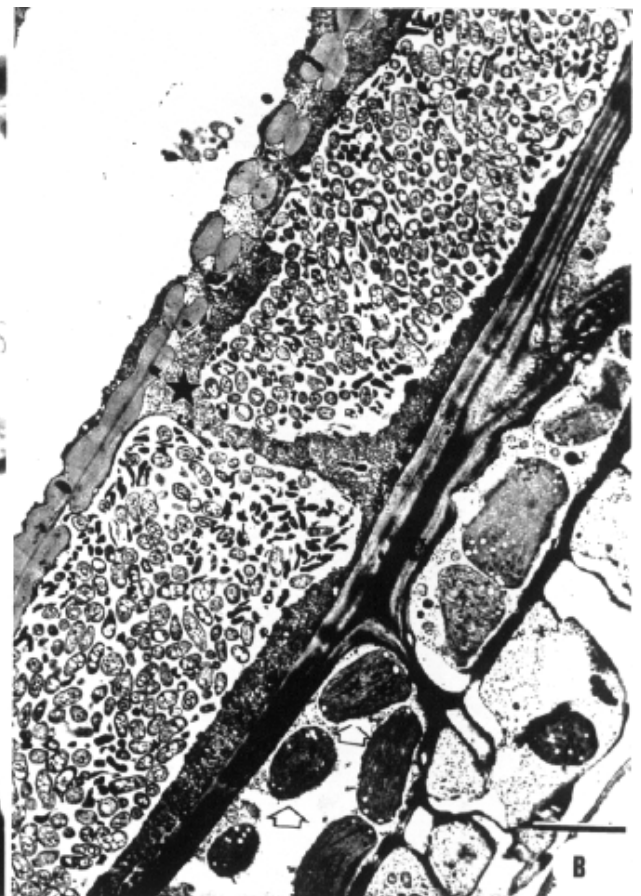
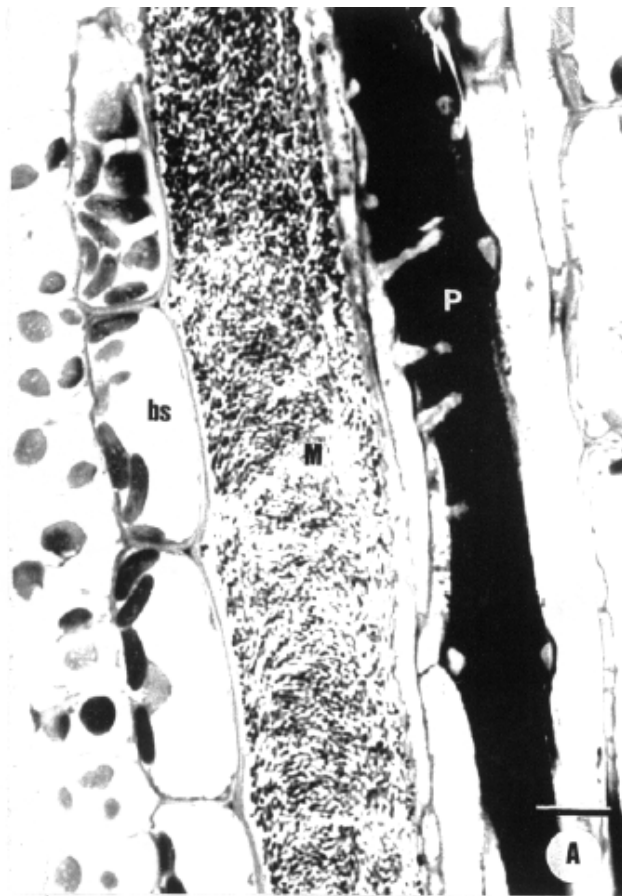
Figura 7A: Seção longitudinal mostrando que o xilema, particularmente o protoxilema (P), está densamente colonizado pela bactéria, barra = 10 μm .

Figura 7B: FMET mostrando que as bactérias presentes no metaxilema, não apresentam-se mais confinadas em microcolônias, como aquelas presentes em regiões de transição da doença (Figs. 4A-C), com a bactérias obstruindo completamente o lúmen e apenas uma fina camada de goma envolvendo as bactérias (asteriscos). A bactéria continua restrita ao xilema, com células de parênquima do feixe apresentando cloroplastos intactos (seta), barra = 5 μm .

Figura 7C: Magnificação da figura 7B, mostrando *H. rubrisubalbicans* no interior do metaxilema dividindo-se ativamente (setas), barra = 5 μm .

Figura 7D: Seção longitudinal do protoxilema da folha de sorgo aos 14 dias após a inoculação com *H. seropedicae*. a bactéria apresenta-se confinada a parede do vaso (setas), ficando o lúmen quase que completamente livre de bactérias e gomas, barra = 10 μm .

Abreviações: Metaxilema (M), Feixe vascular (BS),



densidade de colonização pelas bactérias. Em adição, as colônias de bactérias associadas aos vasos da var. SP 70-1143 não se multiplicaram ao ponto de obstruir o lúmen dos vasos, permanecendo como agregados de células de *Herbaspirillum* organizados em colônias discretas (Figuras 8C, 8D). Tais microcolônias foram também observadas nos vasos do xilema de sorgo inoculado com *H. rubrisubalbicans* (nesta tese) e são bastante similares aquelas mostradas por KAO & DAMANN, (1980) em cana-de-açúcar infectada naturalmente pelo agente causal do raquitismo das soqueiras, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. Tal como no presente estudo para *H. rubrisubalbicans*, KAO & DAMANN, (1980) relataram que vasos do xilema infectados por *C. xyli* subsp. *xyli* não sofreram aparentemente danos visíveis tais como degradação e ruptura da parede celular, o que sugere um grau mais evoluído de compatibilidade entre a planta e a bactéria, já que a grande maioria dos fitopatógenos do sistema vascular multiplica-se rapidamente no interior do lúmen, obstruindo e rompendo a parede dos vasos por pressão mecânica associada ou não a dissolução enzimática da parede celular (WALLIS, 1977; KAO & DAMANN, 1980; GROSS & CODY, 1985; LEIGH & COPLIN, 1992; BOHER et al., 1995). De acordo com o exposto, podemos pressupor que a colonização dos vasos do xilema nem sempre produz danos óbvios a planta hospedeira e a bactéria infectante e que uma situação de equilíbrio pode ser atingida, como demonstrada na interação resistente no presente estudo e em outras interações (BRETSCHNEIDER et al., 1989).

A grande quantidade de goma produzida no interior do lúmen dos vasos da var. SP 70-1143 é supostamente parte dos mecanismos não específicos de defesa da planta hospedeira eliciado pela colonização da bactéria (WALLIS, 1977; OUCHI, 1983; BRETSCHNEIDER et al., 1989; VASSE et al., 1993; PERROTO et al., 1994; YOUNG et al., 1995). Este material de aparência gomosa preenchendo as cavidades entre as deposições de parede secundária e o lúmen dos vasos foi similar aquele relatado por VANDERMOLEN et al. (1977), KAO & DAMANN (1980) BRETSCHNEIDER et al. (1989) e BOHER et al. (1995).

VANDERMOLEN et al. (1977) propuseram que os géis e gomas são originados da expansão dos constituintes da parede celular primária, lamela média

FIGURA 8

Figuras 8A-D: Fotomicrografias de microscopia ótica (FMO).

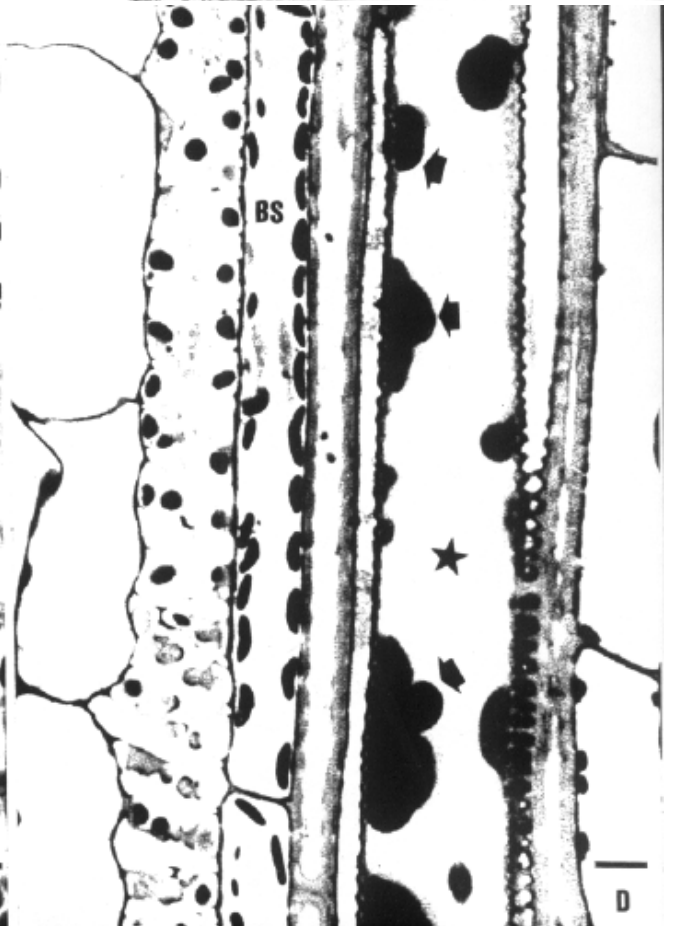
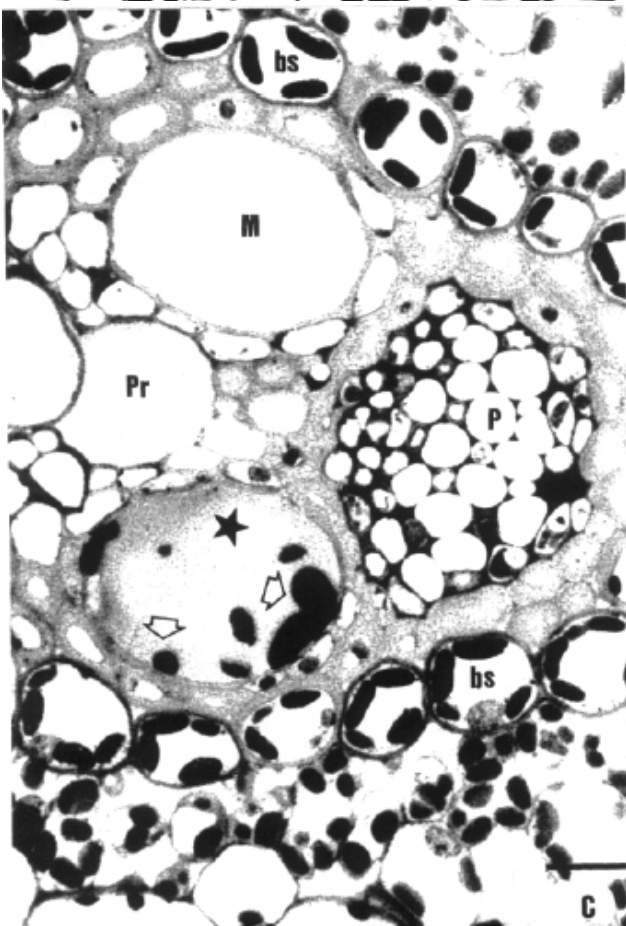
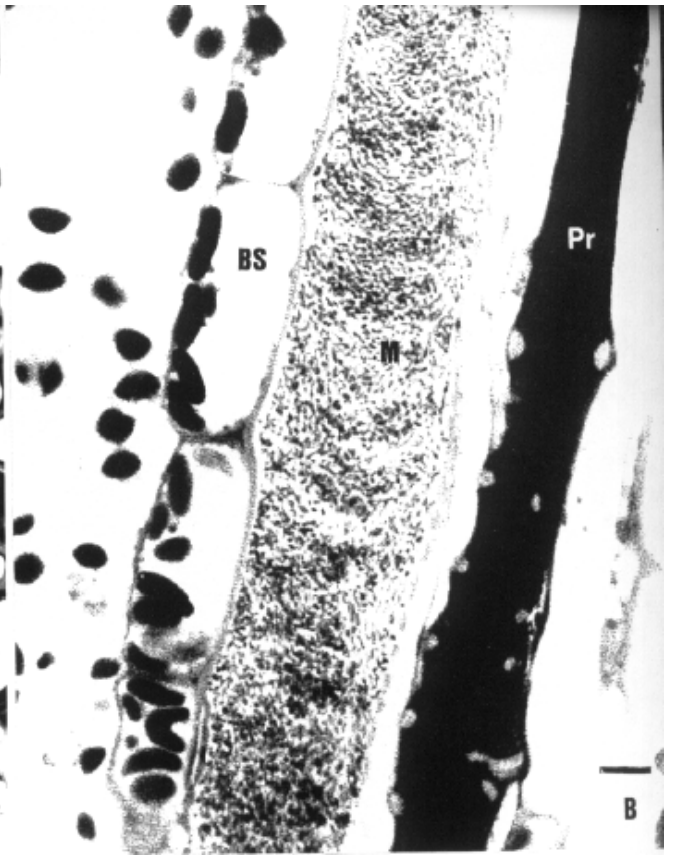
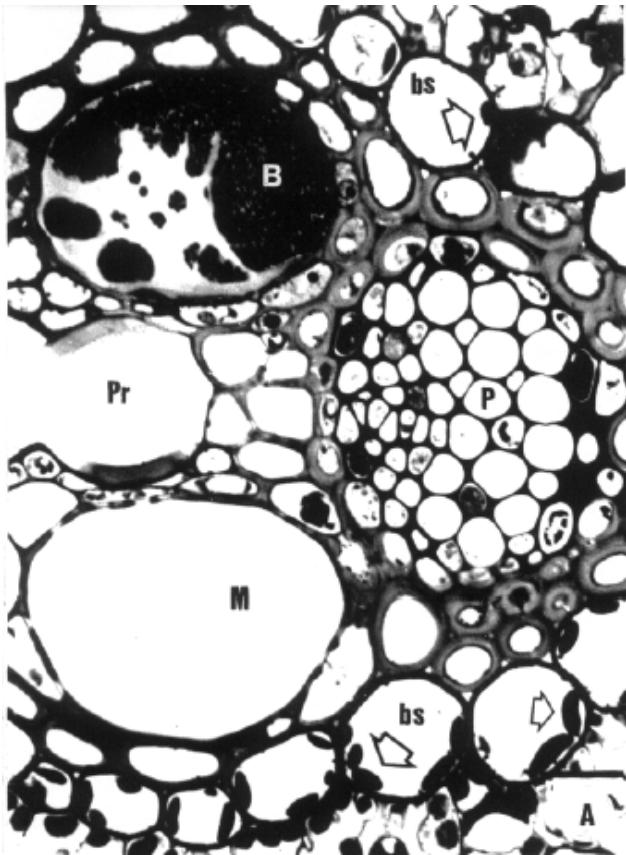
Figura 8A: FMO de seção transversal do feixe vascular de folhas de cana-de-açúcar cv. B-4362 aos 7 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans*. Um dos metaxilema apresenta-se colonizado pela bactéria (b). Existem poucos cloroplastos (setas) na bainha vascular adjacente ao vaso colonizado barra = 10 μm .

Figura 8B: FMO de seção longitudinal do feixe vascular de folhas de cana-de-açúcar cv. B-4362 aos 20 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans*. O protoxilema esta densamente colonizado, comparado ao metaxilema, barra = 10 μm .

Figura 8C: FMO de seção transversal do feixe vascular de folhas de cana-de-açúcar cv. SP 70-1143 aos 20 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans*. Um dos vasos do metaxilema (M) contém colônias de bactérias (setas), estando o resto do lúmen do vaso ocluso por uma goma (*), barra = 10 μm .

Figura 8D: FMO de seção longitudinal do feixe vascular de folhas de cana-de-açúcar cv. SP 70-1143 aos 20 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans*, mostrando colônias de bactérias, aparentemente envolvidas por uma membrana (setas). O lúmen do metaxilema contém gomas (*), barra = 10 μm .

Abreviações: epiderme (E), bainha vascular (bs), metaxilema (M), Floema (P), protoxilema (Pr).



e das placas de perfuração dos elementos condutores do xilema e são produzidos como um mecanismo geral em resposta a infecção por patógenos, impedindo seu avanço. Outros autores citam que associada a goma e géis, são sintetizados uma série de compostos de defesa tais como proteínas da classe das lectinas, glicoproteínas, compostos fenólicos e calose, dentre outros (OUCHI, 1983; BESTWICK et al., 1995). Este mecanismo de restrição a colonização do xilema foi efetivo na interação entre *H. rubrisubalbicans* x SP 70-1143, o que parece não ocorrer na interação *H. rubrisubalbicans* x B-4362, já que invariavelmente a bactéria obstruiu completamente o lúmen dos vasos, presumivelmente impedindo o fluxo de seiva através do mesmo (OUCHI, 1983; GROSS & CODY, 1985; LEIGH & COPLIN, 1992). A oclusão dos elementos condutores do xilema por bactérias associada a grande produção de muco bacteriano, é a causa dos sintomas clássicos de murcha bacteriana em plantas cultivadas infectadas com muitas espécies patogênicas de *Pseudomonas* (GROSS & CODY, 1985, LEIGH & COPLIN, 1992), e poderia explicar a redução do ciclo de vida de folhas de cana-de-açúcar da var. B-4362 com estria mosqueada.

A presença de bactérias nos vasos do xilema em diversos órgãos da planta tem sido largamente relatada na literatura, e pode envolver interações patogênicas ou interações benéficas como a associação entre bactérias diazotróficas e gramíneas (PATRIQUIN & DÖBEREINER, 1983; RUPPEL et al., 1992; HUREK et al., 1994; SCHLOTER et al., 1995). Para cana-de-açúcar a situação não é diferente com inúmero relatos envolvendo interações benéficas ou maléficas (KAO & DAMANN, 1980; HARRISON & DAVIS, 1988; OLIVARES et al., 1993; JAMES et al. 1994). Bactérias que colonizam os vasos condutores do xilema tem vantagens ecológicas em relação a outras, devido ao seu rápido espalhamento na planta via fluxo transpiratório, podendo atingir possíveis sítios de estabelecimento mais rapidamente (HARRISON & DAVIS, 1988; SPRENT & JAMES, 1995).

A densidade de colonização dos vasos do xilema em folhas de sorgo por *H. rubrisubalbicans* parece estar em um estágio intermediário entre aquela observada nas variedades B-4362 e SP 70-1143. Similar a var. B-4362, em sorgo

H. rubrisubalbicans obstruiu os vasos de algumas folhas, principalmente do protoxilema, associada a expressão de sintomas de estrias vermelhas de baixa severidade. Entretanto, tal como na var. SP 70-1143, a bactéria também eliciou mecanismos de defesa da planta hospedeira, ocorrendo a síntese de gomas e géis que frequentemente restringiram a bactéria a microcolônias envolvidas por material fibrilar, desse modo não ocluindo os vasos. Este mecanismo para restrição da colonização dos vasos e do mesófilo por *H. rubrisubalbicans* foi efetivo para a var. SP 70-1143 e relativamente efetivo em sorgo, porém não o foi na var. B-4362, com a bactéria bloqueando completamente os vasos e colonizando também o mesófilo foliar. Além do mais, diferentemente de cana-de-açúcar, *Herbaspirillum* spp. em folhas de sorgo, permaneceram confinadas aos vasos do xilema, não ocorrendo colonização dos espaços intercelulares das células do mesófilo.

COLONIZAÇÃO DO MESÓFILO FOLIAR:

Além da colonização dos vasos do xilema, em seções do limbo foliar da var. B-4362 exibindo sintomas iniciais da doença estria mosqueada, observou-se também que muitas cavidades sub-estomáticas foram colonizadas por estirpes de *H. rubrisubalbicans* e esta colonização estendeu-se através dos espaços intercelulares das células do mesófilo (Figuras 9A, 9B, 9C e 9E). Imunomarcagem específica com ouro utilizando anticorpos policlonais purificados confirmou a identidade da bactéria observada ao microscópio como *H. rubrisubalbicans* (Figuras 9A, 10A). A bactéria foi também observada na superfície foliar associada as células guarda do estômato em seções do limbo foliar em estágios iniciais da doença (Figura 9C), sugerindo que a bactéria poderia infectar a planta via abertura estomática. Em adição, em estágios mais avançados da doença, quando um grande número de bactérias ocupavam os espaços intercelulares, comprimindo as células do mesófilo (Figura 9F), foram observadas colônias de bactérias emergindo da abertura estomática (Figura 9D). Estas colônias emergentes na superfície envolvidas em uma substância mucilagínosa, são provavelmente inóculo secundário para disseminação das bactérias para novas regiões da folha.

Outra possibilidade de disseminação no mesófilo resulta do escape de bactérias colonizando o xilema para regiões do mesófilo adjacentes ao vaso (MANSVELT & HATTINGH, 1989; BRETSCHEIDER et al., 1989). Desse modo, a presença de *H. rubrisubalbicans* na superfície foliar da var. B-4362 sugere que a distribuição da bactéria via corrente transpiratória pode não ter sido o único meio de disseminação da doença no interior das folhas da planta. Em ambas variedades foi observada colonização da câmara sub-estomática, indicando que a abertura estomática pode ser uma “via em mão dupla” para *H. rubrisubalbicans*. Estômatos são via de infecção para bactérias diazotróficas associadas a gramíneas, tal como *Pantoea agglomerans* em trigo (*Triticum aestivum*) (RUPPEL et al., 1992) e outras bactérias patogênicas e não patogênicas (MANSVELT & HATTINGH, 1989; SPRENT & JAMES, 1995; BOHER et al., 1995).

Nos estágios iniciais da doença na var. B-4362, não foi observada degradação das bactérias presentes nos espaços intercelulares das células do mesófilo (Figuras 9C, 9E, 9F) e as bactérias reagiram prontamente com anticorpos produzidos contra *H. rubrisubalbicans* (Figuras 10A, 10B). A ligação das partículas de ouro após imunomarcação sugeriram que localização dos sítios de ligação dos anticorpos a bactéria é principalmente o muco extracelular, o qual foi observado envolvendo a célula bacteriana ou foi liberado dentro dos espaços intercelulares das células do mesófilo (Figura 10B). Em adição, nestes estágios iniciais de infecção, existiu alguma liberação de gomas pela planta hospedeira nos espaços intercelulares das células do mesófilo como observado em vasos do xilema infectados, e a despeito da multiplicação da bactéria no mesófilo, não existiu uma deformação óbvia das células do mesófilo, as quais pareciam saudáveis (Figura 9E). Também, aparentemente não foi observada infecção intracelular de células do tecido foliar, entretanto algumas estruturas contendo bactérias envolvidas por depósito de parede celular, similares em aparência a cordões de infecção que ocorrem nas interações entre leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium* (BREWIN, 1991) foram observadas no interior de células parenquimatosas do mesófilo (Figura 9E). Estas estruturas foram similares aquelas observadas por JAMES et al. (1994) em raízes de cana-de-açúcar infectadas por *Acetobacter*

FIGURA 9

Figura 9A: FMO de seção transversal do mesófilo foliar de cana-de-açúcar cv. B-4362 aos 20 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans*. A bactéria (b) coloniza a câmara sub-estomática e se estende através dos espaços intercelulares das células do mesófilo. Seções incubadas com anticorpos específicos para *H. rubrisubalbicans* e imunomarcadas com ouro, seguidas de enriquecimento com prata (precipitado escuro). Estômatos (setas), barra = 20 μm .

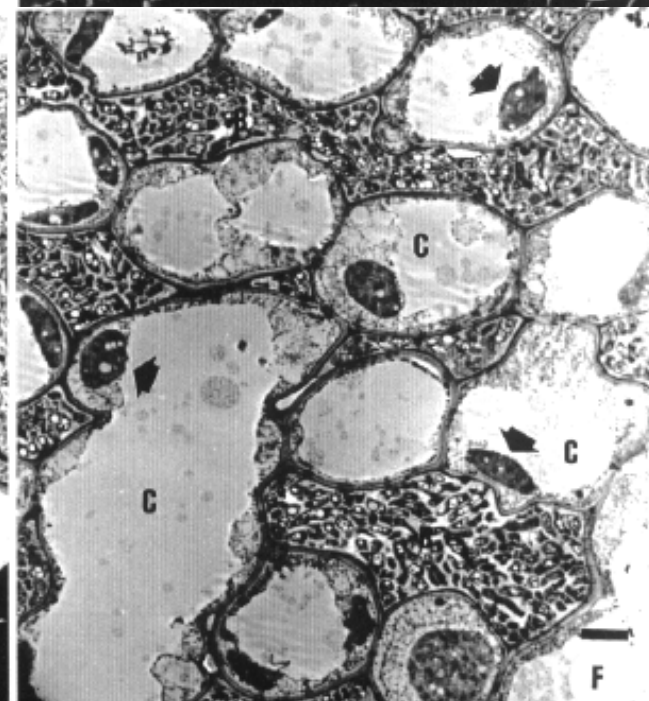
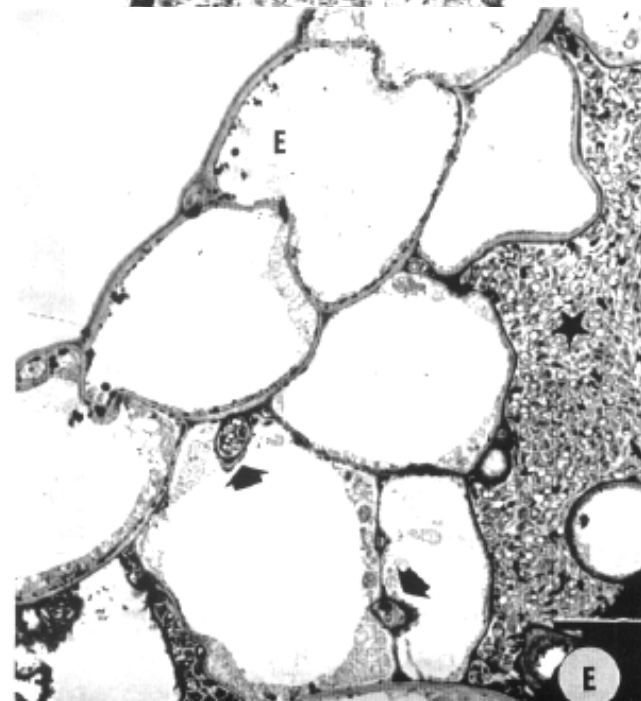
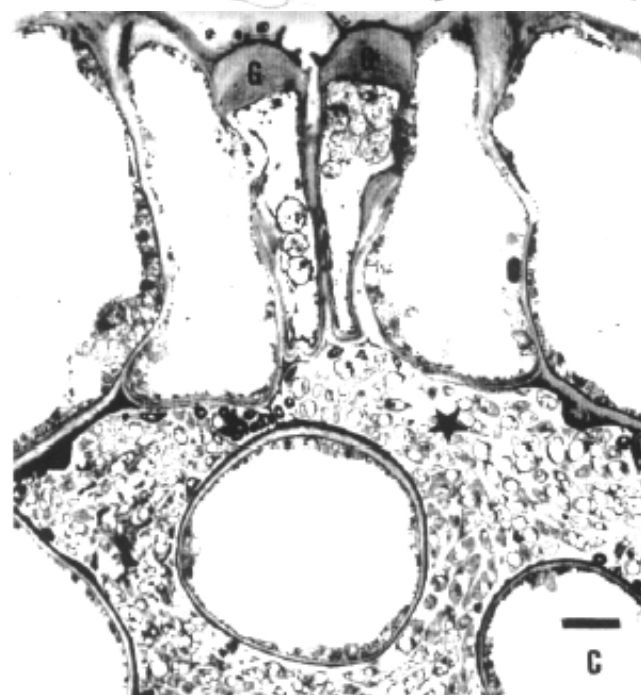
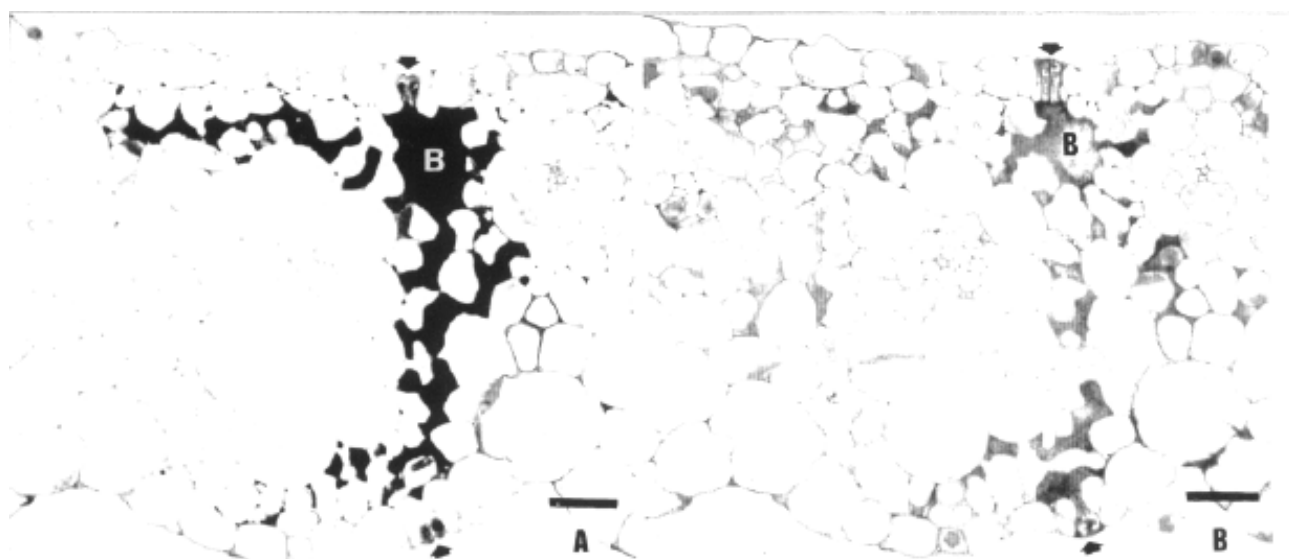
Figura 9B: Seção idêntica a anterior. Porém incubada com antisoro pré-imune substituindo o anti-soro *H. rubrisubalbicans* e o anti-nitrogenase (controle). Notar ausência de manchação. Estômatos (setas), bactéria (B), barra = 20 μm .

Figura 9C: FMET de um estômato da folha de cana-de-açúcar cv. B-4362, 20 dias após a inoculação com *H. rubrisubalbicans*. A câmara sub-estomática apresenta grande número de bactérias (★) e existem algumas bactérias no exterior das células guarda (G) (setas), barra = 2 μm .

Figura 9D: Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura (FMEV) da superfície do limbo foliar de cana-de-açúcar cv. B-4362 em estágio avançado da doença. Colônias bacterianas estão emergindo das aberturas estomáticas (setas) e colonizando a superfície (★). Mesófilo colonizado (D), barra = 10 μm .

Figura 9E: FMET de *H. rubrisubalbicans* (★) nos espaços intercelulares do mesófilo de cana-de-açúcar cv. B-4362. Células da epiderme (E) aparecem saudáveis. Notar estruturas similares a cordões de infecção (setas), barra = 5 μm .

Figura 9F: FMET dos espaços intercelulares do mesófilo da cv. B-4362 densamente colonizados por *H. rubrisubalbicans*. A bactéria exerce pressão nas células do hospedeiro (C), que apresentam-se distorcidas e com expansão do meato celular, que mesmo assim aparentam estar saudáveis (setas), barra = 2 μm .



diazotrophicus e aquelas vistas em raízes de batata (*Solanum tuberosum*) inoculadas com *Rhizobium* (SPENCER et al., 1994). Em adição, nos estágios iniciais de desenvolvimento da doença na var. B-4362, o componente II da nitrogenase (dinitrogenase redutase) foi localizado por imunomarcação com ouro em *H. rubrisubalbicans* colonizando os espaços intercelulares das células do mesófilo (Figura 10C). Entretanto, a imunomarcação foi observada somente em bactérias presentes no interior de grandes colônias em estágios iniciais de infecção, antes que uma forte resposta de defesa da planta hospedeira fosse eliciada. É importante destacar que em nenhuma das seções controle utilizadas para imunomarcação houve marcação significativa com ouro (Figura 10D).

Em estágios mais avançados da enfermidade na var. B-4362, caracterizado visualmente por clorose do mesófilo seguida de necrose, foi observada extensiva colonização dos espaços intercelulares das células do mesófilo, resultando na expansão dos espaços intercelulares e subsequente compressão das células da planta hospedeira que apesar de ainda permanecerem saudáveis, apresentavam alguns sinais de degradação celular (Figura 9F). Com a evolução da degradação, bactérias presentes nos espaços intercelulares foram embebidas dentro de uma matrix fibrilar e muitas bactérias em processo de lise foram observadas no interior das células do hospedeiro em processo de degradação, exibindo uma forte expressão dos mecanismos de defesa como a produção de gomas nos espaços intercelulares, coagulação citoplasmática e acumulação de polifénols (Figuras 10E, 10F). Imunomarcação com ouro mostrou que nestas regiões em degradação, o muco bacteriano encontrava-se disperso dentro da célula hospedeira invadida (Figura 10E), fazendo parte da matrix envolvendo bactérias em processo de lise (Figura 10F).

Na var. SP 70-1143 poucas folhas foram visivelmente colonizadas por estirpes *H. rubrisubalbicans*, sendo mais difícil localizar pontos de infecção, com exceção de alguns vasos do xilema e mesófilo próximo aos pontos de inoculação, onde algumas estrias vermelhas foram visíveis. Estes sítios de infecção foram muito localizados. A figura 11A ilustra a máxima extensão de infecção dos espaços intercelulares das células do mesófilo da var. SP 70-1143 aos 20 dias

FIGURA 10

Figuras 10A-F: FMET de *H. rubrisubalbicans* nos espaços intercelulares das células do mesófilo de folhas de cana-de-açúcar cv. B-4362.

Figura 10A: Bactéria (B) nos estágios iniciais da doença estria mosqueada. Imunomarcada com ouro após incubação com anticorpos policlonais específicos. Notar partículas de ouro ligadas a superfície da bactéria, barra = 500 nm.

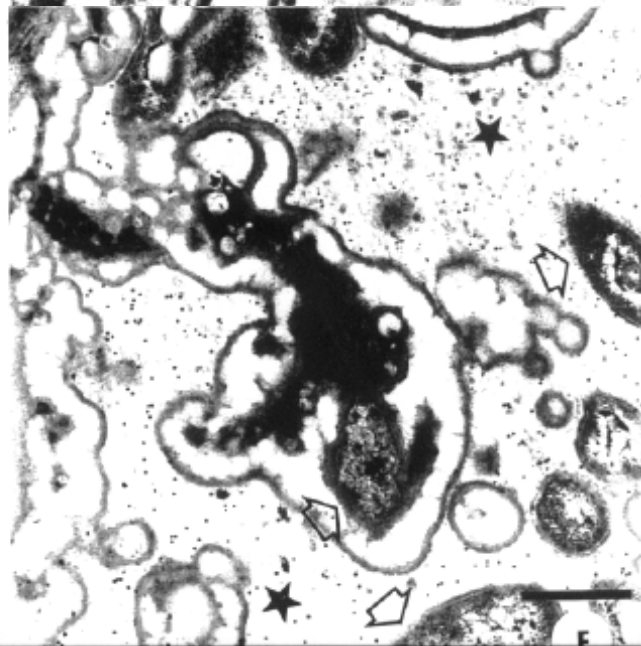
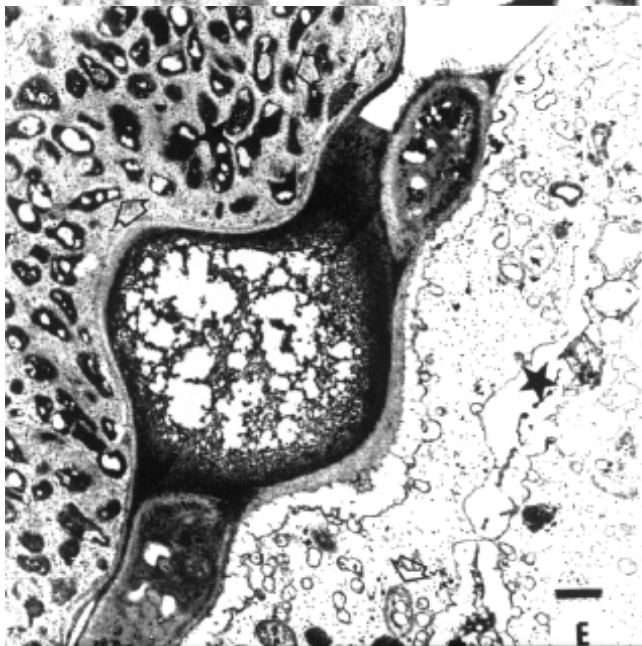
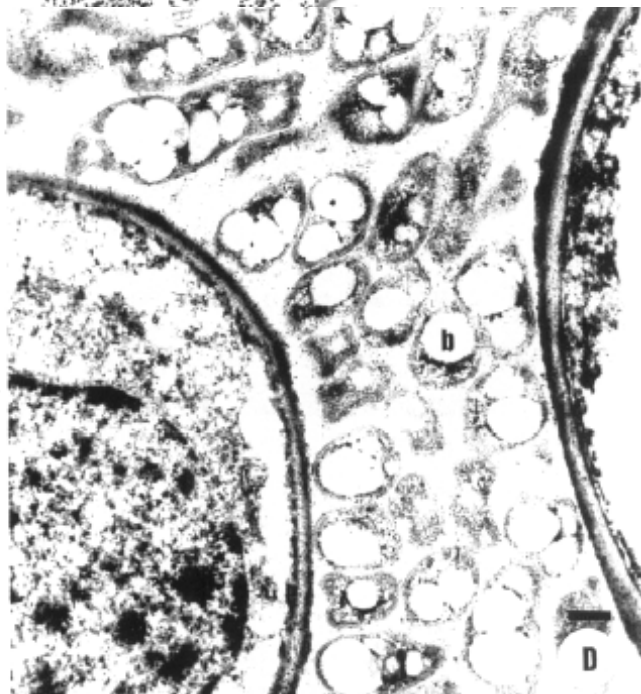
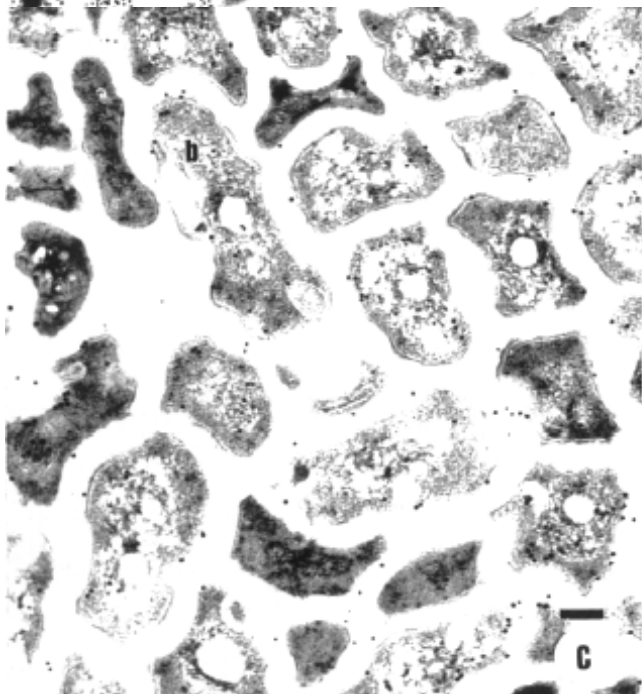
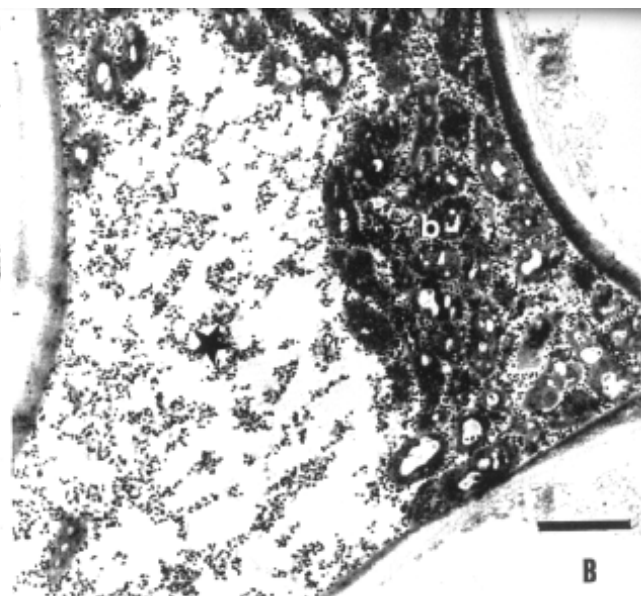
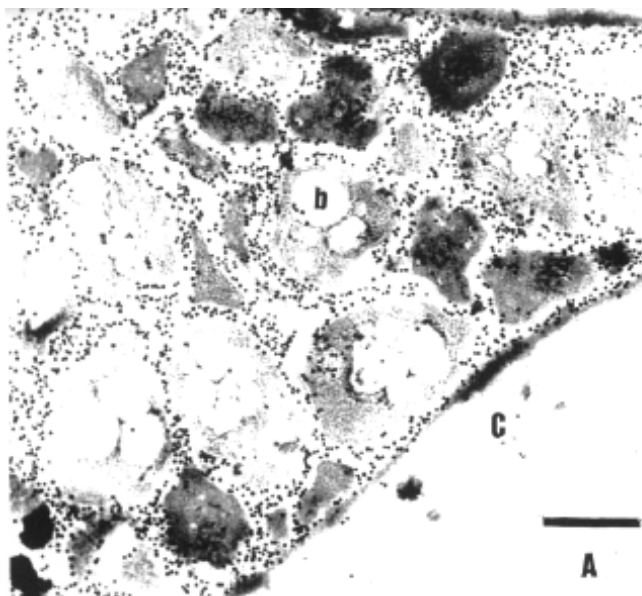
Figura 10B: Bactérias colonizando os espaços intercelulares (b), associada a produção de muco liberado pela bactéria (★). A superfície da bactéria e o muco extracelular são reconhecidos pelos anticorpos, barra = 1 μ m.

Figura 10C: *H. rubrisubalbicans* no interior de colônias grandes em estágios iniciais da doença. A bactéria (b) foi imunomarcada com ouro, após a incubação com anticorpos contra a sub-unidade II da nitrogenase, barra = 200 nm.

Figura 10D: Seção similar a anterior, cujo anticorpo primário foi omitido (controle). Notar ausência de marcação com ouro na bactéria (b), barra = 500 nm.

Figura 10E: Células do mesófilo em estágios avançados da doença (*). As células estão distorcidas e contém bactérias (seta), com a bactéria e muito do conteúdo da célula imunomarcado com ouro. Observar grande quantidade de muco liberado na célula invadida, bar = 1 μ m.

Figura 10F: Bactéria intracelular (setas) sendo atacada pela célula hospedeira nos estágios avançados da doença. Esta seção foi imunomarcada, sendo aparente a liberação de muco extracelular dentro da célula (*), barra = 500 nm.



após a inoculação. Também neste caso, as bactérias foram vistas na superfície foliar próxima as células guarda (Figura 11B). Abaixo do estômato, a infecção bacteriana estendeu-se da câmara sub-estomática para os espaços intercelulares das células do mesófilo de modo mais restrito quando comparada a var. B-4362, sendo evidente já aos 7 dias após a inoculação a morte localizada de células da planta hospedeira, com a acumulação de compostos fenólicos e coagulação do conteúdo citoplasmático (Figura 11). Em adição, gomas e géis foram encontrados nos meatos celulares do mesófilo e na câmara sub-estomática (Figura 11A). Tomados juntos, estes são indicativo de uma clássica resposta de defesa observada em muitas interações entre patógenos e plantas (WALLIS, 1977; SEQUEIRA et al., 1977; OUCHI, 1983; BRETSCHNEIDER et al., 1989; YOUNG et al., 1995). Observações ao MET confirmaram a expressão destas respostas de defesa da planta com liberação de material elétron denso nos espaços intercelulares próximo ou envolvendo as bactérias, e como dentro do xilema da var. SP 70-1143, frequentemente confinando as bactérias em colônias discretas encapsuladas nos espaços intercelulares das células do mesófilo (Figuras 11B, 11C, 11D, 11E).

Apesar de não existirem diferenças quanto a localização das bactérias, a interação resistente entre a var. SP 70-1143 x *H. rubrisubalbicans* contrasta bastante com os estágios iniciais da interação suscetível entre a var. B-4362 x *H. rubrisubalbicans*, uma vez que no segundo caso a bactéria multiplica-se livremente no interior dos vasos, nos espaços intercelulares das células do mesófilo e cavidade estomática sem elicitar os mecanismos de defesa ou causar danos as células do hospedeiro. Somente em estágios mais avançados da doença, onde clorose extensiva já se desenvolveu, uma resposta de defesa é eliciada no sentido de destruir as bactérias a conter o avanço da infecção. Em muitos aspectos, a progressão da interação susceptível aqui apresentada assemelha-se ao desenvolvimento de uma típica interação compatível entre a bactéria fitopatogênica e sua planta hospedeira, tal como *Pseudomonas* (MANSVELT & HATTINGH, 1989), *Xanthomonas* (BRETSCHNEIDER et al., 1989; BOHER et al., 1995) e *Corynebacterium* (WALLIS, 1977).

FIGURA 11

Figura 11A: FMO de seção transversal de folha de cana-de-açúcar cv. SP 70-1143 aos 20 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans*. A bactéria a câmara sub-estomática (seta grande) em ambos lados da folha, porém a colonização não é tão densa como na cv. B-4362 (fig. 9A). Esta seção foi imunomarcada com ouro e revelada com prata. Estômatos (setas pequenas), barra = 20 µm.

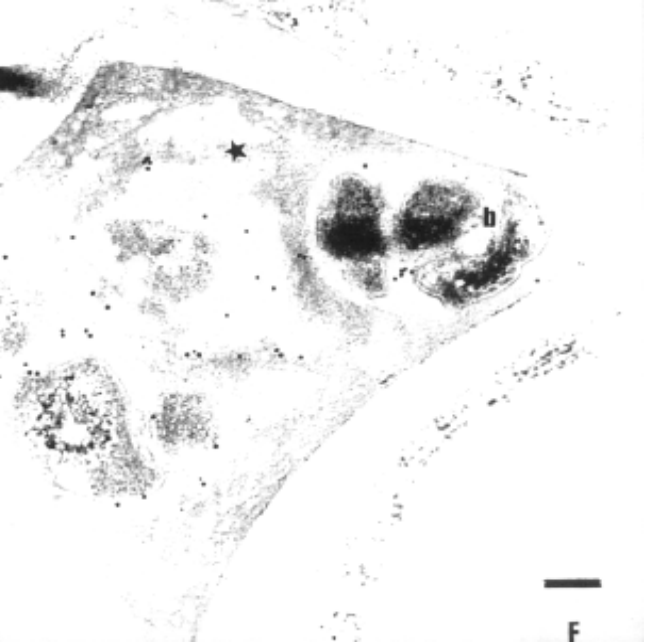
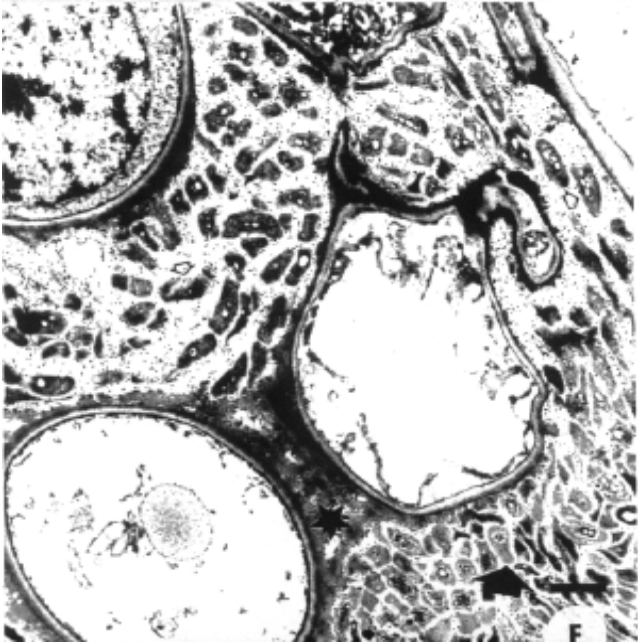
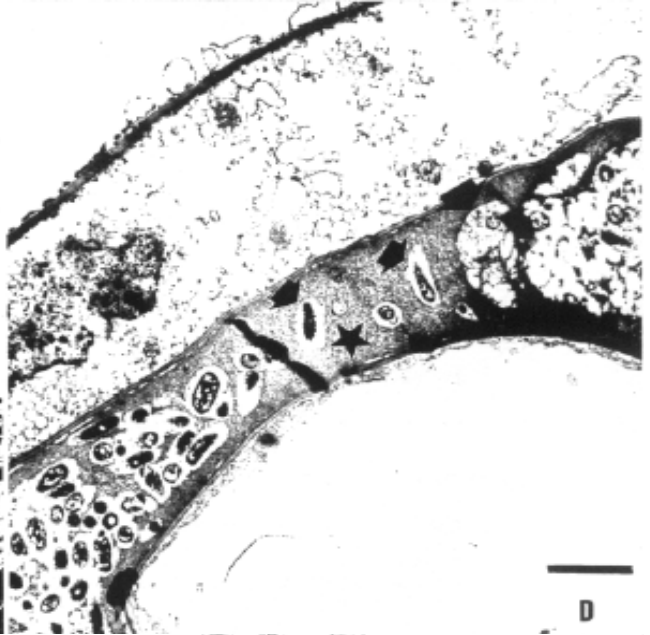
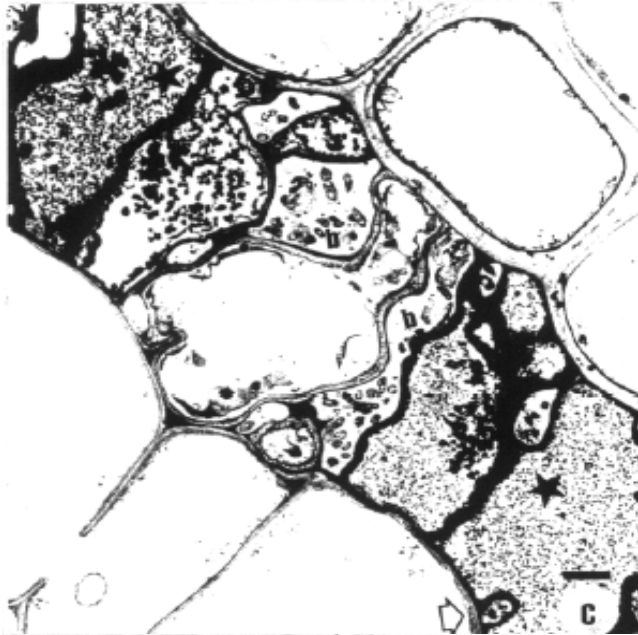
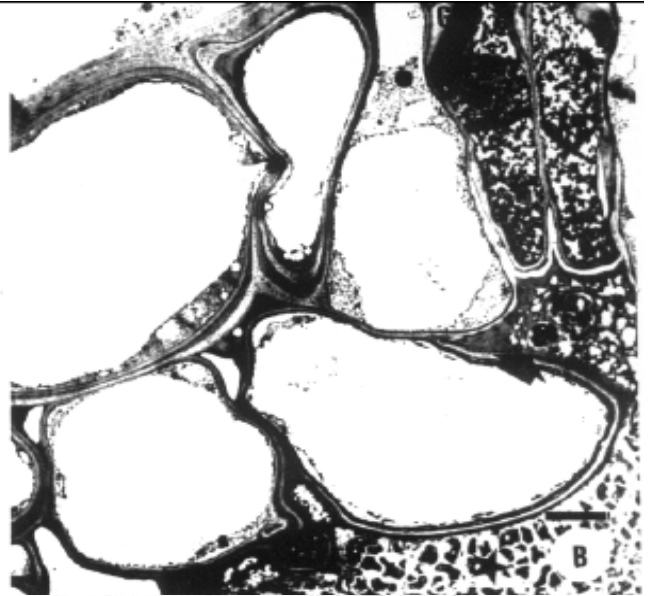
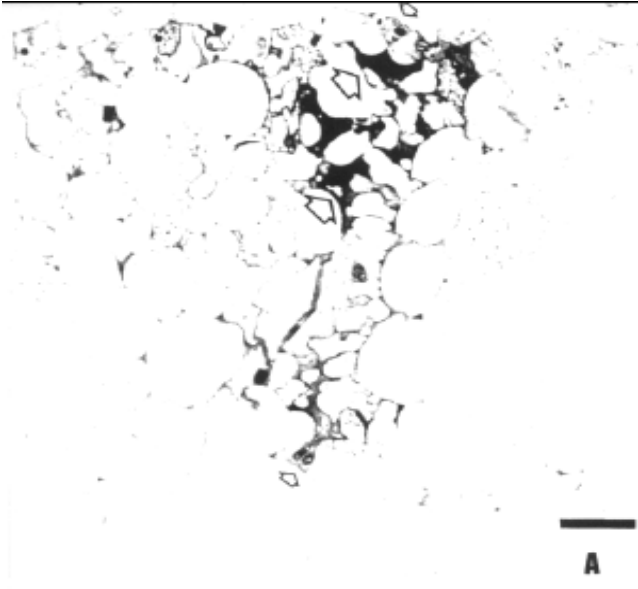
Figura 11B: FMET de um estômato de folhas de cana-de-açúcar cv. SP 70-1143. A câmara sub-estomática contém bactérias (★) e material eletro-denso (seta). Existem algumas bactérias na superfície exterior da folha (setas pequenas). Células guarda (G), barra = 2 µm.

Figura 11C: FMET de seção do limbo foliar da cv. SP 70-1143 aos 20 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans*. A bactéria (b) está confinada nos espaços celulares entre duas células mortas ou morrendo, as quais contém materiais eletrôn-densos (★). Algumas bactérias estão tentando invadir o interior da célula (seta), barra = 2 µm.

Figura 11D: FMET de seção do limbo foliar da cv. SP 70-1143 aos 20 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans* (setas pequenas) presente nos espaços intercelulares envolvidas por material eletrôn-denso (★), algumas bactérias em processo de lise (setas grandes), barra = 5 µm.

Figura 11E: FMET de seção do limbo foliar da cv. SP 70-1143 aos 20 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans* (setas) presente nos espaços intercelulares e gomas(★). A bactéria e o muco extracelular foram imunomarcados com ouro, barra = 1 µm.

Figura 11F: FMET de seção do limbo foliar da cv. SP 70-1143 aos 20 d.a.i. com *H. rubrisubalbicans* presente nos espaços intercelulares. A bactéria (b) esta encapsulada por material eletrôn-denso (★). Observar a baixa densidade de imunomarcção com partículas de ouro, barra = 200nm.



Em ambas variedades, independente de seu grau de resistência, existiu um decréscimo significativo ($p < 0,01$) no número de cloroplastos presentes no interior das células parenquimatosas da bainha vascular de folhas inoculadas com estirpes de *H. rubrisubalbicans* comparada a não inoculadas (Tabela 4).

IMUNOMARCAÇÃO COMPARATIVA NAS VARIEDADES COM DIFERENTES GRAUS DE SUSCETIBILIDADE, O PAPEL DO EPS

A bactéria *H. rubrisubalbicans* presente nos espaços intercelulares das células do mesófilo da variedade susceptível a estria mosqueada (B-4362) foi mais intensivamente imunomarcada com ouro do que a variedade resistente (SP70-1143) sugerindo que a produção de muco pela bactéria, reconhecido pelos anticorpos foi grandemente aumentada na interação susceptível (Figura 10A, 11F). Omuco bacteriano provavelmente contém exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS) tal como determinado como os principais componentes antigênicos do soro utilizado no presente estudo (nesta tese). Estes polissacarídeos de superfície são sítios de ligação para reação antígeno-anticorpo em muitos casos onde anticorpos são produzidos contra bactérias intactas (BREWIN et al., 1986; SCHLOTTER et al., 1992; HUREK et al., 1994; JAMES et al., 1994; BOHER et al., 1995).

Polissacarídeos da superfície tem sido considerados de extrema importância nos eventos iniciais de reconhecimento de bactérias por plantas, sendo em parte determinante na resposta da planta a infecção, particularmente na simbiose entre leguminosas a bactérias do gênero *Rhizobium* (BREWIN, 1991; PEROTTO et al., 1994; MCKHANN & HIRSH, 1994) e em interações fitopatogênicas (SEQUEIRA et al., 1977; OUCHI, 1983; GROSS & CODY, 1985; DJORDJEVIC et al., 1987; LEIGH & COPLIN, 1992; BOHER et al., 1995). No presente estudo, a bactéria na variedade sensível foi estimulada a produzir polissacarídeos de superfície, desse modo ocultado moléculas eliciadoras de reconhecimento e consequente resposta da planta hospedeira (SEQUEIRA, 1977; OUCHI, 1983; MELLOR & COLLINGE, 1995). A virulência em muitas espécies de *Pseudomonas* é diretamente relacionada com a produção de grande quantidade

de EPS (GROSS & CODY, 1985; LEIGH & COPLIN, 1992). BOHER et al. (1995) tem sugerido que EPS provê uma matriz de suporte para ação de enzimas de degradação da parede celular e LEIGH & COPLIN (1992) propuseram que devido a seu alto conteúdo de água, EPS podem ajudar a manter condições favoráveis para multiplicação bacteriana pelo aumento da umidade dentro dos espaços intercelulares associada a retenção de nutrientes liberados de células da planta danificadas. No presente estudo, a sugestão da ligação entre aumento de virulência e produção de EPS é suportada pela apreciável quantidade de muco marcado com partículas de ouro envolvendo a bactéria colonizando os espaços intercelulares das células do mesófilo da variedade B-4362, contrastada com a interação resistente, onde relativamente menos marcação foi observada. Esta menor marcação pode ser devido a baixa produção de EPS mediado por algum mecanismo não conhecido do hospedeiro, e/ou menos provavelmente pela concentração elevada de goma produzida pela planta, a qual pode reduzir a sensibilidade de métodos imunológicos de detecção de patógenos que colonizam cana-de-açúcar (HARRISON & DAVIS, 1988). A contagem de partículas de ouro associadas a *H. rubrisubalbicans* colonizando os espaços intercelulares das células do mesófilo de variedades B-4362, mostrou um incremento estatisticamente significativo ($p < 0,01$) de 5 vezes o número de partículas de ouro na interação com a var. SP 70-1143 (Tabela 5) confirmando as observações acima discutidas. Em adição, o anticorpo reconheceu o muco extracelular da bactéria intacta e também material liberado dentro dos espaços intercelulares das células do mesófilo contendo bactérias, como observado para a var. B-4362 nos estágios iniciais e finais da evolução da doença (Figura 10B, 10E, 10F).

Na var. SP 70-1143 e nos estágios finais da doença na var. B-4362, o muco da bactéria pareceu reagir com gomas produzidas pela planta. No entanto, a bactéria foi raramente observada intacta ou sem material derivado da planta envolvendo a mesma. A liberação de polissacarídeos de superfície dentro dos espaços intercelulares das células do hospedeiro em ambas variedades infectadas com *H. rubrisubalbicans* é também interessante. Reação similar ocorreu também nos vasos do xilema de sorgo infectado com a mesma estirpe da bactéria, em

Tabela 4- Efeito da infecção por *H. rubrisubalbicans* (M4) no número de cloroplastos presentes na bainha vascular de folhas de cana-de-açúcar das variedades B-4362 e SP 70-1143 (média de 25 repetições para nervuras primárias e 50 repetições para nervuras secundárias).

	B-4362		SP 70-1143	
	Não-infectado	Infectado	Não-infectado	Infectado
Nervura 1 ^{ria}	52,6 ± 10,7	13,4 ± 6,6	54,5 ± 7,7	20,1 ± 15,7
Nervura 2 ^{ria}	42,8 ± 4,3	14,7 ± 5,3	50,1 ± 8,9	13,8 ± 8,3

médias diferem entre si ao nível de 1% pelo testes "t" de student.

Tabela 5- Número de partículas de ouro ligadas a bactéria *H. rubrisubalbicans* (M4) após imunomarcacão, colonizando os espaços intercelulares das células do mesófilo foliar de cana-de-açúcar das variedades B-4362 e SP 70-1143 (média de 10 repetições).

	B-4362	SP 70-1143
Nº de partículas / bactéria	103,6 ± 24,4	19,4 ± 12,8

* contagem em fotomicrografias de seções transversais da bactéria

plantas de “Kallar grass” infectadas com *Azoarcus* (HUREK et al., 1994) e em interações entre plantas e patógenos (OUCHI, 1983; GROSS & CODY, 1985; BOHER et al., 1995). Em “Kallar grass”, HUREK et al., (1994) sugeriram que o material de origem bacteriana imunomarcado com ouro interagiu com a matrix da planta. Isto ocorreu nos tecidos em estágio avançado da doença na var. B-4362 e nos eventos de resposta rápida na var. SP 70-1143. Entretanto, nos eventos iniciais da interação entre *H. rubrisubalbicans* e os tecidos da var. B-4362, os espaços intercelulares das células do mesófilo estavam colonizados pelas bactérias envolvidas em seu próprio muco, não sendo observado o envolvimento de nenhum material de origem da planta hospedeira. O equilíbrio na interação entre mucos e gomas derivados da bactéria e da planta parece ser de grande importância no estabelecimento de um relacionamento simbiótico ou parasítico entre a bactéria e a planta hospedeira (SEQUEIRA et al., 1977; DJORDJEVIC et al., 1987; BRETSCHNEIDER et al., 1988; BREWIN, 1991; MCKHANN & HIRSCH, 1994; YOUNG et al., 1995).

H. rubrisubalbicans colonizando os vasos do xilema de folhas de sorgo reagiu fortemente com anticorpos produzidos contra a bactéria, bem como observou-se liberação de apreciável quantidade de muco bacteriano imunomarcado com ouro no lúmen do vaso. A liberação de material contendo antígenos tem sido relatado em plantas de “Kallar grass” infectadas pelo diazotrófico *Azoarcus* (HUREK et al., 1994), plantas infectadas pelos fitopatógenos *Pseudomonas solanacearum* (GROSS & CODY, 1985) e *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (BOHER et al., 1995). Exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS) foram considerados abrigar os principais epítópos antigênicos do soro purificado utilizado no presente estudo. Estes componentes são, em muitos dos casos, apontados como os principais determinantes antigênicos contra bactérias (BREWIN et al., 1986; SCHLOTER et al., 1992; JAMES et al., 1994). Na interação com sorgo, *H. rubrisubalbicans* produziu relativamente grande quantidade de EPS/LPS, evitando desta forma o reconhecimento da planta e a expressão dos mecanismos de defesa contra invasão pela bactéria (SEQUEIRA et al., 1977; HARRISON & DAVIS, 1988;

PEROTTO et al., 1994; McKHANN & HIRSCH, 1994; MELLOR & COLLINGE, 1995). Comparando com *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae* não produziu muito EPS dentro dos vasos do xilema. Este fato subsidia a fato de *H. seropedicae* não ser uma bactéria virulenta, já que virulência tem sido ligada a alta produção de EPS (LEIGH & COPLIN, 1992; GROSS & CODY, 1985).

IMUNOMARCAÇÃO COM OURO PARA NITROGENASE:

Embora *Acefobacfer diazotrophicus* seja considerado o principal microrganismo responsável pelas taxas de fixação biológicas de nitrogênio (FBN) observadas em cana-de-açúcar (BODDEY et al., 1991; REIS et al., 1994; DONG et al., 1994) outros diazotróficos endofíticos podem ser bastante importantes (DÖBEREINER et al., 1993 e 1995; BODDEY, 1995). Estudos ecológicos tem demonstrado que ambas espécies de *Herbaspirillum* tem ampla dispersão em diferentes regiões e variedades brasileiras, ocorrendo endofiticamente na planta em números compatíveis aqueles observados para *Acetobacter diazotrophicus* (OLIVARES et al., 1996). No presente estudo de inoculação artificial de folhas de cana-de-açúcar foi demonstrado que *H. rubrisubalbicans* infecta rapidamente os tecidos da cana-de-açúcar e no caso da interação resistente, coloniza os vasos do xilema sem causar dano aparente a planta. Estas observações sugerem que o xilema seja o sítio de estabelecimento de *Herbaspirillum* em plantas adultas vegetando em condições de campo. Entretanto, outras regiões anatômicas como mesófilo e córtex não podem ser desconsideradas. O tecido xilemático tem sido sugerido ser um sítio possível para atividade de fixação de N_2 por diazotróficos endofíticos (JAMES et al., 1994; SPRENT & JAMES, 1995) baseado em observações ao microscópio (PATRIQUIN & DÖBEREINER, 1983; RUPPEL et al., 1992; OLIVARES et al., 1993; JAMES et al., 1994; HUREK et al., 1994; SCHLOTER et al., 1994), e pelo fato dos vasos do xilema serem locais fisiologicamente favoráveis a troca de metabolitos entre hospedeiro e os endófitos (SPRENT & JAMES, 1995). Em adição, vasos do xilema, sendo circundados por outros tecidos da planta, podem satisfazer os requerimentos para baixa pressão parcial de oxigênio, permitindo a expressão e o funcionamento da nitrogenase

(GALLON, 1992). Em ensaios de imunolocalização da nitrogenase na interação entre *H. rubrisubalbicans* e var. SP 70-1143 não ocorreu reação com anticorpos para o componente II da nitrogenase nos espaços intercelulares das células do mesófilo, o que indica a ausência de expressão da enzima neste local. Nos vasos do xilema a expressão da nitrogenase não foi investigada. Na variedade sensível, a dinitrogenase redutase foi detectada pela técnica de imuno-ouro no interior de colônias de *H. rubrisubalbicans* colonizando os espaços intercelulares das células do mesófilo (Figura IOC), porém nenhuma expressão ocorreu dentro dos vasos do metaxilema e protoxilema do limbo foliar de cana-de-açúcar, que pode ser em parte devido a variação temporal das concentrações de nitrogênio mineral na seiva xilemática que podem atingir valores inibitórios. Já em folhas de sorgo 5 dias após a inoculação com estirpes de *H. rubrisubalbicans*, a enzima nitrogenase foi imunolocalizada em colônias de bactérias presentes no interior dos vasos do xilema (Figura 4C), o que sugere que dentro do espaço intraxilemar, pelo menos por algum período de tempo, existem condições para a expressão da enzima. A expressão da dinitrogenase redutase em bactérias localizadas no interior de colônias presentes na cavidade sub-estomática e nos espaços intercelulares das células do mesófilo na var. B-4362 precedeu a expressão de mecanismos tardios de defesa da planta. Seria razoável assumir que no interior dessas colônias, o abaixamento da pO_2 devido as taxas de respiração (GALLON, 1992) e a ausência de nitrogênio derivado do hospedeiro permitiram a expressão da enzima. Estas observações dos eventos iniciais do processo infeccioso de *H. rubrisubalbicans* em folhas de cana-de-açúcar da variedade sensível a estria mosqueada em que se estabelece-se uma pseudo-simbiose, podem fornecer pistas para o entendimento das condições necessárias a expressão da nitrogenase em interações não patogênicas, onde a combinação de uma estirpe específica de *Herbaspirillum* spp. e dada variedade da planta hospedeira tenham coevoluído para que a doença não ocorra e que permita que a nitrogenase seja expressa.

No presente estudo, *H. seropedicae* parece ser mais compatível com folhas de sorgo, já que aparentemente não eliciou nenhum mecanismo de defesa da planta hospedeira que pudesse restringir sua multiplicação no interior de folhas,

induzindo um RH apenas em planta de cana-de-açúcar. Além do mais, a bactéria produziu relativamente menos EPS comparada a *H. rubrisubalbicans* na interação com a var. B-4362, apresentando colônias bacterianas não tão grandes e em íntima relação com a parede dos vasos, que jamais obstruíram o lúmen dos mesmos. Este modelo de colonização parece mais compatível com uma situação de equilíbrio, onde a planta hospedeira exerce controle sobre a população bacteriana e que não são eliciadas respostas drásticas. A variabilidade de resposta (variando de efeitos patogênicos, passando por relações neutras a benéficas) a planta hospedeira e ao órgão da planta não parece surpreendente já que bactérias endofíticas tem evoluído para ocupar nichos específicos no interior dos tecidos da planta hospedeira sem eliciar respostas de defesa da planta que impeçam o sucesso no seu estabelecimento. Isto é corroborado por outro exemplo envolvendo *H. seropedicae* e cana-de-açúcar, no qual apesar da bactéria eliciar RH em folhas, o que impede sua colonização nos tecidos, em raízes e colmos a bactéria colonizou o córtex e os tecidos condutores, e nenhuma expressão de sintomas ou RH foi observada, ocorrendo ao contrario a promoção de efeitos benéficos nas raízes.

É provável que a associação entre estirpes de *Herbaspirillum* spp. e gramíneas seja não mais do tipo patogênica e esteja ocorrendo uma coevolução no sentido de compatibilizar macro e microsimbionte para expressão de efeitos benéficos. Tais especulações são subsidiadas pelo caráter endofítico da interação, associada a inexistência de efeitos patogênicos em condições naturais em muitas variedades de cana-de-açúcar (PIMENTEL et al., 1991; OLIVARES et al., 1996), arroz (BALDANI et al., 1992) e outras culturas.

CONCLUSÕES

1. Estirpes de *H. rubrisubalbicans*, em ensaios de inoculação artificial, induziram sintomas típicas da doença estria mosqueada em cana-de-açúcar var. B-4362 (susceptível a doença), o que não ocorreu na variedade SP 70-1143, considerada resistente;
2. Estirpes de *H. seropedicae*, em ensaios de inoculação artificial, induziram uma resposta hipersensível em folhas de ambas variedades testadas, não incitando sintomas de estria mosqueada;
3. Utilizando sorgo var. BR 303 e BR005 como planta indicadora, todas as estirpes de *H. rubrisubalbicans* induziram sintomas de estria vermelha, enquanto que *H. seropedicae* não induziu sintomas;
4. Todas as bactérias inoculadas foram reisoladas até 20 dias após a inoculação de segmentos do limbo foliar próximos ao ponto de inoculação;
5. Estudos ao microscópio, relativos ao padrão de colonização de folhas das variedades contrastantes quanto a sensibilidade a estria mosqueada revelaram diferenças quanto a localização das bactérias no tecido foliar, na densidade de

bactérias no interior da planta e no tempo de resposta da planta a invasão pela bactéria. Estes fatores foram função direta da combinação entre o genótipo da planta e da espécie de *Herbaspirillum*.

6. Maior quantidade de exopolissacarídeos foi produzido por *H. rubrisubalbicans* infectando os tecidos foliares da var. B-4362 (sensível), quando comparada a var. SP 70-1143 (resistente);

7. Em plantas de sorgo e cana-de-açúcar, a resposta de defesa da planta a invasão pela bactéria, tanto no interior dos vasos, quanto nos espaços intercelulares das células do mesófilo, esta ligada a produção de gomas.

8. A enzima nitrogenase foi imunolocalizada em plantas de sorgo e cana-de-açúcar var. B-4362 inoculadas com *H. rubtisubalbicans*, apenas nos estágios iniciais da interação com a planta e em células da bactéria no centro de microcolônias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIST, J.R. Mechanically induced wall appositions of plant cells can prevent penetration by a parasitic fungus, **Science**, Washington, v. 197, p. 568-570, 1977.
- ALLISON, A.V. & SHALLA, T.A. The ultrastructure of local lesions induced by potato virus X: a sequence of cytological events in the course of infection. **Phytopathology**, St. Paul, v. 64, p.783-793, 1974.
- AMARAL, E. S.; OLIVARES, F. L. & BALDANI, J. I. Symbiotic Performance and Survival of Plasmid-Cured Derivatives of the Rhizobial Strain BR 855 in Soil Under Heat Stress. International Symposium on Sustainable Agriculture - **The Role of Biological Nitrogen Fixation**, Programme and Abstracts, p. 104-105, Angra dos Reis - Rio de Janeiro - Brasil. November 26th - December 1st 1995.
- ANDERSON, A.B. & JASALAVICH, C. Agglutination of pseudomonad cells by plant products. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 15 , p. 149-159, 1978.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HORSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M. & DÖBEREINER, J. Inclusion of "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, within the genus *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, p. 802-810, 1996.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F. & DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 65-73, 1992.

- BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Seropédica, UFRRJ, 1996, 234 p. **Tese de Doutorado.**
- BATEMAN, D.F. Plant cell wall hydrolysis by pathogens. In: **Biochemistry Aspects of Plant-Parasite Relationship**, threlfall, chapter 5, p. 73-103, 1976.
- BECKMAM, C.H.; MUELLER, W.C. & TESSIER, B.J. Recognition and callose deposition in response to vascular infection in fusarium-wilt resistant or susceptible tomato plants. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 20, p. 1-10, 1982.
- BECKMAM, C.H.; VERDIER, P.A. & MUELLER, W.C. A system of defence in depth provided by vascular parenchyma cells of tomato in response to vascular infection with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, race 1. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 34, p. 227-239, 1989.
- BESTWICK, C.S.; BENNETT, M.H. & MANSFIELD, J.W. Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reactions in lettuce. **Plant Physiology**, Rochville, v. 108, p. 503-516, 1995.
- BINNS, A.N. & THOMASHOW, M.F. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 42, p. 575-606, 1988.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. & DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 137, p. 111-117, 1991.
- BODDEY, R.M. Biological nitrogen fixation in sugar cane: A key to energetically viable biofuel production. *Critical Review in Plant Science*, Boca Raton, v. 14, p. 263-279, 1995.

- BOHER, B.; KPEMOUA, K.; NICOLE, M.; LUISETTI, J. & GEIGER, J.P. Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihofis*: cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. **Phytopathology**, St. Paul, v. 85, p. 777-788, 1995.
- BOCCARA, M.; DIOLEZ, A.; ROUVE, M. & KOTOUJANSKY, A. The role of individual pectate lyases of *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 in pathogenicity on saint paulia plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 33, p. 95-104, 1988.
- BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L. & DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 195-209, 1995.
- BOSTECK, R.M.; LAINE, M.R.A. & KUC, J. Eico-sapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in the potato. **Science**, Washington, v. 212, p. 67-69, 1982.
- BRETSCHNEIDER, K.E.; GONELLA, M.P. & ROBESON, D.J. A comparative light and electron microscopical study of compatible and incompatible interactions between *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and cabbage (*Brassica oleracea*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 34, p. 285-297, 1989.
- BREWIN, N.J. Development of the legume root nodule. **Annual Reviews of Cell Biology**, Palo Alto, v. 7, p. 191-226, 1991.
- BREWIN, N.J.; WOOD, E.A.; LARKINS, A.P.; GALFRE, G.; BUTCHER, G.W. Analysis of lipopolysaccharide from root nodule bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* using monoclonal antibodies. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v. 132, p. 1959-1968, 1986.
- BUDDENHAGEN, I. & KELMAN, A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 2, p. 203-230, 1964.

- CASSAB, G.I. & VARNER, J.E. Cell plant proteins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 39, p. 321-353, 1993.
- CHRISTOPHER, W.N. & EDGERTON, C.W. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. **Journal Agricultural Research**, Queensland, v. 41, p. 259, 1982.
- COOPER, R.M. The mechanisms and significance of enzymatic degradation of host cell wall by parasites. In: **Biochemical Plant Pathology**, (ed. J. A. Callow) p. 101-135, (Jonh Wiley: Chichester), 1983.
- DALY, J.M. The role of recognition in plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 22, p. 273-307, 1984.
- DAUB, M.E. & HAGEDORN, D.J. Resistance of *Phaseolus* line WBR 133 to *Pseudomonas syringae*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 69, p. 946-951, 1979.
- DAVIS, K.R.; LYON, G.D.; DARVILL, A.G. & ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interaction. XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell fragments. **Plant Physiology**, Rockville, v. 74, p. 52-60, 1984.
- DE ARAUJO, J.S.P. Ação antagônica de estirpes avirulentas de *Pseudomonas solanacearum* a isolados virulentos da mesma espécie. **XXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Campo Grande - MS, Suplemento, v. 21, Resumo n. 54, p. 343, 1996.
- DELANEY, T.P.; UKNES, SP 70-1143.; VERNOOIJ, B.; FRIEDRICH, L.; WEYMANN, K.; NEGROTTO, D.; GAFFNEY, T.; GUT-RELLA, M.; KESSMANN, H. WARD, E. & RYALS, J. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. **Science**, Washington, v. 226, p. 1247-1250, 1994.
- DJORDJEVIC, M.A.; GABRIEL, D.W. & ROLFE, B.G. *Rhizobium*-the refined parasite of legumes. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 145-168, 1987.

- DÖBEREINER, J.; REIS, V.M.; PAULA, M.A. & OLIVARES, F.L. Endophytic diazotrophs in sugar cane, cereals and tuber plants. In: **New horizons in nitrogen fixation**. PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. (Eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 671-676, 1993.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L. & REIS, V.M. Endophytic diazotrophs: The key to graminaceous plants. In: **Nitrogen Fixation with Non-Legumes**, (N.A. Hegazi, M. Fayez and M. Monib, Eds.), p. 395-408. American University in Cairo Press, Cairo, Egypt, 1994.
- DONG, Z.; CANNY, M.J.; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E. & RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. **Plant Physiology**, Rochville, v. 105, p. 1139-1147, 1994.
- DURBIN, R.D. Site of action of disease determinants in relation to symptom expression. In: ASADA, Y.; BUSCHNELL, W.R.; OUCHI, S. & VANCE, C.P. **Plant Infection. The Physiological and Biochemical Basis**. Ed Japanese Science Society Press, Tokyo, p. 15-25, 1982.
- EIRA, A.P. Fatores que influem na triagem das variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) ao *Fusarium moliniforme* Sheldon, agente causal do "Pokkah Boeng". F.C.M.B.B., Botucatu, SP, 66p, **Tese de Doutor em Ciência**, 1972.
- EL-BANOBY, F.E. & RUDOLPH, K. Induction of water-soaking in plant leaves by extracellular polysaccharides from phytopathogenic pseudomonads and xanthomonads. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 15, p. 341-349, 1979.
- ELKINS, D.M. Growth regulating chemicals for turf and other grasses, In: **Plant Growth Regulation Chemicals**, v. 2, Nickell, L.G., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, p. 113, 1982.
- ELSTNER, E.F. Oxygen activation and oxygen toxicity. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 33, p. 73-96, 1982.

- ESQUERRE-TUGAYE, M.T. & LAMPORT, T.A. Cell surfaces in plant microorganism interactions. I. A structural investigation of cell wall hydroxyproline-rich glycoproteins which accumulates in fungus-infected plants. **Plant Physiology**, Washington, v. 69, p. 314-319, 1979.
- FLOR, H. Current status of gene-for-gene concept. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 9, p. 275-296, 1971.
- FRITZ, F. Beitrage zur Pathologie der Zellmembran. **Z. Pflanzenkr**, v.47, p. 532-541, 1937.
- FRY, C.S. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 46, p. 497-520, 1995.
- GABRIEL, D.W. & ROLFE, B.G. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 365-91, 1990.
- GALLI, F.; CARVALHO, P.C.T.; TOKESHI, H.; BALMER, F.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.; SALGADO, C.L.; KRUGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N. & BERGAMIN, F.A. **Manual de fitopatologia : Doenças de plantas cultivadas**, Ed. Agronômica Ceres, 2ª ed., vol. 2, São Paulo, 1980.
- GALLON, J.R. Reconciling the incompatible: N_2 fixation and O_2 . **New Phytologist**, London, v. 122, p. 571-609, 1992.
- GIGLIOTI, E.A.; FREITAS, J.C. & TOKESHI, H. Controle da galha da coroa em roseira por *Agrobacterium radiobacter* estirpe K84. **XXIX Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, Campo Grande - MS, Suplemento, v. 21, Resumo n. 6, p. 334, 1996.
- GROSS, D.C. & CODY, Y.S. Mechanisms of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 31, p.403-410, 1985.

- HALE, C.N. & WILKIE, J.P. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. New **Zeland Journal of Agriculture Research**, New Zeland, v. 15, p. 448-456, 1972a.
- HALE, C.N. & WILKIE, J.P. Bacterial leaf stripe of sorghum in New Zeland. New **Zeland Journal of Agriculture Research**, New Zeland, v. 15, p. 457-460, 1972b.
- HAMMERESCHMIDT, R.; LAMPORT, D.T.A. & MULDON, E.R. Cell wall hydroxyproline enhancement and lignin deposition as a early event in the resistance of cucumber to *Clamidorporium cucumerium*. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 24. p. 43-47, 1984.
- HARRISON, N.A. & DAVIS, M.J. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon-stuning disease. **Phytopathology**, St. Paul, v. 78, p. 722-727, 1988.
- HEATH, M.C. Insoluble silicon in necrotic cowpea cells following infection with an incompatible isolate of the cowpea rust fungus. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 19, p. 273-276, 1981.
- HOGUE, R. & ASSELIN, A. Detection of 10 additional pathogenesis-related (b) proteins in intracellular fluid extract from stressed "Xanthi-nc" tobacco leaf tissue. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa v. 65, p. 476, 1987.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, p. 339-364, 1994.
- HUREK, T., REINHOLD-HUREK, B.; VAN MONTAGU, M. & KELLENBERGER, E. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 1913-1923, 1994.
- JAMES, E.K; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, p. 757-766, 1994.

- JONES, T.M.; ANDERSON, A.J. & ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interaction IV. Studies on the polysaccharide-degrading enzymes secreted by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 2, 153-166, 1972.
- KAO, J. & DAMANN, K.E. "In situ" localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting of sugar cane. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 58, p. 310-315, 1980.
- KAUFFMANN, S.; LEGRAND, M.; GEOFFROY, P. & FRITIG, B. Biological function of "pathogenesis-related" proteins. Four PR-proteins have β -1, 3-glucanase activity, **EMBO Journal**, Oxford, v. 6, p. 3209, 1987.
- KEEN, N.T. & LEGRAND, M. Surface glycoproteins: evidence that they may function as race specific phytoalexin elicitors of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 17, p.175-192, 1980.
- KLEMENT, Z. Hypersensitivity. In: **Phytopathogenic Prokaryotes**, v. 2, M.S. MOUNT & G.H. LACY, eds., Academic Press, New York, p. 149-177, 1982.
- KLOTZ, M.G. & HUTCHESON, S.W. Multiple periplasmic catalases in phytopathogenic strains of *Pseudomonas syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 2468-2473, 1992.
- KRASILNIKOV, N.A. Guide to the bacteria and actinomycetes. **Akademiia Navik. S.S.R.**, Moscow, 830 p., 1949.
- LAMB, C.J.; LAWTON, M.A.; DRON, M. & DIXON, R.A. **Cell**, v. 56, p.215, 1989.
- LEACH, J.E.; CANTRELL, M.A. & SEQUEIRA, L. A hydroxiprolin-rich bacterial agglutinin from potato: Its localisation by immunofluorescence. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 21, p. 319-325, 1982.
- LEE, S.C. & WEST, C.A. Polygalacturonase from *Rhizopus stolonifer*, an elicitor of chitinase synthetase activity in casta bean (*Ricinus communis* L.) seedlings. **Plant Physiology**, Rochville, v. 67. p. 633-639, 1981.

- LEGRAND, M.; KAUFFMANN, S. GEOFFROY, P. & FRITIG, B. Biological function of "pathogenesis-related" proteins: four tobacco PR-proteins are chitinases, **Proceedings National Academy Science U.S.A.**, Washington v. 84, p.6750, 1987.
- LEIGH, J.A. & COPLIN, D.L. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 307-346, 1992.
- LINTHORST, H.J.M. Pathogenesis-related proteins of plant. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 10, n. 2, p.123-150, 1991.
- LIU, H.P.; LEITE, M.C.C. & WANG, S.L. Doenças da cana-de-açúcar no Norte do Brasil. In: **Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros do Brasil**, 1., Anais. p. 227-230, 1979.
- LYON, F.M. & WOOD, R.K.S. Production of phaseollin coumesterol and related compounds in bean leaves inoculated with *Pseudomonas* spp. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 70, p. 406-409, 1975.
- MANSVELT, E.L. & HATTINGH, M.J. Scanning electron microscopy of invasion of apple leaves and blossoms by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 533-538, 1989.
- MARIANO, R.L.R & WANG, S.L. Métodos de inoculação e época de avaliação para *Pseudomonas rubrisubalbicans*, agente da estria mosqueada da cana-de-açúcar. **Cad. Ômega UFRPE, Série Agronomia 4**, Pernambuco, p. 69-75, 1992.
- McKHANN, H.I. & HIRSCH, A.M. Does *Rhizobium* avoid the host response? In: DANGL, J. I., (ed.) **Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals**, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, p. 139-162, 1994.
- McLEAN, F.T. A study of the structure of the stomata of two species of citrus tanket. **Bulletins Torrey of Botanical Club**, v. 48, p. 101-106, 1921.
- MELLOR, R.B. & COLLINGE, D.B. A simple model based on known plant defence reactions is sufficient to explain most aspects of nodulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p.1-18, 1995.

- MITCHELL, R. E. Structure: bacterial. In: **Toxins in Plant Disease**. Eds: R. D. DURBIN. Academic Press, New York. p. 259-93, 1981.
- MITCHELL, R.E. The relevance of non host-specific toxins in the expression of virulence by pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 22, p. 215-245, 1984.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, p. 197-200, 1996.
- OLIVARES, F.L.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; REIS, F.B.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Ecologia das bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*". **Fitopatologia Brasileira**, Aracajú, Suplemento. 18, p. 313 1993.
- OUCHI, S. Inducion of resistance or susceptibility. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 21, p. 289-315, 1983.
- PALLERONI, N.J. Genus I *Pseudomonas* Migula 1894, 237^{AL}, p. 141-199. In: N. R. KRIEG & J. G. HOLT (ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. I, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984.
- PATRIQUIN, D.G. & DÖBEREINER, J. Light microscopy observations of tetrazolium reducing bacteria in the endorhizosphere of Maize and other grasses in Brasil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, p. 734-742, 1978.
- PEROTTO, S.; BREWIN, N.J. & KANNENBERG, E.L. Cytological evidence for a host defense that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharidedefective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 7; p. 99-112, 1994.
- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F. & DQBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubtisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, Dordretch, v. 137, n. 1, p. 61-65, 1991.

- REINHOLD-HUREK, B. & HUREK, T. Capacities of *Azoarcus* sp. a new genus of grass-associated diazotrophs. In: R. Palacios; J. Mora & W. E. Newton. (eds.) **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 691-694, 1993.
- REIS, V.M. Estudo de infecção e métodos de detecção da bactéria endófito *Acetobacter diazotrophicus* em associação com a cana-de-açúcar. Seropédica, UFRRJ, 1994, 213 p. **Tese de Doutorado**.
- REIS, V.M.; OLIVARES F.L. & DÖBEREINER, J. Improved Methodology for Isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and Confirmation of its Endophytic Habitat. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p. 401-405, 1994.
- RUPPEL, S.; HECHT-BUCHHOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, O. & SCHMELZER, R. Settlement of the diazotrophic, phytoeffective bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 145, p. 261-273. 1992.
- RYAN, C.D. Oligosaccharide signalling in plants. **Annual Review of Cell Biology**, Palo Alto, v.3, p. 295-317, 1987.
- SCHLOTTER, M.; BODE, W. & HARTMANN, A. Characterization of monoclonal antibodies against cell surface structures of *Azospirillum brasilense* Sp7 using ELISA techniques. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 3745, 1992.
- SCHLOTTER, M.; KIRCHHOF, G.; HEINZMANN, U.; DÖBEREINER, J. & HARTMANN, A. Immunological studies of the wheat-root-colonization by the *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 using strain-specific monoclonal antibodies. In: **Nitrogen Fixation with Non-Legumes**, (N.A. Hegazi, M. Fayez and M. Monib, Eds.), pp. 291-297. American University in Cairo Press, Cairo, Egypt, 1994.
- SCHMIDT, E.L. Initiation of plant root-microbe interactions. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 33, p. 355-376, 1979.

- SEQUEIRA, L. & GRAHAM, T.L. Agglutination of avirulent strains of *Pseudomonas solanacearum* by potato lectin. **Physiology Plant Pathology**, v. 11, p. 43-54, 1977.
- SEQUEIRA, L. Lectins and their role in host-pathogen specificity. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 16, p. 453-81, 1978.
- SEQUEIRA, L.; GAARD, G. & DE ZOETEN, G.A. Interaction of bacteria and host cell wall: its relation to mechanisms of induced resistance. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 10, p. 43-50, 1977.
- SPENCER, D.; JAMES, E.K.; ELLIS, G.J.; SHAW, J.E. & SPRENT, J.I. Interactions between rhizobia and potato tissues. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, p. 1475-1482, 1994.
- SPRENT, J.I. & JAMES, E.K. **N₂-fixation** by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: FENDRIK, I., DEL GALLO, M., VANDERLEYDEN, J. AND DE ZAMAROCZY, M. (eds.) **Azospirillum VI and related microorganisms**. Berlin, Heidelberg:Springer-Verlag, p. 15-30, 1995.
- STAEHELIN, C.; MÜLLER, J.; MELLOR, R.B.; WIEMKEN, A. & BOLLER, T. Chitinase and peroxidase in effective (fix⁺) and ineffective (fix⁻) soybean nodules. **Planta**, Berlin, v. 187, p. 295-300, 1992.
- STROBEL, G.A.; NACHMIAS, A. & HESS, W.M. Improvements in the growth and yield of olive trees by transformation with the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 66, p. 2581-2585, 1988.
- STUART, D.A. & VARNER, J.E. Purification and characterisation of a salt-extractable hydroxyproline-rich glycoprotein from aerated carrot discs. **Plant Physiology**, Rochville, v. 66, p. 787-792, 1980.
- SUDO, S. Bactérias associadas ao raquitismo das soqueiras de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) e avaliação do capim elefante (*Pennisetum purpureum*) como planta indicadora. Piracicaba, ESALQ/USP, 72 p., **Tese de mestrado**, 1980.

- TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P.C.T.; BALMER, F.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.; SALGADO, C.L.; KRUGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N. & BERGAMIN, F.A. **Manual de fitopatologia : Doenças de plantas cultivadas**, Ed. Agronômica Ceres, 2ª ed., vol.2, São Paulo, 1980.
- TOMIYAMA, K. Research on the hypersensitive response. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 21, p. 1-12, 1983.
- VAN LOON, L.C. Pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 4, p. 111-116, 1985.
- VANCE, C.P. *Rhizobium* infection and nodulation: a beneficial plant disease? **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v. 37. p. 399-424, 1983.
- VANCE, C.P.; KIRK, T.K. & SHERWOOD, R.T. Lignification as a mechanism of disease resistance. **Annual Review Plant Pathology**, Palo Alto, v. 18. p. 259-288, 1980.
- VANDERMOLEN, G.E.; BECKMAN, C.H. & RODEHORST, E. Vascular gelation: a general response phenomenon following infection. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, p. 95-100, 1977.
- WALLIS, F.M. Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 11, p. 333-342, 1977.
- YOUNG, S.A.; GUO, A.; GUIKEMA, J.A.; WHITE, F.F. & LEACH, J.E. Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Plant Physiology**, Rochville, v. 107, p. 1333-1341, 1995.