**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-
açúcar (*Saccharum* sp., L.)**

Maria Carolina Quecine

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento
de Plantas

**Piracicaba
2010**

Maria Carolina Quecine
Engenheira Agrônoma

**Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar
(*Saccharum* sp., L.)**

Orientadora:

Profa. Dra. **ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Quecine, Maria Carolina

Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar (*Saccharum*
sp., L.) / Maria Carolina Quecine. - - Piracicaba, 2010.
196 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.

1. Bactérias 2. Cana-de-açúcar 3. Controle biológico 4. Microrganismos endofíticos
Título

CDD 633.61
Q3a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico

Ao meu amado Giovanni, pelo apreço e carinho que recebo.

À minha querida mãe Regina, pelo incentivo, ensinamentos e compreensão.

Ofereço

*Aos meus sobrinhos queridos, Lisique e
João Pedro, e, a minha irmã Cristina pela
alegria que me proporcionam.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga Profa Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner pela confiança em meu trabalho, motivação e cumplicidade incondicional, deixo aqui os meus mais sinceros agradecimentos;

Ao amigo e (co)orientador Dr. Weligton Luíz de Araújo pelas conversas esclarecedoras, conselhos profissionais e pessoais, sempre me motivando e incentivando;

Ao amigo Dr. Paulo Teixeira Lacava pela amizade, cumplicidade profissional e sugestões nos momentos de decisões que me ajudaram muito;

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pelo exemplo profissional e presença motivadora;

À Dra. Joyce E. Loper pela brilhante orientação durante a execução do “Doutorado Sandwich” em seu laboratório (USDA-Corvallis, EUA), além de toda amizade e suporte emocional que me ofereceu durante a minha estadia no EUA;

À Brenda Shaffer, Marcella Henkels, Sierra Hartney, Teresa Kidarsa e Virginia Stockwell pela amizade e colaboração nos experimentos durante minha estadia em Corvallis-OR;

Aos amigos de Corvallis: Bianca, Alice, Pedro, Jack, Tonho, Vivi, Lu, Pam, Diego, Jim, Ruth, Elena e Rachel pela amizade e apoio nos momentos de solidão;

Ao amigo Prof. Dr. André Lima pelos primeiros ensinamentos de laboratório;

Ao Centro de Tecnologia Canavieira, em especial a Dra. Sabrina Moutinho Chabregas pela disponibilização das mudas de cana-de-açúcar e sugestões;

Ao Prof. Dr. Mateus Mondin pela inestimável colaboração nos experimentos de microscopia de fluorescência;

À amiga Dra. Priscilla de Barros Rossetto pelas análises de microscopia de varredura;

Aos amigos do laboratório Romã, Sarina, Michele, Renata, Anderson, Priscilla, Joelma e Zezão pela ajuda nos eternos re-isolamentos;

Ao Anderson Ferreira pela coloboração nos ensaios de crescimento vegetal;

Ao pessoal do Laboratório Max Feffer, em especial ao Prof. Dr. Carlos Labate e Dra. Mônica Labate pela colobaração, dicas e disponibilização dos aparelhos;

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra e a Neide Graciano Zério do laboratório de Biologia de Insetos/ESALQ pela disponibilização do laboratório e colaboração nos bioensaios;

Ao Dr. Humberto (Beto) do laboratório de genética de Leveduras/ESALQ pela disponibilização do laboratório e pela amizade;

Ao Prof. Dr. Elliot W. Kitajima (NAP-MEPA), pela disponibilização do laboratório;

Ao Prof. Dr. Ricardo Azevedo e a Dra. Salete do laboratório de Bioquímica de Plantas/ESALQ pela disponibilização de equipamentos;

Ao amigo Prof. Dr. Fernando (Moska) pela ajuda inicial nos ensaios de qPCR;

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, aos que ainda desenvolvem os projetos de pesquisas e aqueles já que passaram pelo laboratório e hoje são profissionais nas mais diversas instituições: Aline Romão, Andrea Bogas, Armando Cavalcanti, Anderson Ferreira, Aldo Procópio, Adalgisa Torres, Ademir, Ágata Giancoli, Alessandro Riffel, Ana Paula Pallu, André Lima, Antônio Sérgio Ferreira, Carlos Ivan Vildoso, Carolina Almeida, Claudia Vitorello, Cristina Almeida, Carlos Eduardo Ceroni, Claudia Gai, Cristina Maki, Cristiane, Danice Luvizotto, Denise Balani, Fernando Andreote, Fernanda Sebastianes, Fernanda Bernardes, Fernando Barcelos, Fernanda Bueno, Francisco Andreote, Heloíze Milano, Joelma Marcon, José Antônio da Silva, Júlia Sobral, Laura Assumpção, Léia Fávaro, Leonardo Souza, Luciana Cursino, Marcelo Gullo, Maria Beatriz Calderan, Mayra Martins, Marise, Michele Silva, Manuella Dourado, Priscilla Rosseto, Renata de Assis, Ricardo Yara, Rodrigo Mendes, Rodrigo Stuart Rose, Rudi Procópio, Sarina Tsui, Sônia, Taís Lana, Uirá Belmonte, Vivian Pietrobon, Vanessa Santos, Viviane Colombari, Walter Maccheroni Jr. agradeço pelos momentos de descontração ... pelas discussões científicas de corredor..., de cada um guardo uma história peculiar...

Aos amigos de bancada, das aulas e da vida, Marise, Michele, Manu, Re, Léinha, Pri, Ranei, Carlão e Fer, pela amizade e dicas profissionais, por sempre me agüentarem reclamando e por seus exemplos de vida, vocês são muito especiais para mim....um salve especial à Romã, pela amizade durante os dez anos de vida esalqueana e também pela companhia nas viagens...

Aos professores do Curso de Pós-Graduação de Genética e Melhoramento de Plantas, pelas aulas ministradas que tanto ajudaram na minha formação;

Aos funcionários do Departamento de Genética: Léia e Neusa pela ajuda na parte administrativa, e, Fernandinho, Berdan, Maidia, Marcia, Carlinhos, Beto, Ana e Macedonio pela convivência quase diária e amizade... Em especial ao técnico e amigo José Antonio da Silva (Zezo) pela cumplicidade durante esses dez anos de caminhada;

À minha família e amigos que sempre acreditaram em mim, muito mais que eu própria, em especial aos meus tios: Tuna, Ditinho, Toninho, tia Bete e Libete...

À fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (proc: 05/53748-6) e ao CNPq pelo apoio financeiro;

Ao Deus ... amo muito tudo isso!!!!

“As palavras estão aí, uma por uma; porém minha alma sabe mais...”

Cecília Meirelles

SUMÁRIO

RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	17
LISTA DE FIGURAS.....	19
LISTA DE TABELAS.....	25
1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 Revisão de literatura.....	28
1.1.1 A cultura de cana-de-açúcar.....	28
1.1.1.1 Aspectos históricos.....	29
1.1.1.2 Aspectos econômicos.....	30
1.1.1.3 Aspectos fitossanitários.....	30
1.1.2 Bactérias endofíticas.....	31
1.1.2.1 Efeitos benéficos das bactérias endofíticas aplicadas na agricultura.....	36
1.1.2.2 <i>Pantoea agglomerans</i> - endófito.....	38
Referências.....	39
2 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR PELA BACTÉRIA ENDOFÍTICA <i>Pantoea agglomerans</i> 33.1.....	53
Resumo.....	53
Abstract.....	55
2.1 Introdução.....	57
2.2 Desenvolvimento.....	59
2.2.1 Materiais e Métodos.....	59
2.2.1.1 Microrganismos e material vegetal.....	59
2.2.1.2 Formação de biofilme.....	60
2.2.1.2.1 Experimento 1 - Formação de biofilme em raiz de cana-de-açúcar micropropagadas.....	60
2.2.1.2.2 Experimento 2 - Formação de biofilme em madeira.....	61
2.2.1.2.3 Observações em Microscopia Óptica.....	61
2.2.1.2.4 Observação em Microscopia Eletrônica de Varredura.....	61

2.2.1.3 Produção de moléculas <i>quorum sensing</i> [N-acil homoserina lactona (AHL)] pela <i>P. agglomerans</i> 33.1.....	62
2.2.1.4 Promoção de crescimento e indução de resistência em cana-de-açúcar por <i>P. agglomerans</i> 33.1.....	62
2.2.1.4.1 Inoculação de cana-de-açúcar.....	62
2.2.1.4.2 Promoção de crescimento vegetal.....	63
2.2.1.4.3 Produção de proteínas de resistência.....	63
2.2.1.4.3.1 Extração de proteínas totais.....	63
2.2.1.4.3.2 Produção de quitinase e celulase.....	63
2.2.1.5 Mecanismos de promoção de crescimento de cana-de-açúcar por <i>P. agglomerans</i> 33.1.....	64
2.2.1.5.1 Produção de Ácido-Indol-Acético (AIA).....	64
2.2.1.5.2 Solubilização de fosfato.....	64
2.2.1.5.3 Fixação biológica de nitrogênio (FBN).....	65
2.2.1.6 Alteração da fisiologia de <i>P. agglomerans</i> 33.1 durante interação com cana-de-açúcar.....	65
2.2.1.6.1 Atividade proteolítica.....	66
2.2.1.6.2 Atividade endoglicolítica e pectinolítica.....	66
2.2.1.6.3 Atividade lipolítica e esterolítica.....	66
2.2.1.7 Controle de fitopatógenos.....	67
2.2.1.8 Análise estatística.....	67
2.2.2 Resultados.....	67
2.2.2.1 Estabelecimento da interação planta-microrganismo por produção de biofilme.....	67
2.2.2.2 <i>Quorum-sensing</i> – Produção de AHL(s).....	69
2.2.2.3 Promoção de crescimento vegetal.....	70
2.2.2.4 Indução da produção e proteínas de resistência em cana-de-açúcar.....	70
2.2.2.5 Avaliação dos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de cana-de-açúcar pela <i>P. agglomerans</i> 33.1.....	71
2.2.2.6 Produção de enzimas por <i>P. agglomerans</i> 33.1.....	71
2.2.2.7 Inibição de patógenos de cana-de-açúcar.....	71

2.2.3 Discussão.....	72
Referências.....	77
3 COLONIZAÇÃO CRUZADA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR <i>Pantoea agglomerans</i> 33.1.....	85
Resumo.....	85
Abstract.....	87
3.1 Introdução.....	89
3.2 Desenvolvimento.....	91
3.2.1 Materiais e Métodos.....	91
3.2.1.1 Microrganismos e plasmídios utilizados.....	91
3.2.1.2 Construção do plasmídio pNKGFP.....	92
3.2.1.3 Transformação de <i>P. agglomerans</i> 33.1 com o plasmídio pNKGFP.....	93
3.2.1.4 Teste de estabilidade da expressão da <i>gfp</i>	94
3.2.1.5 <i>Southern Blot</i>	94
3.2.1.5.1 Extração de DNA bacteriano.....	95
3.2.1.5.2 Restrição do DNA genômico e transferência para membrana de náilon...	95
3.2.1.5.3 Preparo da sonda e hibridação molecular.....	96
3.2.1.6 Colonização de cana-de-açúcar pela linhagem 33.1:pNKGFP.....	96
3.2.1.6.1 Experimento 1 – Colonização de plantas micropropagadas.....	97
3.2.1.6.2 Experimento 2 - Colonização de plantas aclimatadas em casa de vegetação.....	97
3.2.1.7 Observações em Microscopia Óptica de Fluorescência.....	97
3.2.1.8 Monitoramento por qPCR da linhagem 33.1:pNKGFP em cana-de- açúcar.....	97
3.2.1.8.1 Extração de DNA total.....	98
3.2.1.8.2 Extração de DNA das bactérias associadas à raiz de cana-de-açúcar.....	99
3.2.1.8.3 Desenho dos primers.....	99
3.2.1.8.4 PCR convencional (cPCR).....	100
3.2.1.8.5 Curva padrão do qPCR.....	101
3.2.1.8.6 PCR quantitativo (qPCR).....	101
3.2.1.9 Análise da densidade bacteriana.....	102

3.2.1.10 Análise de dados.....	103
3.2.2 Resultados.....	103
3.2.2.1 Construção do plasmídio pNKGFP e transformação de <i>P. agglomerans</i>	
33.1.....	103
3.2.2.2 Análise molecular.....	104
3.2.2.3 Microscopia Óptica de Fluorescência.....	105
3.2.2.4 Testes preliminares para qPCR.....	106
3.2.2.5 Monitoramento por qPCR e re-isolamento de <i>P. agglomerans</i>	
33.1:pNKGFP em cana-de-açúcar micropropagada.....	107
3.2.2.6 Densidade bacteriana associada à cana-de-açúcar aclimatada.....	108
3.2.3 Discussão.....	108
Referências.....	113
4 CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>Diatraea saccharalis</i> PELA BACTÉRIA	
ENDOFÍTICA <i>Pantoea agglomerans</i> 33.1 EXPRESSANDO O GENE <i>cry1Ac</i>	123
Resumo.....	123
Abstract.....	125
4.1 Introdução.....	127
4.2 Desenvolvimento.....	128
4.2.1 Materiais e Métodos.....	128
4.2.1.1 Bactérias e plasmídios.....	128
4.2.1.2 Inseto praga: <i>D. saccharalis</i>	129
4.2.1.3 Bioensaios contra lagartas de <i>D. saccharalis</i>	130
4.2.1.3.1 Bioensaio <i>in vitro</i>	130
4.2.1.3.2 Bioensaio <i>in vivo</i>	130
4.2.1.4 Colonização de cana-de-açúcar por <i>P. agglomerans</i> 33.1:pJTT.....	131
4.2.1.5 Re-isolamento bacteriano.....	131
4.2.1.6 Análise estatística.....	132
4.2.2 Resultados.....	132
4.2.2.1 Transformação da <i>P. agglomerans</i> 33.1 com o plasmídio pJTT.....	132
4.2.2.2 Bioensaio <i>in vitro</i>	132
4.2.2.3 Bioensaio <i>in vivo</i>	134

4.2.2.4 Colonização de cana-de-açúcar por <i>P. agglomerans</i> 33.1:pJTT.....	138
4.2.3 Discussão.....	139
Referências.....	143
5 O PAPEL DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO CONTROLE DE <i>Fusarium</i> spp. POR RIZOBACTÉRIA <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Pf-5).....	149
Resumo.....	149
Abstract.....	151
5.1 Introdução.....	153
5.2 Desenvolvimento.....	155
5.2.1 Materiais e Métodos.....	155
5.2.1.1 Microrganismos e condições de cultivo.....	155
5.2.1.2 Mutantes de Pf-5 para produção de metabólitos secundários.....	158
5.2.1.2.1 Construção dos mutantes.....	158
5.2.1.3 Ensaio de antagonismo.....	159
5.2.1.4 Efeito do AF no crescimento de Pf-5 e na produção de metabólitos secundários.....	161
5.2.1.4.1 Efeito no crescimento bacteriano.....	161
5.2.1.4.2 Efeito na produção de metabólitos secundários.....	162
5.2.1.4.2.1 Extração de metabólitos.....	162
5.2.1.4.2.2 HPLC.....	162
5.2.1.4.2.3 Produção de sideróforos.....	162
5.2.1.5 Alteração na expressão genética de Pf-5 <i>in vitro</i> na presença de AF.....	163
5.2.1.5.1 Extração de RNA.....	163
5.2.1.5.2 RT-qPCR.....	164
5.2.1.6 Influência do AF na antibiose de <i>F. verticillioides</i> pela Pf-5.....	165
5.2.1.7 Análise estatística.....	166
5.2.2 Resultados.....	166
5.2.2.1 Inibição de <i>Fusarium</i> spp. por Pf-5 e mutantes.....	166
5.2.2.2 Efeito do AF no crescimento de Pf-5 e na produção de metabólitos.....	171
5.2.2.3 Influência do AF na expressão gênica de antibióticos e sideróforos pela Pf-5.....	173

5.2.2.4 Influência de AF na antibiose de <i>F. verticillioides</i> por Pf-5.....	175
5.3 Discussão.....	175
Referências.....	184
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	195

RESUMO

Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar (*Saccharum* sp., L.)

A cana-de-açúcar é uma das mais importantes culturas para o Brasil e vem recebendo significativa atenção devido à crescente substituição de combustíveis fósseis por fontes renováveis e menos poluentes de energia como o etanol. Consequentemente, os aspectos biotecnológicos oriundos da interação de bactérias e cana-de-açúcar devem ser mais bem avaliados, além disso, estudos de interação planta-microrganismo desenvolvidos em países tropicais são ainda incipientes. As bactérias interagindo com as plantas de interesse agrônômico podem acarretar os mais diversos benefícios, com ênfase na promoção do crescimento vegetal e da fitossanidade. Dentre essas bactérias, diversas linhagens de *Pantoea agglomerans* têm sido isoladas intimamente associadas a várias espécies vegetais. As bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* também têm sido exploradas biotecnologicamente, pois produzem uma vasta gama de antimicrobianos que podem ser utilizados no controle de pragas e fitopatógenos. A partir desses fatos, uma linhagem de *P. agglomerans*, 33.1, previamente isolada endofiticamente de *Eucalyptus grandis* e promotora de crescimento dessa cultura, foi avaliada quanto aos aspectos biotecnológicos durante associação com cana-de-açúcar. A linhagem 33.1 foi capaz de promover o crescimento de cana-de-açúcar e também induziu a produção de proteínas de resistência pelas plantas inoculadas. Dentre os mecanismos avaliados na promoção de crescimento vegetal, a linhagem apresentou alta produção de fitormônio e fosfatases. Foi também confirmado que a interação planta-bactéria afetou o metabolismo da linhagem 33.1. Um plasmídeo integrativo, pNKGFP, foi desenvolvido e inserido na linhagem 33.1. A linhagem bacteriana marcada foi monitorada durante interação com cana-de-açúcar. Por microscopia de fluorescência, re-isolamento e PCR quantitativo (qPCR) foi confirmada a capacidade de colonização cruzada de cana-de-açúcar pela linhagem 33.1:pNKGFP, abrindo assim precedentes para utilização dessa linhagem em outras culturas. Posteriormente, a linhagem 33.1 foi geneticamente modificada para produção da proteína Cry. Por meio de bioensaios em dieta artificial e colmos de cana-de-açúcar foi provado o parcial controle de *Diatraea saccharalis*, uma importante praga de cana-de-açúcar, pela linhagem endofítica expressando heterologamente o gene *cry1a7c*. Vários antibióticos e sideróforos produzidos pela bactéria *P. fluorescens*, linhagem Pf-5, foram avaliados quanto ao controle de *Fusarium* spp., incluindo isolados de *F. verticillioides* causadores de *Pokkah boeng* em cana-de-açúcar. Por mutações sitio-dirigido em genes envolvidos na biossíntese de antimicrobianos foi provado que os compostos 2,4-diacetil-floroglucinol e rizoxina são os principais responsáveis no controle *Fusarium* spp. Por HPLC e RT-qPCR foi também provado que ácido fusárico afeta a produção de antibióticos pela Pf-5.

Palavras-Chave: Cana-de-açúcar; Interação bactéria-planta; Endófito; *Pantoea agglomerans*; *Pseudomonas fluorescens*; Promoção de crescimento; Biocontrole

ABSTRACT

Biotechnological aspects of bacteria-sugarcane (*Saccharum* sp., L.) interactions

Sugarcane is one of the most important Brazilian crops. Its importance is increasing due to the gradual substitution of fossil fuel for renewable and cleaner energy sources, such as ethanol. Consequently, the biotechnological aspects that mediate sugarcane-bacterium interactions must be evaluated; studies from tropical countries are incipient. Bacterium-plant interactions can often improve the growth and fitness of associated plants. One of these beneficial bacteria, *Pantoea agglomerans*, has been isolated from many vegetal species. The *Pseudomonas* genus also has a record of biotechnological exploration due to its wide range of antibiotic production. These compounds can be used on pest and plant-pathogen control. For these reasons, *P. agglomerans*, strain 33.1, previously isolated from *Eucalyptus grandis* and a known eucalyptus growth-promoter, was evaluated about regarding the biotechnological aspects of sugarcane-bacterial association. 33.1 strain was able to promote sugarcane growth and also to induce the production of resistance proteins for inoculated plants. The plant-hormone and phosphatase production by 33.1 were associated with sugarcane growth-promotion bacterial mechanisms. An integrative plasmid, pNKGFP, was constructed and used to transform 33.1. The marked strain was monitored during sugarcane association. The sugarcane cross-colonization by 33.1:pNKGFP was confirmed by fluorescence microscopy, re-isolation and quantitative PCR (qPCR), suggesting that 33.1 should be used in association with other crops. 33.1 was genetically modified to produce the Cry protein. The partial biocontrol of *Diatraea saccharalis*, the sugarcane borer, by the endophytic strain expressing heterologously the *cry1a7c* gene, was confirmed in bioassays using artificial diet and sugarcane stalks. Several antibiotics and siderophores produced by *P. fluorescens* Pf-5 were tested against *Fusarium* spp.; including isolates of *F. verticillioides* responsible for the sugarcane *Pokkah boeng* disease. By deriving site-directed mutants of Pf-5, with single and multiple mutations, in the bio-synthetic gene clusters of the antifungal compounds, it was proved that 2,4-diacetyl-phoroglucinol and rhizoxin are the major compounds responsible for the *Fusarium* spp. suppression. The fusaric acid effects on Pf-5 antibiotic production was proved by HPLC and RT-qPCR.

Keywords: Sugarcane; Plant-bacterium interaction; Endophyte; *Pantoea agglomerans*; *Pseudomonas fluorescens*; Plant growth promotion; Biocontrol

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Formação de biofilme pela bactéria endofítica <i>P. agglomerans</i> , linhagem 33.1, na superfície de raízes de cana-de-açúcar micropropagada (1) e palitos de madeira (2). As observações foram realizadas após 3 (A), 10 (B) e 18 dias (C) após inoculação bacteriana. As observações microscópicas e captura de imagem foram realizadas pela câmera CCD acoplada ao Microscópio de Fluorescência Axiophot. O aumento de 400X foi utilizado nas imagens: A1, A2, B1, B2 e C2 e 200X na imagem C1.....	68
Figura 2.2 -	Colonização de cana-de-açúcar e formação de biofilme pela bactéria endofítica <i>P. agglomerans</i> , linhagem 33.1. O tratamento controle livre de contaminação (A). Células bacterianas invadindo cana-de-açúcar (B) e formação de biofilme na superfície das raízes (C) observados após 3 e 10 dias da inoculação respectivamente. Para observações microscópicas e captura de imagem foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura DSM940A, Zeiss.....	69
Figura 2.3 -	Detecção da produção de AHLs pelas bactérias: <i>P. agglomerans</i> , 33.1 (A) e <i>E. coli</i> , DH5- α (controle negativo) (B). A produção de AHLs é confirmada pela coloração azul do biossensor <i>A. tumefaciens</i> NTL4(pZLR4) indicada pela seta	69
Figura 2.4 -	Promoção de crescimento de cana-de-açúcar pela linhagem endofítica <i>P. agglomerans</i> 33.1. A linhagem 33.1 foi adicionada em substrato contendo as variedades (A) SP80-1842 e (B) SP80-3240 de cana-de-açúcar aclimatadas. Os dados são a média da massa seca das plantas após 30 dias de inoculação. As barras são os valores dos desvios padrão de cada tratamento. Valores com asteriscos (**) no mesmo tecido e variedade diferem estatisticamente ($\alpha = 0.01$) do tratamento controle de acordo com o teste <i>t</i> de Student.....	70
Figura 3.1 -	Plasmídio pNKBOR (ROSSIGNOL et al., 2001) utilizado na construção do plasmídio pNKFGP e para o desenho dos <i>primers</i> PNKF e PNKRII. A parte circulada do plasmídio contém a sequência utilizada para desenvolvimento dos <i>primers</i> (A). Sequência amplificada pelos <i>primers</i> PNKF e PNKRII que se encontram sublinhados na figura acima. Acima <i>primer</i> PNKF e abaixo <i>primer</i> PNKRII (B).....	100
Figura 3.2 -	Curva padrão do plasmídio pNKFGP. As unidades utilizadas para curva padrão foram 10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 número de cópias do plasmídio Para cada corrida foram utilizadas quatro repetições por concentração.....	102

- Figura 3.3 - Expressão heteróloga da GFP pela linhagem 33.1:pNKGFP estriada em meio LB adicionado canamicina, observação em luz ultravioleta **(A)**, e, observação por esfregaço, aumento de 1000X **(B)** e 400X **(C)** em microscópio óptico de fluorescência ... 103
- Figura 3.4 - Análise molecular dos transformantes da linhagem endofítica *P. agglomerans*, 33.1. **(A)** Identificação dos transformantes por PCR utilizando os *primers* PNKF e PNKRII. M - contém o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Fermentas), e as demais colunas as amplificação do fragmento de DNA (~360pb), sendo as amostras: 1 - plasmídeo pNKBOR, 2 - plasmídeo pNKGFP, 3 - 33.1:pNKGFP (DNA), 4 - 33.1:pNKGFP (colônia), 5- 33.1 (DNA), 6 - 33.1 (colônia). **(B)** *Southern Blot* do plasmídeo pNKGFP e do DNA cromossomal de *Pantoea agglomerans* digeridos por *EcoRI* e hibridizados com a sonda, fragmento de DNA obtida a partir dos *primers* PNKF e PNKRII. 1 - 33.1, 2 - plasmídeo pNKGFP 3- 33.1:pNKGFP 104
- Figura 3.5 - Observação da fluorescência da linhagem 33.1:pNKGFP presente no biofilme sobre as raízes de cana-de-açúcar micropropagadas em meio MS. **(A)** Observação das bactérias fluorescendo após cinco dias de inoculação, **(B)** diminuição da fluorescência aos 12 dias e **(C)** poucas bactérias fluorescendo aos 25 dias da inoculação. As setas indicam a presença de bactérias expressando a GFP. A captura de imagem a luz ultravioleta (UV). Aumento de 400X para todas as amostras 105
- Figura 3.6 - Observação da fluorescência das bactérias 33.1:pNKGFP fora do agregado de biofilme, no meio MS. **(A)** Captura de imagem à luz visível e **(B)** captura de imagem sobre luz ultravioleta. Aumento de 1000X..... 105
- Figura 3.7 - Observação da fluorescência das bactérias 33.1:pDsRed durante formação de biofilme sobre as raízes de cana-de-açúcar micropropagadas em meio MS. **(A)** Tratamento controle, **(B)** 33.1:pDsRed após 4 dias e **(C)** 10 dias. A captura de imagem a luz ultravioleta (UV). Aumento de 400X para todas as amostras..... 106
- Figura 3.8 - cPCR com os *primers* PNKF e PNKRII. **(A)** Teste de especificidade: 1 - plasmídeo pNKBOR, 2 - plasmídeo pNKGFP, 3 - plasmídeo pUC18 , 4 - plasmídeo pCM88 , 5 - plasmídeo pSMC21 6 - plasmídeo pUC4K, 7- plasmídeo pJTT, 8 - plasmídeo pGEMT-easy, 9 - plasmídeo DsRed, 10 - 33.1:pNKBOR, 11 - 33.1:pNKGFP, 12 - 33.1, 13 - 33.1:Dsred., 14 - DH5- α - λ pir. As colunas com a letra M contém o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Fermentas). **(B)** teste de sensibilidade: 1- 33.1:pNKGFP (10^8 células), 2 -33.1:pNKGFP (10^7 células), 3 - 33.1:pNKGFP (10^6 células), 4 -33.1:pNKGFP (10^5 células), 5 - 33.1:pNKGFP (10^4 células)..... 107

Figura 3.9 -	Densidade de <i>P. agglomerans</i> 33.1:pNKGFP mensurada por qPCR (A) e re-isolamento (B) , após 4 e 15 dias. As barras apresentadas são a média $\pm$ desvio padrão de quatro repetições.....	107
Figura 4.1 -	Plasmídio pJTT utilizado na transformação da bactéria endofítica <i>P. agglomerans</i> (33.1). A parte linearizada é o fragmento do plasmídio que se insere no cromossomo da célula hospedeira (DOWNING; LESLIE; THOMSON, 2000).....	129
Figura 4.2 -	<i>Southern Blot</i> do plasmídio pJTT e do DNA cromossomal de <i>P. agglomerans</i> digeridos por <i>EcoRI</i> e hibridizados com a sonda de 4Kb obtida pela digestão do pJTT com <i>BamHI</i> . 1. linhagem 33.1, 2. plasmídio pJTT, 3. linhagem 33.1:pJTT	133
Figura 4.3 -	Efeitos linhagem 33.1:pJTT, <i>P. agglomerans</i> sobre taxa de mortalidade das lagartas <i>D. saccharalis</i> alimentadas em dieta artificial. A taxa de mortalidade das lagartas de <i>D. saccharalis</i> foi mensurada após 7 dias da inoculação bacteriana (10^7 UFC.mL ⁻¹) na dieta dos insetos. A taxa de mortalidade foi a média de lagartas mortas por placa, sendo avaliadas seis repetições (placas) por tratamento. Cada placa continha 15 lagartas. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$) de acordo com o teste de Tukey.....	134
Figura 4.4 -	Efeitos da linhagem 33.1:pJTT, <i>P. agglomerans</i> sobre o desenvolvimento das lagartas <i>D. saccharalis</i> alimentadas em dieta artificial, O efeito de duas dosagens: alta (10^7 UFC.mL ⁻¹) e baixa (10^2 UFC.mL ⁻¹) da linhagem 33.1:pJTT foram testadas sobre o desenvolvimento das lagartas até atingir o estágio de pupa. A porcentagem de lagartas pupadas foi mensurada a partir do número total de lagartas que sobreviveram e puparam.....	135
Figura 4.5 -	Bioensaio <i>in vivo</i> avaliado após 30 dias de inoculação. (A) – Lagartas de <i>D. saccharalis</i> alimentadas dos colmos de cana-de-açúcar inoculados com a linhagem 33.1:pJTT. (B) - A esquerda - lagarta retirada do colmo do tratamento controle e a direita - lagarta retirada do colmo inoculado com a linhagem 33.1:pJTT. (C) - Lagarta infectada por ingestão de colmo colonizado pela linhagem 33.1:pJTT.....	136
Figura 4.6 -	Re-isolamento da linhagem 33.1:pJTT presentes no substrato e no interior das plantas de cana-de-açúcar após 30 dias de inoculação bacteriana. Os dados da média de 4 repetição da densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10}$ (UFC+2)/grama para normalização, sendo avaliados estatisticamente pelo teste de Tukey ($P>0,05$).....	138
Figura 5.1 -	Inibição do crescimento de <i>Fusarium</i> spp. por Pf-5 e seus mutantes. A fórmula utilizada foi: $(x1/x2)*100$ para os mutantes avaliados.....	161

- Figura 5.2 - Influência do AF no crescimento de Pf-5. A linhagem Pf-5 foi cultivado em 20 mL de NYBGli + Zn e AF 0 e 0,5 mM por 24 horas a 27°C, 200 rpm. Durante o crescimento, a DO_{600nm} foi mensurada em diferentes tempos, sendo coletadas amostras para extração de RNA em diferentes fases de crescimento bacteriano: FLI (fase log inicial), FLF (fase log final) e FE (fase estacionária), indicadas pelas setas..... 164
- Figura 5.3 - Antibiose *in vitro* de isolados fitopatogênicos de *Fusarium* spp. por mutantes defectivos na produção de antibióticos, linhagem Pf-5. O crescimento fúngico foi mensurado após cinco dias de incubação a 27°C em BDA + Fe (A) e PCG (B). As barras apresentadas são a média ± desvio padrão de quatro replicatas. Isolados T4 Ø (C) e F238 (D) inibidos por mutantes de Pf-5 167
- Figura 5.4 - Antibiose *in vitro* de isolados patogênicos de cana-de-açúcar, *F. verticillioides*, por mutantes defectivos na produção de antibióticos, linhagem Pf-5. O crescimento fúngico foi mensurado após cinco dias de incubação a 27°C em BDA + Fe (A) e PCG (B). As barras apresentadas são a média ± desvio padrão de quatro repetições..... 169
- Figura 5.5 - Controle por competição por ferro, *in vitro*, de isolados fitopatogênicos de *Fusarium* spp. por mutante defectivo na produção de sideróforos, linhagem Pf-5. O crescimento fúngico foi mensurado após cinco dias de incubação a 27°C em KB. As barras apresentadas são a média ± desvio padrão de quatro repetições..... 170
- Figura 5.6 - Influência do AF no crescimento de Pf-5. O isolado foi cultivado em 5 mL dos meios: (A) NBG, (B) PCG, (C) BDA +Fe e (D) NYBGli + Zn e AF 0 e 0,5 mM por 48 horas a 27°C, 200 rpm. Durante o crescimento a DO_{600mM} foi mensurada em diferentes tempos. Barras de erro representando o desvio padrão das quatro repetições podem estar obscurecidas pelos símbolos..... 172
- Figura 5.7 - Efeito do AF na expressão de metabólitos secundários da linhagem Pf-5 avaliado por RT-qPCR. O RNA foi extraído em duas diferentes fases de crescimento de culturas de Pf-5, (A) fase log final e (B) fase estacionária. A linhagem Pf-5 foi crescida em meio NYBGli + Zn adicionado AF (0 e 0,5 mM). O efeito da adição de AF na expressão gênica relativa foi mensurado de acordo com o método de Pfaffl (PFAFFL, 2001). As barras apresentadas são a média ± desvio padrão de quatro repetições..... 174

Figura 5.8 - Efeitos do AF na produção de metabólitos secundários e potencial de antagonismo da Pf-5 em meio BDA + Fe **(1)** e PCG **(2)**. Antibiose *in vitro* de *F. verticillioides*, isolados patógenos de cana-de-açúcar - FV-01 CTC **(A)** e milho - T4 Ø **(B)** por Pf-5 em meio contendo AF (0 e 0,5 mM). As barras apresentadas são a média $\pm$ desvio padrão de quatro repetições. A produção dos antibióticos foi avaliada após 48 horas incubação 27°C a 200 rpm. Os valores em μg de cada metabólito, obtidos por HPLC, representam a media de quatro repetições ($\pm$ desvio) **(C)**. Valores com asteriscos (* e **) na mesma linha diferem estatisticamente ($\alpha = 0,05$ e $0,01$) do tratamento controle (não AF) de acordo com o teste *t* de Student..... 176

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 -	Bactérias endofíticas e suas respectivas plantas hospedeiras (adaptado de ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006). Patógeno humano oportunista. Patógeno humano comum.....	34
Tabela 2.1 -	Produção de proteínas de resistência por cana-de-açúcar. O índice de atividade enzimática foi calculado pela fórmula: $\text{absorbância} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$. Valores com asteriscos (* ou **) diferem estatisticamente do tratamento controle ($\alpha = 0,05$ e $0,01$ respectivamente) de acordo com o teste <i>t</i> de Student.....	70
Tabela 2.2 -	Alteração fisiológica da linhagem 33.1 durante interação com plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. O índice da atividade enzimática foi expresso pela relação entre diâmetro médio do halo e a média do diâmetro da colônia bacteriana. As avaliações foram realizadas com seis repetições para cada tratamento: meio MS contendo a linhagem 33.1 com e sem interação com plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. Valores das médias com asterisco (*) na mesma linha diferem estatisticamente ($\alpha = 0,05$) de acordo com o teste <i>t</i> de Student.....	72
Tabela 3.1 -	Plasmídios e linhagens bacterianas utilizados no trabalho.....	93
Tabela 3.2 -	Densidade bacteriana associada a cana-de-açúcar. A densidade da linhagem 33.1:pNKGFP foi mensurado após 30 dias de inoculação da linhagem em substrato contendo plantas aclimatadas de cana-de-açúcar. Os dados apresentados são a média de quatro repetições e valores com a letra dentro da coluna não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) de acordo com o teste de Tukey. A densidade bacteriana total foi mensurado após 30 dias de inoculação das linhagens 33.1 e 33.1:pNKGFP em substrato contendo plantas aclimatadas de cana-de-açúcar. O tratamento controle consistia da adição de meio LB sem crescimento bacteriano. Os dados apresentados são a média de quatro repetições, tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P > 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.....	108

Tabela 4.1 -	Efeitos das linhagens de <i>P. agglomerans</i> sobre lagartas <i>D. saccharalis</i> alimentadas com colmos de cana-de-açúcar. A taxa de mortalidade das lagartas de <i>D. saccharalis</i> foi mensurada após 10 e 30 dias de inoculação das linhagens nos colmos dos quais se alimentaram as lagartas, sendo avaliadas cinco repetições por tratamento. Os dados são o valor médio do peso de 20 lagartas por tratamento sendo aferidos após 10 e 30 dias. A densidade das linhagens re-isoladas de lagarta e colmo foram respectivamente transformadas em $\log(\text{UFC}+2).\text{lagarta}^{-1}$ e $\log(\text{UFC}+2).\text{grama}^{-1}$ colmo para normalização dos dados, sendo então realizadas as análises estatísticas. Os dados são a média de quatro repetições por tratamento. As repetições eram compostas por parcelas de 5 lagartas. nd = não determinado. Para todos os dados apresentados, tratamentos com a mesma letra e na mesma coluna não diferem estatisticamente ($P>0,05$) de acordo com o teste de Tukey.....	137
Tabela 5.1 -	Linhagens de <i>P. fluorescens</i> Pf-5 utilizadas nesse estudo. O acesso dos genes da linhagem Pf-5, PFL_, foram obtidos no site www.pseudomonas.com	156
Tabela 5.2 -	Isolados fitopatogênicos de <i>Fusarium</i> spp. utilizados nesse estudo.....	157
Tabela 5.3 -	Primers utilizados na construção de mutantes da linhagem Pf-5....	160
Tabela 5.4 -	Primers utilizados nas reações de RT-qPCR. O acesso dos genes da linhagem Pf-5, PFL_, foram obtidos no site www.pseudomonas.com	165
Tabela 5.5 -	Efeitos do AF na produção de antibióticos pela linhagem Pf-5. A linhagem Pf-5 foi cultivada em NYBGli + Zn suplementado com AF (0 e 0,5 mM). A produção dos antibióticos foi avaliada após 48 horas incubação 27°C a 200 rpm. Os valores em µg de cada metabólito, obtidos por HPLC, representam a media de quatro repetições (± desvio). Valores com asteriscos (**) na mesma linha diferem estatisticamente ($\alpha = 0,01$) do tratamento controle (não AF) de acordo com o teste <i>t</i> de Student.....	172
Tabela 5.6 -	Efeitos do AF na produção de sideróforos pela linhagem Pf-5. 10µL da cultura bacteriana ($\text{DO}_{600} = 0,05$) foram incubados em CAS-ágar a 27°C por três dias. O halo foi caracterizado pela coloração amarelo-alaranjado. A razão entre o diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia bacteriana foi utilizada para estimar a produção de sideróforos. Os valores representam a media de quatro repetições (± desvio), Valores com asteriscos (* ou **) na mesma linha diferem estatisticamente ($\alpha = 0,05$ e 0,01 respectivamente) do tratamento controle (não AF) de acordo com o teste <i>t</i> de Student.....	173

1 INTRODUÇÃO

"Não se deixe hipnotizar, mistificar, enganar, pelas repetidas afirmações acerca das maravilhas do método científico. Ele é muito importante. Sem anzóis não há peixes. Cuidado, entretanto, com a arrogância do pescador que, com um peixinho na mão, pretende haver desvendado o mistério da lagoa escura..."

(Rubem Alves)

Bactérias endofíticas vivem no interior das plantas sem causar danos aparentes, e, em muitos casos, essas bactérias podem beneficiar as plantas hospedeiras. O repertório de efeitos benéficos dessas bactérias endofíticas tem sido pouco estudado em plantas de clima tropical. Dessa maneira, a sua utilização como inoculantes na agricultura, mais especificamente no contexto da cana-de-açúcar no Brasil, depende de estudos básicos e aplicados, visto que os mecanismos de especificidade endófito-hospedeiro ainda são incertos. Primeiramente, esse estudo abrange os benefícios envolvidos na interação endófito-plantas, destacando a promoção de crescimento vegetal e o controle biológico de doenças e pragas. Os objetivos desse trabalho foram: i) avaliar a capacidade de uma espécie de bactéria endofítica, isolada de outro hospedeiro, promover o crescimento de cana-de-açúcar, ii) avaliar os mecanismos fisiológicos envolvidos nessa interação, iii) desenvolver bactérias endofíticas expressando gene heterólogo visando o controle biológico. Do ponto de vista da ciência básica são exploradas questões que envolvem a interação endófito-plantas, bem como a sinalização molecular envolvida na interação entre microrganismos relacionados ao controle biológico. A aplicação desses estudos é a promoção de crescimento de cana-de-açúcar, desenvolvimento de uma bactéria endofítica capaz de colonização cruzada e geneticamente modificada visando o controle de praga *Diatraea saccharalis*, além da avaliação e seleção de vários metabólitos secundários envolvidos no controle de isolados fitopatogênicos de *Fusarium* spp..

A hipótese inicial do trabalho considerou a capacidade de uma linhagem endofítica *Pantoea agglomerans*, linhagem 33.1, previamente isolada de *Eucalyptus grandis*, e descrita como promotora de crescimento dessa espécie vegetal, promover o crescimento de mudas de cana-de-açúcar, sendo também avaliados os mecanismos

envolvidos nessa interação. A colonização cruzada de cana-de-açúcar pela linhagem bacteriana foi comprovada por diversas técnicas, sendo inclusive desenvolvido um plasmídeo integrativo que poderá ser utilizado em outros estudos de interação planta-endófito, utilizando outros organismos modelos. Uma vez comprovada a promoção do crescimento e a capacidade de colonização cruzada de cana-de-açúcar pela linhagem 33.1, a mesma foi engenheirada a fim de expressar de forma heteróloga o gene *cry1Ac7*, sendo comprovado o potencial de controle da lagarta de *D. saccharalis* por essa linhagem. Finalmente, foram avaliados diferentes metabólitos secundários proveniente de *Pseudomonas fluorescens*, linhagem Pf-5, quanto a capacidade de controlar *Fusarium* spp., incluindo isolados fitopatogênicos de cana-de-açúcar. Essa bactéria modelo foi recentemente sequenciada, e, produz mais de dez metabólitos secundários diferentes. Esse estudo possibilitou a avaliação de genes candidatos para serem futuramente introduzidos em bactérias endofíticas visando o controle de *Fusarium* spp..

Dessa forma, a fim de contextualizar o trabalho e os resultados obtidos nos capítulos subsequentes, nesse capítulo introdutório será apresentada uma revisão de literatura sobre cana-de-açúcar e bactérias endofíticas, com destaque para espécie *P. agglomerans*.

1.1 Revisão de literatura

1.1.1 A cultura de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é um vegetal semiperene que pode ser cultivada em áreas subtropicais, entre 15° e 30° de latitude e pertence à seguinte classificação botânica (CASTRO; KLUGE, 2001): divisão: Magnoliophyta; subdivisão: Angiosperma; classe: Liliopsida; subclasse: Commelinidae; família: Poaceae (Graminae); tribo: Andropogonae; subtribo: Saccharininae e gênero: *Saccharum*.

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* L., o qual apresenta pelo menos seis espécies, sendo a cana-de-açúcar cultivada comercialmente, um híbrido multiespecífico, recebendo a designação *Saccharum* sp.. As espécies de cana-de-açúcar são provenientes do Sudeste Asiático. A cana-de-açúcar é a principal matéria-

prima para a fabricação do açúcar e álcool (etanol). Além da produção de açúcar, álcool e aguardente, os subprodutos da cana (bagaço, vinhaça e tona de filtro) são de grande importância socioeconômica na geração de energia, ração animal, aglomerados, fertilizantes, entre outros. Devido à grande importância dessa cultura, fatores que aumentem a produtividade, ou, diminuam o custo de produção são importantes. Dentre as inúmeras alternativas, muito pouco é explorado do potencial de microrganismos associados à cana-de-açúcar. Esses microrganismos podem ser utilizados no controle, erradicação ou mesmo diminuição das injúrias e prejuízos causados por fitopatógenos e pragas, ou, promoverem crescimento vegetal, aumentando a produtividade e/ou diminuindo os gastos na fertilização.

1.1.1.1 Aspectos históricos

A primeira espécie de cana-de-açúcar introduzida no Brasil foi *Saccharum officinarum* L., que foi trazida da ilha da madeira, em 1502. Essa espécie era uma cana reconhecida como nobre ou cana tropical, caracterizada pelo seu alto teor de açúcar, porte elevado, colmo grosso e pouco teor de fibras. Devido a essas características *S. officinarum* foi cultivada nos três primeiros séculos da colonização, provavelmente uma única variedade, que no século XIX recebeu o nome de cana “Creoula” ou “Mirim” ou ainda “Cana da terra”, para distinguir dos novos cultivares importados que começaram a chegar no país (LIMA, 1984).

Segundo Miocque e Machado Jr. (1977), o ciclo da crioula estendeu-se desde 1532 a 1810 e por ser pouco rústica e susceptível a várias doenças, seu cultivo estava limitado a terras virgens com alta fertilidade. A substituição por híbrido interespecífico do gênero *Saccharum* se deu em função do sucessivo cultivo. Dessa forma, cultivares dessa espécie começaram a sofrer problemas com doenças, pragas e falta de adaptações ambientais.

Nunes Jr. (1987) relata que a variedade Creoula começou a ser substituída pela cana Caiana a partir do ano de 1810, nos principais estados produtores (Bahia, Pernambuco e Rio de Janeiro). Por ser uma variedade mais produtiva e rica em sacarose, proporcionou ganhos significativos para a indústria açucareira no Brasil, tendo sido considerada como o principal fator que levou este segmento à expansão.

Ainda, segundo esse autor, o ciclo da caiana durou até próximo do ano de 1880 quando essa variedade foi submetida a um severo ataque de Gomose, doença causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *vasculorum*, nas principais regiões canavieiras do país.

A partir da criação do PROALCOOL, década dos anos setenta do século 20, um novo ciclo de pesquisa se iniciou dando suporte a expansão da cultura no país. Em poucos anos, as áreas plantadas com a cana-de-açúcar triplicaram, invadindo áreas consideradas menos aptas principalmente nas regiões de cerrados. Para enfrentar os novos desafios advindos dessa expansão iniciaram-se os programas de melhoramento genético visando à obtenção de novas variedades (MACHADO; HABIB, 2009).

1.1.1.2 Aspectos econômicos

As expectativas para a nova safra de cana-de-açúcar (2009/2010) é o volume de 629 milhões de toneladas a ser processado pelo setor sucroalcooleiro, representando um aumento de 10% do obtido na safra 2008/2009. A região Centro-Sul produzirá aproximadamente de 90% do total nacional, ou seja, 550 milhões de toneladas de cana-de-açúcar. Do total produzido no Brasil, 44,7% será destinado à fabricação de açúcar e 55,3% a produção de álcool, segundo o prognóstico de produção da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Os cálculos apontam que entre 1975 a 2008, o álcool substituiu 280,88 bilhões de litros de gasolina no Brasil, ou 1,77 bilhões de barris, o que correspondente a 13% das reservas de petróleo do País. As receitas com exportações de açúcar, álcool e melaço em 2008 somadas à gasolina substituída geraram divisas de US\$ 18,7 bilhões (Agência Estado). Assim, fica evidente a importância econômica da cana-de-açúcar para o Brasil.

1.1.1.3 Aspectos fitossanitários

Entre os fatores mais importantes que ameaçam a produção de cana-de-açúcar e consequentemente resultam na redução de biomassa e dos subprodutos mencionados acima está a severidade de algumas doenças. No que se refere às doenças provocadas por fungos, bactérias vírus e micoplasma, Sanguino (1998), relatou que no Brasil foram diagnosticadas 40, entre as 177 relacionadas em cultivo de cana-de-açúcar no mundo. Historicamente, no mundo são consideradas 4 doenças

mais importantes para a cultura da cana-de-açúcar, sendo elas: Carvão (*Sporisorium scitamineum*), Raquitismo das soqueiras (*Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*), Escaldaduras das folhas (*Xanthomonas albilineans*) e o Mosaico (Vírus do mosaico), todas basicamente controladas por meio do melhoramento genético de variedades (SANTOS, 2003).

Por outro lado, às pragas (insetos, nematóides e ervas daninha) são os principais fatores limitantes da produção da cana-de-açúcar. Dentre as principais pragas presentes nos canaviais brasileiros, destaca-se: *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), cigarrinha das folhas *Mahanarva posticata* (Stål., 1854) e das raízes *Mahanarva fimbriolata* (Stål., 1855) (Hemiptera: Cercopidae) e a broca dos rizomas *Migdolus fryanus* (Westwood, 1863) (Coleoptera: Vesperidae). (MACHADO, HABIB; 2009).

Em detrimento ao uso de agro-químicos, produtos tóxicos ao homem e outros organismos vivos não alvo, novas alternativas devem ser mais exploradas, como exemplo o manejo integrado de pragas e o controle biológico de pragas e fitopatógenos. Dentre os organismos com potencial de serem utilizados no controle biológico desses insetos pragas ou mesmo das doenças, as quais as plantas não são resistentes, a aplicação de microrganismos endofíticos, mais especificamente bactérias, é uma alternativa pouco explorada.

1.1.2 Bactérias endofíticas

Bactérias endofíticas podem ser definidas como aquelas bactérias capazes de colonizar internamente o tecido da planta não apresentando estrutura externa e sem causar prejuízo ao hospedeiro (HOLLIDAY, 1989; MENDES; AZEVEDO, 2007; SCHULZ; BOYLE, 2006). Aproximadamente 300.000 espécies vegetais existem na terra, e, cada planta individualmente é hospedeira de um ou mais endófito (STROBEL et al., 2004). Entretanto, apenas uma ínfima parcela dessas plantas tem sido estudada quanto seus endófitos. Consequentemente, a oportunidade de encontrar um novo e benéfico microrganismo endofítico entre a diversidade de plantas existentes nos diferentes ecossistemas terrestres é considerável (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006)

Além das bactérias endolíticas no interior das plantas, existem as bactérias patogênicas causadoras de doenças ao hospedeiro. A diferenciação entre endófito e patógeno não é definitiva, uma vez que a relação benéfica ou patogênica depende de fatores como as condições ambientais ou do equilíbrio com as outras populações microbianas. Assim, uma bactéria endofítica, pode, dependendo das condições, tornar-se um patógeno. Ou ainda, uma epífita pode entrar na planta, tornando-se endofítica ou patogênica (ANDREWS; HARRIS, 2000; KLOEPPER; SABARATNAM; BEATTIE, 2003; SKIPPERS; BAKKER, 1992). Em geral, as bactérias endofíticas estão em maior densidade em relação a bactérias patogênicas (HALLMANN et al., 1997; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2004).

Os critérios para reconhecer uma bactéria endofítica “verdadeira” são diversos (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998) e isso requer não somente o isolamento desses organismos a partir de tecido vegetal com superfície desinfetada, mas também evidências microscópicas utilizando bactérias marcadas que colonizem os tecidos vegetais. O ultimo requerimento nem sempre é preenchido, sendo sugerida, portanto, a utilização do termo endófito putativo quando as análises microscópicas não foram realizadas. Os endófitos também são reconhecidos pela sua capacidade de re-infectar plantas axênicas (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Os microrganismos endofíticos entram na planta, primeiramente através das raízes, entretanto, partes aéreas das plantas, como as flores, caules e cotilédones podem também ser usados. Dentro da planta essas bactérias podem se localizar no ponto de entrada ou se dispersar de forma sistêmica (HALLMANN et al., 1998; ZINNIEL et al., 2002). Bactérias endofíticas parecem penetrar ativamente nos tecidos de plantas usando enzimas hidrolíticas como celulasas e pectinases, além de usarem aberturas naturais ou provocadas por injúrias (QUADT-HALLMANN; BENHAMOU; KLOEPPER, 1997). O modo de dispersão das bactérias endofíticas pode ser via sementes, propagação vegetativa, partes mortas da planta ou insetos (BALDANI, 1997). Experimentos de competição têm demonstrado que alguns endófitos são mais hábeis colonizadores em relação a outros (RYAN et al., 2008).

Nas bactérias, incluindo as endófitas, a regulação na expressão de importantes genes é mediada por sistemas de sinalização entre as células, conhecido como *quorum*

sensing (QS) (SWIFT et al., 2001). Um número limitado de sistemas de QS foi caracterizado detalhadamente, sendo um dos sistemas mais estudados o mediado pela molécula N-acil-homoserina-lactonas (AHLs) (SWIFT; WILLIAM; STEWART, 1999). Em contraste aos outros sistemas de QS, o mediado por AHLs sinaliza o sistema que aparentemente controla genes essenciais para a colonização dos eucariotos por diversas espécies bacterianas. Esse processo é facilitado por uma densidade elevada de células, como os biofilmes (COSTERTON et al., 1999).

Na colonização da planta hospedeira por bactérias, o biofilme governa a adesão, a mobilidade, a maturação e a dispersão bacteriana (CROSSMAN; DOW, 2004; DANIELS; VANDERLEYDEN; MICHELS, 2004; PARSEK; GREENBERG, 2005; STOODLEY et al., 2002). Os biofilmes estão freqüentemente associados às infecções por bactérias patogênicas (JACQUES et al., 2005). Entretanto, estão surgindo vários estudos relacionando: interação bactérias endofítica - planta hospedeira à produção de biofilme (DAVIES et al., 1998).

Estudos clássicos da diversidade de bactérias endofíticas têm focado na caracterização de bactérias isoladas de tecidos desinfetados com hipoclorito de sódio ou agentes similares (MICHE; BALANDREAU, 2001). Entretanto, novas tecnologias têm sido utilizadas, principalmente os métodos que não necessitam do cultivo microbiano. Esses métodos são baseados nas análises de sequência de genes bacterianos isolados de tecidos vegetais (CHELIUS; TRIPLETT, 2000; ENGELHARD; HUREK; RENHOLD-HUREK, 2000; MIYAMOTO; KAWAHARA; MINAMISAWA, 2004; REITER et al., 2003). Rosenblueth e Martinez-Romero (2006) apresentaram uma lista de espécies bacterianas endofíticas pertencentes aos mais diversos grupos, tendo sido isoladas de diferentes espécies vegetais (Tabela 1.1), demonstrando que, independentemente da metodologia utilizada, todos os resultados apontam uma inesgotável biodiversidade bacteriana que residem dentro dos vegetais.

Tabela 1.1 - Bactérias endofíticas e suas respectivas plantas hospedeiras (adaptado de ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006)

(continua)

Endófito	Plantas hospedeiras	Referências
α-Proteobactéria		
<i>Azospirillum brasilense</i>	Banana	Weber et al. (1999)
<i>Azospirillum amazonense</i>	Banana, abacaxi	Weber et al. (1999)
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Arroz	Engelhard et al. (2000)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Arroz	Chantreuil et al. (2000)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Cana-de-açúcar, café	Cavalcante; Döbereiner (1988); Jiménez-Salgado et al. (1997)
<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	Citrus	Araújo et al. (2002)
<i>Methylobacterium extorquens</i>	Pinus, citrus	Araújo et al. (2002); Pirttilä et al. (2004)
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	Arroz	Yanni et al. (1997)
<i>Rhizobium (Agrobacterium) radiobacter</i>	Cenoura, arroz	Surette et al. (2003)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Batata doce	Reiter et al. (2003)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> ^a	Arroz	Engelhard et al. (2000)
β-Proteobactéria		
<i>Azoarcus</i> sp.	Gramínea, arroz	Engelhard et al. (2000); Reinhold-Hurek et al. (1993)
<i>Burkholderia pickettii</i> ^a	Milho	McInroy e Kloepper (1995)
<i>Burkholderia cepacia</i> ^b	Citrus	Araújo et al. (2001)
<i>Burkholderia</i> sp.	Banana, abacaxi e arroz	Weber et al. (1999); Engelhard et al. (2000)
<i>Chromobacterium violaceum</i> ^a	Arroz	Phillips et al. (2000)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Cana-de-açúcar, arroz, milho, sorgo	Olivares et al. (1996); Weber et al. (1999)
<i>Herbaspirillum rubrisulbalbicans</i>	Cana-de-açúcar	Olivares et al. (1996)
γ-Proteobactéria		
<i>Citrobacter</i> sp.	Banana	Martínez et al. (2003)
<i>Enterobacter</i> spp.	Milho	McInroy e Kloepper (1995)
<i>Enterobacter sakazakii</i> ^a	Soja	Kuklinsky-Sobral et al. (2004)
<i>Enterobacter cloacae</i> ^a	Citrus e milho	Araújo et al. (2002); Hinton e Bacon (1995)
<i>Enterobacter agglomerans</i> ^a	Soja	Kuklinsky-Sobral et al. (2004)
<i>Enterobacter asburiae</i>	Batata doce	Asis e Adachi (2003)
<i>Erwinia</i> sp.	Soja	Kuklinsky-Sobral et al. (2004)
<i>Escherichia coli</i> ^b	Alface	Ingham et al. (2005)
<i>Klebsiella</i> sp.	Batata doce e arroz	Engelhard et al. (2000); Reiter et al. (2003)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^b	Soja	Kuklinsky-Sobral et al. 2004
<i>Klebsiella terrigena</i> ^a	Cenoura	Surette et al. (2003)

Tabela 1.1 - Bactérias endofíticas e suas respectivas plantas hospedeiras (adaptado de ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006)

(conclusão)

Endófito	Plantas hospedeiras	Referências
<i>Klebsiella oxytoca</i> ^b	Soja	Kuklinsky-Sobral et al. (2004)
<i>Pantoea</i> sp.	Arroz e soja	Kuklinsky-Sobral et al. (2004); Verma et al. (2004)
<i>Pantoea agglomerans</i> ^a	Citrus e batata doce	Araújo et al. (2001, 2002); Asis e Adachi (2003)
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Cenoura e crisântemo	Sturz e Kimpinski (2004); Surette et al. (2003)
<i>Pseudomonas putida</i> ^a	Cenoura	Surette et al. (2003)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cenoura	Surette et al. (2003)
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	Soja	Kuklinsky-Sobral et al. (2004)
<i>Pseudomonas synxantha</i>	Pinus	Prittilä et al. (2004)
<i>Salmonella enterica</i> ^b	Alface, cenoura, radiche, tomate	Cooley; Miller e Madrell (2003); Guo et al. (2002); Islam et al. (2004)
<i>Serratia</i> sp.	Arroz	Sandhiya et al. (2005)
<i>Serratia marcescens</i> ^a	Arroz	Gyaneshwar et al. (2001)
<i>Stenotrophomonas</i> ^a	Gramínea de dunas	Dalton et al. (2004)
Firmicutes		
<i>Bacillus</i> spp.	Citrus	Araújo et al. (2001, 2002)
<i>Bacillus megaterium</i>	Milho, cenoura, citrus	Araújo et al. (2001); McInroy e Kloepper (1995); Surette et al. (2003)
<i>Clostridium</i>	Gramínea (<i>Miscanthus sinensis</i>)	Miyamoto, Kawahara e Minamisawa (2004)
<i>Paenibacillus odorifer</i>	Batata doce	Reiter et al. (2003)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ^b	Cenoura	Surette et al. (2003)
Bacteróides		
<i>Sphingobacterium</i> sp. ^a	Arroz	Phillips et al. (2000)
Actinobactéria		
<i>Arthrobacter globiformis</i>	Milho	Chelius e Triplett (2000)
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Citrus	Araújo et al. (2002)
<i>Kocuria varians</i>	Crisântemo	Sturz e Kimpinski (2004)
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	Crisântemo	Sturz e Kimpinski (2004)
<i>Microbacterium testaceum</i>	Milho	Zinniel et al. (2002)
<i>Mycobacterium</i> sp. ^b	Trigo e pinus	Conn e Franco (2004); Prittilä et al. (2005)
<i>Nocardia</i> sp. ^b	Citrus	Araújo et al. (2002)
<i>Streptomyces</i>	Trigo	Coombs e Franco (2003)
<i>Streptomyces</i> spp.	Citrus, soja	Quecine et al. (2008)

^a Patógeno humano oportunista^b Patógeno humano comum

1.1.2.1 Efeitos benéficos das bactérias endofíticas aplicadas na agricultura

Há vários efeitos positivos atribuídos às bactérias endofíticas aplicadas na agricultura, entretanto, os principais e mais estudados benefícios para planta hospedeira são: o controle biológico de pragas e doenças e a promoção de crescimento vegetal, ambos realizados por vários mecanismos, direta ou indiretamente (AZEVEDO et al., 2002; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; GLICK, 1995; HALLMAN et al., 1997; LODEWYCKX et al., 2002; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000).

As bactérias endofíticas colonizam o mesmo nicho que os fitopatógenos, o que faz das mesmas potencias agentes de biocontrole (AZEVEDO et al., 2002; BERG et al., 2004). Além disso, inúmeros trabalhos têm descrito a habilidade dos endófitos em controlar doenças (DUIJFF; GIANINAZZI-PEARSONAND; LEMANCEAU, 1997; STURZ; MATHESON, 1996).

Os mecanismos envolvidos no controle de pragas e doenças são os mais diversos. Competição por colonização e exudados das raízes é um importante mecanismo pelo qual as bactérias protegerem as plantas contra fitopatógenos (DUFFY, 2001). As bactérias endofíticas atuam também como agentes de biocontrole produzindo os mais diversos compostos químicos, incluindo quelatadores de ferro, como os sideróforos, os mais diversos tipos de antibióticos, vários biocidas voláteis, enzimas líticas como quitinases e glicanases, além, de enzimas de detoxicação (AIT BARKA et al., 2002; GLICK, 1995; STURZ; CHRISTIE, 2003). Algumas bactérias endofíticas podem ainda estimular mecanismos de resistência induzida nas plantas hospedeiras, sendo já documentos a redução de doenças fúngicas, bacterianas e até virais, e, em alguns casos diminuição de injúrias causadas por nematóides, e insetos (KERRY, 2000; PING; BOLAND, 2004; RAMAMOORTHY et al., 2001; RYU et al., 2004; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000). Detalhes desses mecanismos e os microrganismos envolvidos podem ser obtidos na revisão escrita por Compant et al. (2005a).

Vários são também os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas. Esses mecanismos incluem a solubilização e fosfato (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001), produção de ácido-indol-acético, e outros fitormônios como citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (KUKLINSKY-

SOBRAL et al., 2004; LEE et al. 2004; ZAKRAHOVA, 1999). Além da produção de sideróforos, uma vez que os mesmos quelam o ferro presente no solo disponibilizando-o à planta (COSTA; LOPER, 1994).

Muitos vegetais apresentam aumento de produção como consequência da fixação biológica de nitrogênio (HUREK et al., 2002; SEVILLA et al., 2001), fenômeno realizado pelas mais diversas espécies bacterianas. A fixação biológica de nitrogênio por bactérias não simbiontes foi inicialmente descrita em bactérias diazotróficas da rizosfera e do rizoplane de uma grande variedade de plantas não-leguminosas (DÖBEREINER, 1992). Atualmente, conhece-se uma vasta gama de bactérias diazotróficas que colonizam o interior da planta e são conhecidas como bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio (OLIVARES et al., 1996; URETA et al., 1995).

Além desses mecanismos os microrganismos endofíticos podem produzir vitaminas essenciais às plantas (PIRTTILA et al., 2004). Vários outros efeitos benéficos relacionados à promoção de crescimento vegetal têm sido atribuídos a bactérias endofíticas como ajustamento osmótico, regulação de abertura e fechamento de estômatos, modificação da morfologia das raízes, aumento da eficiência de obtenção de minerais e alteração no metabolismo de acumulação de nitrogênio (COMPANT et al., 2005a,b).

Atualmente, há um aumento no interesse de microrganismos endofíticos geneticamente modificados (ANDREOTE et al., 2004). Algumas bactérias endofíticas já têm sido geneticamente modificadas, os endófitos *Clavibacter xylii* e *Herbaspirillum seropedicae* foram transformados para produzir e secretar δ -endotoxina proveniente de *Bacillus thuringiensis* para o controle de insetos (DOWNING; LESLIE; THOMSON, 2000; TURNER et al., 1991). *Sinorhizobium meliloti* e *Bradyrhizobium japonicum*, tiveram o desempenho de fixação de nitrogênio melhorado devido o aumento na expressão de genes codificadores de nitrogenase e da transferência de ácido dicarboxílico (RONSON et al., 1990). Maurhofer et al. (1995), aumentando a produção de 2,4-diacetil-floroglucinol e pioluteorina pelo isolado de *P. fluorescens* CHA0 transformado com o plasmídeo pME3090, obtiveram aumento de cinco vezes na inibição de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* quando comparado com o tipo selvagem CHA0, entre outros exemplos. Entretanto, há vários obstáculos que devem ser discutidos antes

da liberação do uso de microrganismos geneticamente modificados na agricultura (NEWMAN; REYNOLDS, 2005).

1.1.2.2 *Pantoea agglomerans* - endófito

P. agglomerans é uma bactéria Gram-negativa, pertence ao grande grupo das enterobacteriáceas. Inicialmente essa espécie era classificada como *Erwinia herbicola* (EWING; FIFE, 1972), entretanto, uma nova classificação taxonômica, baseada em propriedades fenotípicas e hibridização DNA/DNA, foi estabelecida, reclassificando assim essa espécie bacteriana (BEIJI et al., 1988; GAVINI et al., 1989).

O gênero *Pantoea* foi primeiramente estabelecido por Gavini et al. (1989). Ao contrário da distinção apenas fenotípica, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae* e *Enterobacter agglomerans* foram transferidas para o gênero *Pantoea* com base na homologia de DNA (GAVINI et al., 1989). Alguns dos isolados que pertenciam ao complexo *Enterobacter agglomerans* foram transferidos para *P. agglomerans* e *P. dispersa*, algumas dessas linhagens continuam sendo classificadas como *Enterobacter agglomerans*.

As espécies do gênero *Pantoea* são bem heterogêneas e podem ser classificadas pelas suas propriedades filogenéticas (FENG et al., 2003). *P. agglomerans* pode ser encontrada nos mais diversos ambientes: solo (OMAR; WEINHARD; BALANDREAU, 1989; YEUNG; LEE; WOODARD, 1998), água (MOSSO et al., 1994), insetos (DILLON; VENNARD; CHARNLEY, 2001) e ocasionalmente em humanos (DE CHAMPS et al., 2000). As mesmas podem ser classificadas como patógenas humanas oportunistas (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001; ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006).

Quando associadas às plantas, *P. agglomerans* já foi encontrada endofiticamente em inúmeras culturas de importância econômica: ervilha (ELVIRA-RECUENCO; VAN VUURDE, 2000), batata (STURZ; MATHESON, 1996; ASIS; ADACHI, 2003), milho (MCINROY; KLOEPPER, 1995), eucalipto (PROCÓPIO, 2004), laranja (ARAÚJO et al., 2002), soja (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004), arroz (VERMA LADHA; TRIPATHI, 2001; VERMA et al., 2004), algodão (MCINROY; KLOEPPER, 1995), trigo (RUPPEL et al., 1992), café (VEGA et al., 2005), feijão (HSIEH; HUANG; ERICKSON, 2005) e cana-

de-açúcar (BALDANI et al., 1986; CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988; DONG et al., 1994; LOIRET et al., 2004; NUNEZ; COLMER, 1968).

Devido à vasta gama de hospedeiros, as propriedades benéficas dessa espécie têm sido estudadas e exploradas quanto a sua aplicação na agricultura. A importância agrônômica de *P. agglomerans* deve-se ao potencial da mesma para promoção de crescimento vegetal por meio da solubilização de fosfato, produção de fitormônios e fixação biológica de nitrogênio (ASIS; ADACH, 2003; LOIRET et al., 2004; MALBOOBI et al., 2009a, 2009b; SINGH et al., 1988; SUBARAN et al., 2009; TSAVKELOVA et al., 2007; VERMA LADHA; TRIPATHI, 2001; ZIMMER; HUNDESHAGEN; NIEDERAU, 1994). A mesma pode também combater os mais diversos fitopatógenos (BARDIN et al., 2003; BONATERRA et al., 2003; GUNASINGHE; IKIRIWATTE; KARUNARATNE, 2004; PLAZA et al., 2004) além de promover a indução de resistência sistêmica nas plantas colonizadas (JEUN et al., 2004; LIU; KLOEPPER; TUZUN, 1995; ONGENA et al., 2000). Entretanto, a espécie *P. agglomerans*, também ocorre como fitopatógeno (HINTON; BACON, 1995), fato este que deve ser levado em consideração quando essa bactéria é inoculada na planta em condição de campo.

Considerando todo o potencial a ser explorado das bactérias endofíticas, destacando-se a espécie *P. agglomerans*, o conhecimento sobre as mesmas é relativamente limitado, principalmente quando aplicados a culturas de clima tropical como a cana-de-açúcar. O grande desafio é o correto manejo desses microrganismos, e para isso, os conhecimentos relacionados aos aspectos biotecnológicos das bactérias endofíticas, e, as interações com o hospedeiro certamente favorecerá a interação planta-endófito culminado num uso sustentável e economicamente viável desses benefícios para agricultura.

Referências

AGÊNCIA ESTADO. Disponível em:

<<http://ultimosegundo.ig.com.br/economia/2009/03/09/moagem+de+cana+deve+crescer+57+em+200910+preve+datagro+4643918.html>> Acesso em: 22 jan. 2010.

AIT BARKA, E.; GOGNIES, S.; NOWAK, J.; AUDRAN, J. C.; BELARBI, A. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. **Biological Control**, Orlando, v.24, p.135–142, 2002.

ANDREOTE, F. D.; GULLO, M. J.; LIMA, A. O. S.; MACCHERONI, JUNIOR, W.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **Journal of Microbiology**, Seul, v. 42, p. 169-173, 2004.

ANDREWS, J. H.; HARRIS, R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 145-180, 2000.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI-JÚNIOR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, JÚNIOR., W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 4906–4914, 2002.

ASIS, C. A.; ADACHI, C. A. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 38, p. 19–23, 2003.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI-JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS. 2002. p. 233-268.

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.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 29, p. 911-922, 1997.

BARDIN, S. D.; HUANG, H. C.; LIU, L.; YANKE, L. J. Control, by microbial seed treatment, of damping-off caused by *Pythium* sp. on canola, safflower, dry pea, and sugar beet. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 25, p. 268–275, 2003.

BEIJI, A.; MERGAERT, J.; GAVINI, F.; IZARD, D.; KERSTERS, K.; LECLERC, H.; DELEY, J. Subjective synonym of *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*, and *Enterobacter agglomerans* and redefinition of the taxon by genotypic and phenotypic data. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 38, p. 77–88, 1988.

- BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 51, p. 215-229, 2004.
- BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, p. 343-350, 2001.
- BONATERRA, A.; MARI, M.; CASALINI, L.; MONTESINOS, E. Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, p. 93-104, 2003.
- CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. **Ecofisiologia de culturas extrativas**: cana-de-açúcar, seringueira, coqueiro, dendezeiro e oliveira. Cosmópolis: Editora Stoller do Brasil. 2001. 138p.
- CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 23-31, 1988.
- CHARENTREUIL, C.; GIRAUD, E.; PRIN, Y.; LORQUIN, J.; BA, A.; GILLIS, M.; DE LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 5437-5447, 2000.
- CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. Diazotrophic endophytes associated with maize. In: Triplett, E. W. (Ed.). **Prokaryotic nitrogen fixation**: a model system for analysis of a biological process. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2000. p. 779-791.
- COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promotion bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 4951-4959, 2005a.
- COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by a plant growth-promoting bacterium, *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 1685-1693, 2005b.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2cana_de_acucar.pdf> Acesso em: 01 jan. 2010.
- CONN, V. M.; FRANCO, C. M. M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 1787-1794, 2004.

COOLEY, M. B.; MILLER, W. G.; MANDRELL, R. E. Colonization of *Arabidopsis thaliana* with *Salmonella enterica* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and competition by *Enterobacter asburiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 4915-4926, 2003.

COOMBS, J. T.; FRANCO, C. M. M. Isolation and identification of actinobacteria isolated from surface-sterilized wheat roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 5303-5308, 2003.

COSTA, J. M.; LOPER, J. E. Characterization of siderophore production by the biological-control agent *Enterobacter cloacae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 7, p. 440-448, 1994.

COSTERTONI, J. W.; LEWANDOWISK, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPINSCOTT, H. M. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 711-745, 1995.

CROSSMAN, L.; DOW, J. M. Biofilm formation and dispersal in *Xanthomonas campestris*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 6, p. 623-629, 2004.

DALTON, D. A.; KRAMER, S.; AZIOS, N.; FUSARO, S.; CAHILL, E.; KENNEDY, C. Endophytic nitrogen fixation in dune grasses (*Ammophila arenaria* and *Elymus mollis*) from Oregon. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 49, p. 469-479, 2004.

DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 28, p. 261-289, 2004.

DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, P. E. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. **Science**, Washington, 280, 295-298, 1998.

DE CHAMPS, C.; LE SEAUX, S.; DUBOST, J. J.; BOISGARD, S.; SAUVEZIE, B.; SIROT, J. Isolation of *Pantoea agglomerans* in two cases of septic monoarthritis after plant thorn and wood sliver injuries. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 460-461, 2000.

DILLON, R. J.; VENNARD, C. T.; CHARNLEY, A. K. Exploitation of gut bacteria in the locust. **Nature**, London, v. 403, p. 851, 2001.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 22, 107- 149, 2003.

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.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; McCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. G.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 1139-1147, 1994.

DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 2804-2810, 2000.

DUFFY, B. K. Competition. In: MALOY, O. C.; MURRAY, T. D. (Org.). **Encyclopedia of plant pathology**. New York: John Wiley & Sons, 2001. p. 243–244.

DUIJFF, B. J.; GIANINAZZI-PEARSONAND, 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.

ELVIRA-RECUENCO, M.; VAN VUURDE, J. W. L. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 1036–1041, 2000.

ENGELHARD, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Preferential occurrence of diazotrophic endophytes, *Azoarcus* spp., in wild rice species and land races of *Oryza sativa* in comparison with modern races. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 131-41, 2000.

EWING, W. H.; FIFE, M. A. *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck) comb. nov. (the *Herbicola-Lathyri* bacteria). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.22, p. 4–10, 1972.

FENG, Y.; SHEN, D.; DONG, Z.; SONG, W. *In vitro* symplasmata formation in the rice diazotrophic endophyte *Pantoea agglomerans* YS19. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, p. 435-444, 2003.

GAVINI, F.; MERGAERT, J.; BEJI, A.; MIELCAREK, C.; IZARD, D.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing & Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, 39, 337–345, 1989.

GLICK, B. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 41, p. 109–117, 1995.

GUNASINGHE, R. N.; IKIRIWATTE, C. J.; KARUNARATNE, A. M. The use of *Pantoea agglomerans* and *Flavobacterium* sp to control banana pathogens **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 79, p. 1002-1006, 2004.

GUO, X.; VAN IERSEL, M. W.; CHEN, J.; BRACKETT R. E.; BEUCHAT, L. R. Evidence of association of salmonellae with tomato plants grown hydroponically in inoculated nutrient solution. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 3639-3643, 2002.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P. M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.183, p. 2634-2645, 2001.

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

HALMMAN. J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODIGUEZ-RABANA, L.; KLOEPPER, J. Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 925-937, 1998.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, Den Haag, v.129, p.117-125, 1995.

HOLLIDAY, P. A. **Dictionary of plant pathology**. Cambridge: Cambridge University Press. 1989. 331p.

HSIEH, T. F.; HUANG, H. C.; ERICKSON, R. S. Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte *Pantoea agglomerans*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 608–614, 2005.

HUREK, T.; HANDLEY, L. L.; REINHOLD-HUREK, B.; PICHE, Y. *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, p. 233-242, 2002.

INGHAM, S.C.; FANSLAU, M. A.; ENGEL, R. A.; BREUER, J. R.; BREUER, J. E.; WRIGHT, T. H.; REITH-ROZELLE, J. K.; ZHU, J. Evaluation of fertilization- to-planting and fertilization-to-harvest intervals for safe use of noncomposted bovine manure in Wisconsin vegetable production. **Journal of Food Protection**, Ames v. 68, p. 1134-1142, 2005.

ISLAM, M.; MORGAN, J.; DOYLE, M. P.; PHATAK, S. C.; MILLNER, P.; JIANG, X. Fate of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 2497-2502, 2004.

JACQUES, M. A.; JOSI, K.; DARRASSE, A.; SAMSON, R. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 4, p. 2008-2015, 2005.

JEUN, Y. C.; PARK, K. S.; KIM, C. H.; FOWLER, W. D.; KLOEPPER, J. W. Cytological observation of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 39-42, 2004.

JIMÉNEZ-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**, Baltimore, 63:3676-3683, 1997.

KERRY, B. R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 38, p. 423-441, 2000.

KLOEPPER, J. W.; SKIPPERS, B.; BAKKER, P. A. H. M. Proposed elimination of the term endorhizosphere. **Phytopathology**, Lancaster, v. 82, p. 726-727, 1992.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

LEE, S.; FLORES-ENCARNACION, M.; CONTRERAS-ZENTELLA, M.; GARCIA-FLORES, L.; ESCAMILLA, J. E.; KENNEDY, C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 186, p. 5384-5391, 2004.

LIMA, G. A. **Cultura da cana-de-açúcar**. Fortaleza: Editora Fortaleza. 1984. 159p.

LIU, L.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Lancaster, v. 85, p. 695-698, 1995.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; VAN DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, p. 583-606, 2002.

LOIRET, F. G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODE, P.; RODE'S, R.; DONG, Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.97, p.504-511, 2004.

MACHADO, L. A.; HABIB, M. Perspectivas e impactos da cultura de cana-de-açúcar no Brasil. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/Cana/index.htm>. Acesso em: 10 jan 2009.

MALBOOBI, M. A.; BEHBAHANI, M.; MADANI, H.; OWLIA, P.; DELJOU, A.; YAKHCHALI, B.; MORADI, M.; HASSANABADI, H. Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 1479-1484, 2009.

MALBOOBI, M. A.; OWLIA, P.; BEHBAHANI, M.; SAROKHANI, E.; MORADI, S.; YAKHCHALI, B.; DELJOU, A.; HERAVI, K.M. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, 1471-1477, 2009.

MARTÍNEZ, L.; CABALLERO, J.; OROZCO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 257, p. 35-47, 2003.

MAURHOFER, M.; KEEL, C.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. **Plant Pathology**, London, v. 44, p. 40–50, 1995.

McINROY, J. A.; KLOPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.173, p.337–342,1995.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de importância econômica. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A.M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife:UFPE, 2007.p. 129-140.

MICHE, L.; BALANDREAU, J. Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 3046–3052, 2001.

MIOCQUE, J.; MACHADO, J. R. G. P. Review of sugar cane varieties and breeding in Brazil. **Sugar Journal**, New Orleans, v. 40, p. 9-13, 1977.

MIYAMOTO, T.; KAWAHARA, M.; MINAMISAWA, K. Novel endophytic nitrogen-fixing clostridia from the grass *Miscanthus sinensis* as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, p. 6580-6586, 2004.

MOSSO, M. A.; DE LA ROSA, M. C.; VIVAR, C.; MEDINA, M. R. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.77, p. 370–381, 1994.

NEWMAN, L. A.; REYNOLDS, C. M. Bacteria and phytoremediation: New uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 23, p. 6-8, 2005.

NUNES, JUNIOR., M. S. D. Variedades de cana-de-açúcar. In: PARANHOS, S.B. (Ed.). **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargill. 1987. p.187-259.

NUNEZ, W. J.; COLMER, A. R. Differentiation of *Aerobacter-Klebsiella* isolated from sugarcane. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 16, p. 1875-8, 1968.

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.

OMAR, A. M. N.; WEINHARD, P.; BALANDREAU, J. Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egypt soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 7, p. 158–163, 1989.

ONGENA, M.; DAAYF, F.; JACQUES, P.; THONART, P.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C.; BELANGER, R. R. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. **Plant Pathology**, London, v. 49, p. 523–530, 2000.

PARKE, J. L.; GURIAN-SHERMAN, D. Diversity of the *Burkholderia cepacia* complex and implications for risk assessment of biological control strains. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p. 225-258, 2001.

PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 4809–4821, 2005.

PHILLIPS, D. A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; YANG, G. P.; JOSEPH, C. M. Release of nitrogen: A key trait in selecting bacterial endophytes for agronomically useful nitrogen fixation. In: LADHA, J.K.; REDDY, P.M. (Org.). **The quest for nitrogen fixation in rice**, Manila:Ed. The Philippines, 2000. p. 205-217.

PING, L.; BOLAND, W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, p. 263–269, 2004.

PIRTTILA, A.; JOENSUU, P.; POSPIECH, H.; JALONEN, J.; HOHTOLA, A. Bud endophytes of Scots pine produce adenine derivatives and other compounds that affect morphology and mitigate browning of callus cultures. **Physiologia plantarum**, Kobenhavn, v. 121, p. 305–312, 2004.

PLAZA, P.; USALL, J.; SMILANICK, J. L.; LAMARCA, N.; VINAS, I. Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, p. 781-786, 2004.

PROCÓPIO, R.E.L. **Diversidade bacteriana endofítica de *Eucaliptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 115p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

QUADT- HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 577-582, 1997.

QUECINE, M. C.; ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; GAI, C. S.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, p. 486-491, 2008.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SMAIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, p. 1-11, 2001.

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

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 indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, p. 574-584, 1993.

REITER, B.; BÜRGMANN, H.; BURG, K.; SESSITSCH, A. Endophytic *nifH* gene diversity in African sweet potato. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 49, p.549- 555, 2003.

RONSON, C. W.; BOSWORTH, A. H.; GENOVA, M.; GUDBRANDSEN, S.; HANKINSON, T.; KWIATOWSKI, R.; RATCLIFFE, H.; ROBIE, C.; SWEENEY, P.; SZETO, W.; WILLIAMS, M.; ZABLOTOWICZ, R. Field release of genetically engineered *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* strains. In: GRESSHOFF, L. E.; STACEY, G.; NEWTON, W.E. (Org.). **Nitrogen fixation: achievements and objectives**. New York: Chapman and Hall, 1990. pp. 397-403.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.19, p. 827-837, 2006.

_____. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 181, p. 337-344, 2004.

RUPPEL, S.; HECK-BUCHHOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, U.; 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, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 278, p. 1–9, 2008.

RYU, C. M.; MURPHY, J. F.; MYSORE, K. S.; KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacterial systemically protect *Arabidopsis thaliana* against *Cucumber mosaic virus* by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. **The Plant Journal**, Oxford, v. 39, p. 381–392, 2004.

SABARATNAM, S.; BEATTIE, G. A. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in epiphytic and endophytic colonization of leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 1220-1228, 2003.

SANDHIYA, G. S.; SUGITHA, T. C. K.; BALACHANDAR, D.; KUMAR, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi v. 43, p. 802-807, 2005.

SANGUINO, A. Situação atual da pesquisa em doenças da cana-de-açúcar. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.24, p.90-91, 1998.

SANTOS, A. S. Doenças causadas por fungos e bactérias em cana-de-açúcar. In: REUNIÃO ITINERANTE DE FITOSSANIDADE DO INSTITUTO BIOLÓGICO – RIFIB, 9., 2003, Catanduva. **Anais...** s.l.:s.ed., 2003. p.10-17.

SCHULZ B. J. E.; BOYLE, C. J. C. What are endophytes? In: SCHULZ B.J.E.; BOYLE, C.J.C.; SIEBER, T.N. (Org.). **Microbial root endophytes**. Berlin: Springer-Verlag. 2006. p. 1–13.

SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wildtype and Nif – mutants strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.14, p. 358-366, 2001.

SINGH, M.; KREUTZER, R.; ACKER G.; KLINGMÜLLER, W. Localization and physical mapping of a plasmid-borne 23-kb nif gene cluster from *Enterobacter agglomerans* showing homology to the entire nif gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* M5a1 **Plasmid**, New York, v. 19, p. 1-12, 1988.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COLEMAN, F. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, Palo alto, v. 56, p. 187–209, 2002.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 67, p. 257–268, 2004.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 72, p. 107–123, 2003.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 1–30, 2000.

STURZ, A. V.; MATHESON, B. G. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 184, p. 265–271, 1996.

STURZ, A.; KIMPINSKI, J. Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of rootlesion nematodes in the potato root zone. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 262, p. 241–249, 2004.

SULBARAN, M.; PÉREZ, E.; BALL, M. M.; BAHSAS, A.; YARZABAL, L. A. Characterization of the mineral phosphate-solubilizing activity of *Pantoea agglomerans* MMB051 isolated from an iron-rich soil in Southeastern Venezuela (Bolívar State) **Current Microbiology**, New York, v. 58, p. 378–383, 2009.

SURETTE, M. A.; STURZ, A. V.; LADA, R. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): Their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 253, p. 381–390, 2003.

SWIFT, S.; WILLIAM, P.; STEWART, G. S. A. B. N-Acylhomoserine lactones and quorum sensing in proteobacteria. In: DUNNY, G.M.; WINANS, S.C. (Ed.). **Cell–Cell signaling in bacteria**. Washington; ASM Press. 1999. pp. 291–314.

SWIFT, S.; DOWNIE, J. A.; WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M. L.; SALMON, G. P. C.; WILLIAMS, P. Quorum sensing as a population-density-dependent determinant of bacterial physiology. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 45, p. 199–270, 2001.

TSVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 162, p. 69–76, 2007.

TURNER, J. T.; LAMPEL, J. S.; STEARMAN, R. S.; SUNDIN, G. W.; GUNYUZLU, P.; ANDERSON, J. J. Stability of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xily* subsp. *cyondontis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, p. 3522–3528, 1991.

URETA, A.; ALVAREZ, B.; RÁMON, A.; VERA, M. A.; MARTÍNEZ-DRETS, G. Identification of *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans* using biochemical and genetic criteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 127, p. 271–277, 1995.

VEGA, F. E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J. S. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. **Journal Basic Microbiology**, Weinheim, v. 45, p. 371–380, 2005.

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

VERMA, S. C.; SINGH, A.; CHOWDHURY, S. P.; TRIPATHI, A. K. Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp., using green fluorescent protein reporter. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 26, p. 425–429, 2004.

WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 210, p.103- 113, 1999.

YANNI, Y. G.; RIZK, R. Y.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; DE BRUIJN, F.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T. M.; MATEOS, P. F.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, Dordrecht v. 194, p. 99-114, 1997.

YEUNG, K. F.; LEE, K. M.; WOODARD, R. W. Isolation and identification of two l-azetidine-2-carboxylic acid-degrading soil microorganisms, *Enterobacter agglomerans* and *Enterobacter amnigenus*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 61, p. 207–211, 1998.

ZAKHAROVA, E. A. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 259, p. 572-576, 1999.

ZIMMER, W.; HUNDESHAGEN, B.; NIEDERAU, E. Demonstration of the indolepyruvate decarboxylase gene homologous in different auxin producing species of the Enterobacteriaceae. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, p. 1072–1076, 1994.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 2198-2208, 2002.

2 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR PELA BACTÉRIA

ENDOFÍTICA *Pantoea agglomerans* 33.1

Resumo

Na agricultura, os microrganismos não estão relacionados apenas a patogenicidade das plantas, mas também possuem grande potencial de utilização como inoculantes. Dentre os microrganismos utilizados na agricultura, os endófitos possuem um enorme potencial, uma vez que colonizam o interior das plantas interagindo intimamente com o hospedeiro, podendo atuar como promotores de crescimento vegetal, agentes de biocontrole e biorremediadores. A partir deste fato, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial da bactéria endofítica *Pantoea agglomerans* (linhagem 33.1) quanto à promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar, além da caracterização fisiológica dessa linhagem. Primeiramente, a linhagem endofítica 33.1 foi inoculada em meio líquido contendo plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, sendo então observado, por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), o comportamento da linhagem durante a interação com a planta. As análises microscópicas permitiram a observação da formação de biofilme sobre a superfície radicular e colonização de cana-de-açúcar pela linhagem 33.1. Posteriormente foi confirmada a produção de N-acil-homoserina-lactonas pela linhagem endofítica. A mesma em ensaios realizados em casa de vegetação demonstrou potencial na promoção de crescimento e proteção de cana-de-açúcar, uma vez que, houve aumento da massa seca vegetal, e, o aumento de proteínas de resistência como quitinases e celulasas produzidas pelas plantas inoculadas com o endófito. Em ensaios bioquímicos foi detectada alta produção de ácido-indol-acético e fosfatases pela linhagem 33.1, sendo esses importantes mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal. A fixação de nitrogênio pela linhagem 33.1 foi baixa, em quantidade provavelmente insignificante para promoção de crescimento da planta associada. Foi observado que a produção enzimática da linhagem 33.1 foi alterada devida a associação com cana-de-açúcar, demonstrando que planta e bactéria envolvidas nessa interação são afetadas. A atividade antagônica da linhagem 33.1 foi avaliada *in vitro* contra isolados patogênicos de cana-de-açúcar, *Fusarium verticillioides*, agente causal de *Pokkah boeng*, e *Ceratocystis paradoxa*, agente causal da podridão abacaxi. A linhagem inibiu pouco o crescimento do isolado de *F. verticillioides*, mas não apresentou nenhuma atividade antagônica contra *C. paradoxa*. Os resultados apresentados sugerem que a linhagem 33.1 na interação com cana-de-açúcar é uma importante promotora de crescimento vegetal, atuando indiretamente na proteção do vegetal, pois estimula a produção de proteínas de resistência pela planta.

Palavras-chave: Endófito; *Pantoea agglomerans*; Cana-de-açúcar; Interação planta-microrganismo; Promoção de crescimento vegetal

2 SUGARCANE GROWTH PROMOTION BY ENDOPHYTIC BACTERIUM *Pantoea agglomerans* 33.1

Abstract

Some micro-organisms, although found in nature as plant-pathogens, are frequently used as inoculants in agriculture. Among these micro-organisms, the endophytes have been described as a group of micro-organisms with a huge potential for application due to the fact that endophytes are able to colonize upon entry into a plant; interacting with the host as plant-hormone producers, or acting as biocontrol agents and xenobiotic degraders. Thus, the aim of this work was to explore the potential of the endophytic bacteria *Pantoea agglomerans* (33.1 strain) in the promotion of sugarcane growth as well as its physiological characterization. First, micro-propagated sugarcane seedlings were inoculated with 33.1 strain in liquid media. The bacterial behavior during plant-interaction was observed by optical and scanning electron microscopy. The microscopic analysis allowed the observation of the bacterial biofilm formation on root surfaces and the sugarcane colonization by 33.1 strain through root junctions. Subsequently, the N-acetyl-homoserine-lactone production was confirmed. 33.1 strain showed the potential to promote sugarcane growth and plant-protection by the increase of dried mass, and an increase in resistance-protein production of chitinases and cellulases, of inoculated plants in greenhouse assays. Biochemistry assays proved that 33.1 produces high amounts of indol-acetic-acid and different kind of phosphatases. These should be the major mechanisms involved in sugarcane growth promotion. The biological nitrogen fixing was very low. Bacterial enzymatic production was shown to be affected by plant association, suggesting that plant and bacterium are both affected interactively. 33.1 antagonistic activities against *Fusarium verticillioides* and *Ceratocystis paradoxa*, two sugarcane pathogens, were evaluated *in vitro* by dual plate test. The endophytic strain slightly inhibited the *F. verticillioides* and did not suppress *C. paradoxa* growth. These results suggest that the sugarcane-33.1 interaction has important benefits in promoting the growth of the plant and its fitness through resistance-protein production.

Keywords: Endophyte; *Pantoea agglomerans*; Sugarcane; Plant-microbe interaction; Plant growth promotion

2.1 Introdução

Bactérias endofíticas estão presentes em todas as espécies vegetais, permanecendo em estado de latência ou colonizando ativamente os tecidos de forma local ou sistêmica. Inicialmente os microrganismos endofíticos eram considerados inócuos às plantas, porém a partir da década de 70 do século 20, foi verificada a sua importância, principalmente na área agrícola (AZEVEDO, 2002; RYAN et al., 2008). Atualmente, há vários efeitos positivos atribuídos às bactérias endofíticas, principalmente como promotoras de crescimento vegetal e agentes de controle biológico de pragas e doenças nas plantas (DÖBEREINER; BODDEY, 1981; DOWNING; LESLIE; THOMSON, 2000; VERMA; LANDHA; TRIPATHI, 2001), indução de resistência sistêmica (HALMMAN, 1997), produção de sideróforos (BURD; DIXON; GLICK, 1998) e antibióticos (STROBEL; DAISY, 2003).

Com relação ao crescimento vegetal, as bactérias endofíticas podem contribuir para promovê-lo de forma indireta, por meio da redução de populações deletérias às plantas de interesse, neste caso, a bactéria pode atuar no controle biológico por competição por nutrientes, antibiose e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (RAMAMOORTHY et al., 2001; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000; VAN LOON; BAKKER; PIERTESE, 1998). A promoção de crescimento pode ser também de forma direta, por meio da disponibilização de nutrientes para a planta, fixação de nitrogênio atmosférico e a produção de reguladores de crescimento vegetal (SHISHIDO; BREUIL; CHANWAY, 1999).

As bactérias endofíticas são classificadas como facultativas ou obrigatórias (HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008). As bactérias endofíticas obrigatórias são organismos que vivem unicamente dentro das plantas sem possuir estágio de vida fora das mesmas, sendo transmitidas via planta-planta ou planta-inseto de transmissão-planta. Por serem difíceis de serem acessadas, essas bactérias endofíticas obrigatórias são pouco exploradas para aplicação na agricultura. Já as bactérias endofíticas facultativas alternam o ciclo de vida entre planta e ambiente, solo principalmente. Assim, a maioria dos endófitos possui um ciclo bifásico de vida, vivem no ambiente externo e de acordo com as condições ambientais, entram e persistem dentro do hospedeiro (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006).

Para terem sucesso ecológico os endófitos devem ser primeiramente bons colonizadores e se estabelecerem na planta hospedeira (VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008). Uma vez estabelecidos, os endófitos são capazes de promover mudanças fisiológicas que podem modular o crescimento e desenvolvimento da planta (CONRATH et al., 2006). Frequentemente os efeitos benéficos dos endófitos são maiores que os das bactérias que colonizam apenas a rizosfera das plantas (PILLAY; NOWAK. 1997).

As sequências de eventos envolvidos na colonização das plantas pelos endófitos são bem similares, exceto nas fases iniciais, sendo que poucos estudos relatam ou mensuram o grau de especificidade entre planta-endófito (HALLMANN et al., 1997). Um dos mecanismos envolvidos na colonização e estabelecimento das bactérias Gram-negativas na planta hospedeira é a produção de moléculas *quorum sensing*, destacando-se as N-acil-homoserina-lactonas (AHLs), que também agem como reguladores na produção de compostos como os antifúngicos (WOOD et al., 1997), formação de biofilme (DAVIES et al., 1998) e produção de polissacarídeos extracelulares (VON BODMAN MAJERCZAK; COPLIN, 1998). O estudo desse e de outros metabólitos, além da averiguação da interação entre o endófito e a cultura estudada é uma das primeiras etapas para entender o comportamento do microrganismo a ser explorado agronomicamente, verificando se o mesmo possui potencial de aplicação na cultura de interesse.

Dentre os endófitos estudados para aplicação agrícola, destaca-se a bactéria *Pantoea agglomerans*. Existem vários estudos demonstrando seu potencial na indução de resistência contra diversos patógenos (JEUN et al., 2004; LIU; KLOEPPER; TUZIN, 1995; ONGENA et al., 2000), além do uso direto da mesma no controle de diversas pragas e microrganismos antagonistas (BARDIN et al., 2003; BONATERRA et al., 2003, GUNASINGHE; IKIRIWATTE; KARUNARATNE, 2004; PLAZA et al., 2004). Este gênero bacteriano também é conhecido como um importante fixador de nitrogênio não simbiótico, podendo contribuir assim também com a nutrição da planta hospedeira (ASIS; ADACH, 2003; LOIRET et al., 2004; SINGH et al., 1988, VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001), além de promover a solubilização de fósforo (MALBOOBI et al., 2009a, 2009b; SUBARAN et al., 2009). Alguns estudos descrevem o gênero *Pantoea*

como produtor de fitormônios como o ácido-indol-acético (TSAVKELOVA et al.; 2007; ZIMMER; HUNDESHAGEN; NIEDERAU, 1994).

O Brasil ocupa a posição de maior produtor mundial de cana-de-açúcar. A produtividade de cana-de-açúcar no estado de São Paulo é de 20 a 30% maior do que na Austrália, segundo maior produtor mundial da cultura. Apesar desse quadro otimista, espera-se dobrar ou mesmo triplicar a produção de cana-de-açúcar, visando o aumento na produção de açúcar e álcool (FÁVARO, 2009). Uma das alternativas, mais sustentável, inversa ao aumento da área de plantio, é promover a associação de cana-de-açúcar com bactérias endofíticas benéficas, visando maior sanidade e produtividade. Essa prática pode ser empregada em diversas etapas da produção de cana-de-açúcar, destacando-se a fase de aclimação das mudas clonais realizada principalmente nos centros de melhoramento de cana-de-açúcar. Essa fase seria uma boa opção, pois aceleraria o crescimento das mudas, diminuiria as perdas por fitopatógenos, o que certamente reduziria o valor das mudas. Os viveiros são um ambiente controlado, fato esse que impediria a disseminação do microrganismo no ambiente. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a interação entre *P. agglomerans*, linhagem 33.1, e cana-de-açúcar, bem como avaliar o potencial da linhagem em promover o crescimento das plantas aclimatadas de cana-de-açúcar em casa de vegetação e controle de fitopatógenos.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Materiais e Métodos

2.2.1.1 Microrganismos e material vegetal

A bactéria endofítica *P. agglomerans*, linhagem 33.1, foi previamente isolada de *Eucalyptus grandis* (PROCÓPIO, 2004). A mesma foi escolhida nos estudos de interação com cana-de-açúcar por ter sido descrita como promotora de crescimento de *E. grandis*. (PROCÓPIO, 2004). A linhagem 33.1 foi crescida em meio Luria Bertani - LB (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) suplementado com glicerol (15%) e estocada à -80°C. Todos os experimentos foram iniciados com culturas frescas crescidas primeiramente

em meio LB a 28°C.

No ensaio de antagonismo foram utilizados os isolados patogênicos de cana-de-açúcar, *Fusarium verticillioides* (FV-01 CTC), agente causal da *Pokkah boeng*, e *Ceratocystis paradoxa* (CP-CTC), agente causal da podridão abacaxi cedidos gentilmente pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba-SP, Brasil. Os fitopatógenos foram estocados à temperatura ambiente, em discos de batata dextrose ágar (BDA) (Difco) imersos em água destilada previamente esterilizada. Os experimentos foram iniciados com culturas frescas crescidas em meio BDA a 28°C.

As plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) foram gentilmente cedidas pelo CTC por intermédio de Dra. Sabrina Moutinho Chábregas. As plantas micropropagadas foram das variedades: SP80-1842 e SP80-3240 estavam no estágio F3 da cultura *in vitro*.

2.2.1.2 Formação de biofilme

A formação de biofilme pela linhagem 33.1 foi observada por microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram realizados dois experimentos, o experimento 1 com a finalidade de verificar a formação de biofilme durante a interação entre a linhagem bacteriana e plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, e no experimento 2, onde se observou a formação de biofilme em madeira, material biologicamente inerte.

2.2.1.2.1 Experimento 1 - Formação de biofilme em raiz de cana-de-açúcar micropropagadas

A linhagem 33.1 foi cultivada em meio LB e após atingir a fase log, foram adicionadas, 10^5 unidades formadoras de colônia (UFC).planta⁻¹, em meio líquido Murashige e Skoog (MS) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo a variedade SP80-1842, e então incubadas a 28°C em estufa com fotoperíodo controlado de 16 horas de luz. No tratamento controle não foi inoculado o microrganismo, somente o meio LB. Foram observadas três amostras para cada tratamento em todos os tempos avaliados. Durante 18 dias foram realizadas várias coletas das amostras das plantas para observação por MO e MEV.

2.2.1.2.2 Experimento 2 - Formação de biofilme em madeira

Para confirmação dos dados obtidos *in planta*, a linhagem 33.1 (10^5 UFC) foi inoculada em meio MS contendo palito de madeira esterilizado de acordo com a metodologia proposta por Marques et al. (2002). Os tubos foram mantidos a 28°C em estufa com fotoperíodo de 16 horas de luz. Nas datas de observação das plantas foram também coletados os palitos para a visualização em MO.

2.2.1.2.3 Observações em Microscopia Óptica

Os materiais analisados por MO foram dispostos em lâmina com água e visualizados imediatamente. Quando a análise requereu cortes, os mesmos foram feitos manualmente a fresco. A captura da imagem foi realizada pela câmera CCD acoplada ao Microscópio de Fluorescência Axiophot, sem utilização do filtro para excitação em luz ultravioleta.

2.2.1.2.4 Observação em Microscopia Eletrônica de Varredura

Para as análises de MEV, as amostras das raízes de cana-de-açúcar foram cortadas em pedaços pequenos (2 cm), fixadas em solução Karnovsky (2 % glutaraldeído; 0,001 M CaCl_2 ; 2,5% paraformaldeído em tampão cacodilato 0,05 M, pH 7,2) por 2 horas e foi realizada uma infiltração com glicerol 30% por 30 minutos, para crioproteção. Os fragmentos foram mergulhados em N_2 líquido, fragmentados com auxílio de pinça e bisturi e tratados com uma solução de tetróxido de ósmio 1-2% em tampão cacodilato por 2 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas 3 vezes por 10 minutos com água para retirada do excesso de ósmio e desidratadas em uma série de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%). Os materiais foram secos ao ponto crítico (CPD 030, Balzers), montados sobre os “stubbs” e cobertos com ouro no metalizador (MED 010, Balzers) para então serem observados ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV - LEO, DSM940A, Zeiss) localizado no Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura, NAP-MEPA, ESALQ-USP.

2.2.1.3 Produção de moléculas *quorum sensing* [N-acil homoserina lactona (AHL)] pela *P. agglomerans* 33.1

A bactéria *Agrobacterium tumefaciens* NTL4(pZLR4), biossensor de AHLs, foi inoculada linearmente no centro das placas contendo meio LB, acrescido de X-gal ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) por toda a superfície. A linhagem 33.1 foi inoculada próxima à *A. tumefaciens*, que contém o promotor TraR e a fusão do gene *TraG :: LacZ*, formando um complexo que regula a expressão do operon da *LacZ*. Na presença de AHL(s), essas moléculas se ligam ao promotor TraR, ativando a expressão do gene *LacZ*, codificando a enzima β -galactosidase, a qual quebra molécula X-gal, tornando a célula azul (SZENTHE; PAGE, 2002). Dessa forma, após a incubação a 28°C por 48 horas, a observação de colônias de *A. tumefaciens* com pigmentação azul indicou a produção de AHLs pela linhagem avaliada. Como controle negativo foi utilizado a bactéria *Escherichia coli*, linhagem DH5- α .

2.2.1.4 Promoção de crescimento e indução de resistência em cana-de-açúcar por *P. agglomerans* 33.1

Uma vez observada interação entre a linhagem 33.1 e cana-de-açúcar por meio da formação de biofilme e colonização, foram realizados ensaios visando observar a capacidade de *P. agglomerans* 33.1 em promover o crescimento de mudas recém aclimatadas e estimular a produção de proteínas de resistência nas plantas inoculadas.

2.2.1.4.1 Inoculação de cana-de-açúcar

Plantas micropropagadas de cana-de-açúcar das variedades SP80-1842 e SP80-3240, estágio F3, foram transferidas para substrato *Eucatex* PlantMax® Horticultura (Eucatex) presentes em bandejas plásticas. Primeiramente as plantas recém-transferidas foram aclimatadas a 28°C em câmara úmida durante sete dias. Após esse período as bandejas foram retiradas da câmara úmida e dispostas na bancada em casa de vegetação com temperatura controlada a 28°C . Após 15 dias, as plantas já estavam aclimatadas e com o sistema radicular bem desenvolvido. A linhagem 33.1 foi então adicionada ao substrato numa concentração de 10^8 UFC.planta $^{-1}$. Após 30 dias as plantas foram avaliadas quanto ao aumento da massa seca e produção de proteínas de

resistência. O tratamento controle foi a adição do meio LB sem o microrganismo no substrato. Esse ensaio foi repetido por duas vezes em anos consecutivos.

2.2.1.4.2 Promoção de crescimento vegetal

As 40 plantas de cada tratamento foram coletadas, lavadas em água corrente e então separadas em raiz e parte aérea, que foram individualmente pesadas e armazenadas em sacos de papel em estufa a 55°C até a estabilização dos pesos, quando foi aferida a massa seca das raízes e parte aérea das plantas avaliadas.

2.2.1.4.3 Produção de proteínas de resistência

2.2.1.4.3.1 Extração de proteínas totais

A extração protéica foi realizada por meio da maceração das amostras vegetais da raiz e parte aérea (0,5 g) com 2 mL de tampão Tris HCl 100 mM pH 7,5, contendo 2 mM de PMSF, 1 mM DTT, 1 mM de EDTA e 5% (p/v) de PVPP. Após a maceração a mistura foi centrifugada (10.000 g, 4°C, por 30 minutos) e armazenada a -20°C. A concentração de proteína total obtida foi mensurada de acordo com Bradford (1976). Para cada tratamento, quatro plantas foram utilizadas para extração protéica.

2.2.1.4.3.2 Produção de quitinase e celulase

A quantificação da atividade quitinolítica e celulolítica foi realizada sobre o substrato CM-Chitin-RBV (Loewe) e CMC-RBB (Loewe) respectivamente. O extrato protéico (250µL) foi incubado por 2 horas em reações de 500 µL do substrato CM-Chitin-RBV ou CMC-RBB em tampão Tris-HCl (100 mM pH 7,5) a 40°C. 250 µL de HCl 2 N foram adicionados para parar a reação que foi imediatamente incubada por 10 minutos a -20°C. Após esse período as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 g a temperatura ambiente. A quantificação da atividade enzimática nesses ensaios foi realizada pela leitura da absorbância da reação em cubetas de plástico a 550nm e 600nm, para quitinase e celulase respectivamente. O espectrofotômetro utilizado foi Pharmacia Biotech Ultrospec 3000, e o índice de atividade enzimática (IAE) foi mensurado em $\text{absorbância} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$ do substrato. (GUZZO et al., 1999).

2.2.1.5 Mecanismos de promoção de crescimento de cana-de-açúcar por *P. agglomerans* 33.1

2.2.1.5.1 Produção de Ácido-Indol-Acético (AIA)

Para quantificação da produção de AIA, a linhagem 33.1 foi cultivada em meio tripticaseína de soja (TSB) 10% contendo L-triptofano (5 mM) e incubada no escuro a 28°C por 72 horas. Após este período a cultura foi centrifugada por 5 minutos a 10.000 g. 900 µL do sobrenadante foram coletados e transferidos para cubetas contendo 400 µL do Reagente de Salkowski (BRIC; BOSTOCK; SILVERSTONE, 1991). Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520nm de absorbância. As leituras foram normalizadas por meio da curva padrão com diferentes concentrações de AIA comercial. Como controle positivo foi utilizada a bactéria *E. coli* linhagem DH5- α . (ASSUMPÇÃO et al., 2009). As amostras foram crescidas em triplicatas, sendo o ensaio realizado duas vezes.

2.2.1.5.2 Solubilização de fosfato

Duas diferentes fontes de fosfato foram testadas a fim de avaliar a capacidade da linhagem 33.1 em solubilizar esse mineral. A habilidade da bactéria de solubilizar fosfato de cálcio foi avaliada de acordo com Verma, Landha e Tripathi (2001). As bactérias foram inoculadas em meio de cultura sólido contendo fosfato insolúvel (10 g.L⁻¹ de glicose; 5 g.L⁻¹ de NH₄Cl; 1 g.L⁻¹ de NaCl; 1 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0.8 g.L⁻¹ de Ca₃HP0₄; 15 g⁻¹L de agar; pH 7,2). O meio para verificar a solubilização de fosfato de alumínio continha: 10 g.L⁻¹ de manitol, 2 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 6 g.L⁻¹ de K₂HPO₄ e 15g.L⁻¹ de ágar. Nesse meio foi adicionada uma solução contendo 5,34 g.L⁻¹ de AlCl₃, para formar o precipitado de fosfato de alumínio e o pH ajustado para 4,5 (HARA; OLIVEIRA, 2004). A cultura foi incubada a 28°C por 48 horas e a formação de um halo ao redor da colônia indicou a solubilização de fosfato.

2.2.1.5.3 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

A capacidade da linhagem em realizar o processo de FBN foi avaliada qualitativamente *in vitro*. O meio NFb, livre de nitrogênio, foi preparado contendo a seguinte composição em g.L⁻¹: ácido málico, 5; K₂HPO₄, 0,5; MgSO₄.7H₂O, 0,2; NaCl, 0,1; CaCl₂.2H₂O, 0,02; KOH, 4,5; e em mL: solução de micronutrientes, 2; solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 2; solução de FeEDTA (solução 1,64%), 4; e solução vitaminas, 1; pH 6,5 (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995) Foram utilizados tubos de ensaio de 20 x 70 mm, contendo 10 mL de meio de cultura NFb semi-sólido, onde a linhagem 33.1 foi inoculada com alça de platina em triplicata, a partir de culturas crescidas em meio NFb semi-sólido. A incubação foi realizada por 4 dias a 28°C no escuro. Após esse período foi verificada a formação de disco de crescimento próximo a superfície dos tubos e realizada nova repicagem das bactérias em NFb-semi-sólido. Esse procedimento foi repetido sete vezes consecutivas.

A atividade de nitrogenase foi mensurada após cinco dias de crescimento da linhagem 33.1 em meio semi-sólido NFb por meio de ensaio de redução de acetileno. (HARDY et al., 1968). A preparação do material e a análise de Cromatografia Gasosa foram realizadas no Laboratório de Pós Colheita, Departamento de Produção Vegetal/ESALQ-USP. As amostras foram incubadas em 10% de acetileno por duas horas a 28°C. A atividade de nitrogenase foi expressa em nmoles etileno. hora⁻¹.

2.2.1.6 Alteração da fisiologia de *P. agglomerans* 33.1 durante interação com cana-de-açúcar

Foi realizada a quantificação da produção enzimática da linhagem 33.1 crescida por 4 dias em meio MS, com e sem plantas micropropagadas de cana-de-açúcar (item 2.2.1.2.1). As enzimas avaliadas foram: protease endoglicanase, esterase, lipase e pectinase. A atividade enzimática foi realizada por cultivo das bactérias em meio sólido específico de acordo com a enzima avaliada. Foram utilizados como fonte de inóculo 10 µL do meio MS contendo a linhagem 33.1 mais a planta micropropagada de cana-de-açúcar. Como controle foi utilizado o mesmo volume do meio MS contendo apenas a linhagem 33.1. As culturas foram incubadas a 28°C por 48 horas e então calculado o índice enzimático, que foi expresso pela relação entre a média do diâmetro do halo pela

média do diâmetro da colônia. Para cada enzima avaliada foram utilizadas seis repetições por tratamento, cada parcela continha 4 pontos de inoculação por placa. (HANKIN; ZUCKER; SANDS, 1971; HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975).

2.2.1.6.1 Atividade proteolítica

Para avaliação da atividade proteolítica foi preparado o meio contendo: 5g.L⁻¹ de triptona; 2,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 1 g.L⁻¹ de glicose, 2,5 g.L⁻¹ de NaCl e 18 g.L⁻¹ de ágar, pH 7,0 (Gomes, L.H. - comunicação pessoal). Após esterilização, foram adicionados 100 mL de leite desnatado. Após a incubação a formação de um halo ao redor da colônia indicou atividade proteolítica.

2.2.1.6.2 Atividade endoglicolítica e pectinolítica

A bactéria foi crescida em meio M9 (Sigma) contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de Carboximetilcelulose (CMC) (Nuclear) ou pectina cítrica (Dinâmica) (v/v) e 18 g.L⁻¹ de Agar, pH 7,0. Após o crescimento bacteriano, para avaliação da produção de endoglicanases foram adicionados 10 mL do corante vermelho congo (1%) e posteriormente lavado com NaCl (5 M) segundo a metodologia proposta por Teather; Wood (1982). A secreção de pectinase foi observada adicionando-se ao meio o corante lugol (3 g iodeto de potássio, 1g cristal de iodo, 100 mL de água destilada) e posterior lavagem com água destilada (SUZUKI, 2006). A formação de um halo ao redor da colônia indicou a secreção das enzimas avaliadas.

2.2.1.6.3 Atividade lipolítica e esterolítica

O meio usado para detecção de lipase continha: 10 g.L⁻¹ de peptona, 5 g.L⁻¹ de NaCl, 0,1 g.L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O e 18 g.L⁻¹ de ágar sendo o pH ajustado para 7,4. Após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 20, previamente esterilizado. A formação de um halo formado por cristais ao redor da colônia bacteriana indicou a secreção de lipase pela linhagem avaliada.

A metodologia utilizada para observação da produção de esterase foi a mesma utilizada para lipase, sendo substituído o Tween 20 pelo Tween 80. A produção de esterase foi indicada pela presença de halos claros ao redor da colônia bacteriana

(SIERRA, 1957).

2.2.1.7 Controle de fitopatógenos

Para o ensaio de antagonismo *in vitro* por meio de pareamento foi utilizado o meio de cultura BDA. Em uma extremidade da placa de Petri, foram inoculados 10 µL de solução bacteriana (10^8 UFC.mL⁻¹). No mesmo dia, no centro da placa foi inoculado o isolado fitopatogênico (discos de 2 cm de diâmetro) a ser inibido. Após a inoculação, as culturas foram incubadas a 28°C por cinco dias.

O índice de inibição foi calculado de acordo com o modelo: o raio de crescimento das laterais do fungo que não estavam expostas a ação bacteriana (x2) foram consideradas 100%, a partir desse valor foi calculada a redução do crescimento fúngico nas laterais expostas a ação bacteriana (x1) de acordo com a fórmula: $(x1/x2)*100$. Os isolados foram avaliados em quadruplicatas para cada isolado patogênico e o ensaio repetido duas vezes.

2.2.1.8 Análise estatística

A análise estatística de todos os dados foi realizada com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, considerando os delineamentos experimentais como inteiramente casualizados. As barras apresentadas nos gráficos são os valores dos desvios padrão de cada tratamento. Valores com asteriscos (* ou **) diferem estatisticamente ($\alpha = 0,05$ ou 0,001 respectivamente) de acordo com o teste *t* de Student.

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Estabelecimento da interação planta-microrganismo por produção de biofilme

O comportamento do endófito de *P. agglomerans* 33.1 durante a interação com as plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foi observado por MO e MEV. Em nenhum tempo foram observadas bactérias ou fungos nos tratamentos controle. Por MO, após três dias e durante todo tempo de observação foi visualizada a formação de

biofilme pela linhagem 33.1 na base radicular das plantas. Ao longo do tempo, foi observado o aumento da formação de biofilme sobre a madeira, isto é, os agregados formados pela linhagem 33.1 foram se tornando maiores e mais densos ao longo dos 18 dias de crescimento. Comparando o padrão do biofilme formado na raiz de cana-de-açúcar e na madeira, as bactérias agregaram-se menos ao redor da madeira, formando um biofilme menos espesso que o produzido durante a interação com a planta (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Formação de biofilme pela bactéria endofítica *P. agglomerans*, linhagem 33.1, na superfície de raízes de cana-de-açúcar micropropagada (1) e palitos de madeira (2). As observações foram realizadas após 3 (A), 10 (B) e 18 dias (C) após inoculação bacteriana. As observações microscópicas e captura de imagem foram realizadas pela câmera CCD acoplada ao Microscópio de Fluorescência Axiophot. O aumento de 400X foi utilizado nas imagens: A1, A2, B1, B2 e C2 e 200X na imagem C1

Em nenhum momento foi observada a colonização dos tecidos internos da raiz e/ou parte aérea da cana-de-açúcar, entretanto as células bacterianas associadas às raízes encontraram-se próximas a aberturas das mesmas (dado não apresentado), sugerindo que a mesma poderia colonizar a planta em frequências extremamente baixas, não detectáveis pelos cortes realizados para observação por MO. Por meio da análise da colonização por MEV, foi observado que as bactérias são capazes de

colonizar as plantas de cana-de-açúcar, uma vez que foram encontradas células invadindo fissuras oriundas da formação de raízes laterais (Figura 2.2B) sendo também confirmada a produção de biofilme (Figura 2.2C).

Figura 2.2 - Colonização de cana-de-açúcar e formação de biofilme pela bactéria endofítica *P. agglomerans*, linhagem 33.1. O tratamento controle livre de contaminação (A). Células bacterianas infectando cana-de-açúcar (B) e formação de biofilme na superfície das raízes (C) observados após 3 e 10 dias da inoculação respectivamente. Para observações microscópicas e captura de imagem foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura DSM940A, Zeiss

2.2.2.2 Quorum-sensing – Produção de AHL(s)

Por meio do sistema de detecção baseado na bactéria *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) foi possível observar que a linhagem 33.1 produz moléculas tipo AHLs uma vez que a *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) em contato com a bactéria 33.1 tornou-se azul. Na presença da bactéria *E. coli* (DH5- α), um controle negativo, o biossensor não apresentou coloração azulada (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Detecção da produção de AHLs pelas bactérias: *P. agglomerans*, 33.1 (A) e *E. coli*, DH5- α (controle negativo) (B). A produção de AHLs é confirmada pela coloração azul do biossensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) indicada pela seta

2.2.2.3 Promoção de crescimento vegetal

A linhagem 33.1 inoculada em substrato promoveu o crescimento vegetal das duas variedades avaliadas de cana-de-açúcar: SP80-1842 e SP80-3240. A variedade SP80-1842 apresentou aumento significativo da massa seca da parte aérea, já a variedade SP80-3240, apresentou aumento tanto da massa seca da raiz quanto da parte aérea quando inoculada com *P. agglomerans* 33.1 (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Promoção de crescimento de cana-de-açúcar pela linhagem endofítica *P. agglomerans* 33.1. A linhagem 33.1 foi adicionada em substrato contendo as variedades (A) SP80-1842 e (B) SP80-3240 de cana-de-açúcar aclimatadas. Os dados são a média da massa seca das plantas após 30 dias de inoculação. As barras são os valores dos desvios padrão de cada tratamento. Valores com asteriscos (**) no mesmo tecido e variedade diferem estatisticamente ($\alpha = 0.01$) do tratamento controle de acordo com o teste *t* de Student

2.2.2.4 Indução da produção de proteínas de resistência em cana-de-açúcar

A produção de quitinase pelas plantas de cana-de-açúcar foi estimulada pela presença da linhagem 33.1 sendo significativamente maior nas raízes. O mesmo aconteceu quando avaliada a produção de celulase, a qual apresentou um aumento nas raízes de cana-de-açúcar inoculada (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Produção de proteínas de resistência por cana-de-açúcar

Proteínas de resistência	Índice de atividade enzimática ^a	
	Controle	33.1
Quitinase		
Raiz	2,2 ± 0,4	3,1 ± 0,4**
parte aérea	4,3 ± 0,4	4,4 ± 0,1
Celulase		
Raiz	2,7 ± 0,4	3,9 ± 0,2 *
parte aérea	3,6 ± 0,6	3,2 ± 0,3

^a O índice de atividade enzimática foi calculado pela fórmula: absorvância.mL⁻¹ do substrato. hora⁻¹. Valores com asteriscos (* ou **) diferem estatisticamente do tratamento controle ($\alpha = 0,05$ e $0,01$ respectivamente) de acordo com o teste *t* de Student

2.2.2.5 Avaliação dos mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de cana-de-açúcar pela *P. agglomerans* 33.1

Uma vez observada a promoção de crescimento de cana-de-açúcar pela linhagem 33.1, foram avaliadas as diferentes vias envolvidas na promoção de crescimento vegetal por bactérias: solubilização de fosfato, produção do fitormônio AIA e fixação biológica de nitrogênio.

A linhagem 33.1 foi capaz de solubilizar as duas fontes de fosfato com diferentes graus de eficiência, sendo o fosfato de cálcio o mais solubilizado pela bactéria, uma vez que o índice de atividade enzimática nesse meio foi 3,4 e quando utilizado fosfato de alumínio o índice de atividade enzimática foi 1,72. Além da solubilização de fosfato, a 33.1 também produz AIA, sendo verificada a produção de aproximadamente $100\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA.

A fixação de nitrogênio pela linhagem 33.1 foi confirmada nos sete repiques consecutivos da bactéria em meio NFb. Em todas as repicagens foi observada a formação de uma zona visível de maior crescimento bacteriano abaixo da superfície do meio que foi interpretada como resultado positivo para fixação biológica de nitrogênio. A atividade de nitrogenase foi confirmada por meio da redução de acetileno (ARA), sendo observado a produção de $0,03\text{ nmoles de etileno.h}^{-1}$.

2.2.2.6 Produção de enzimas por *P. agglomerans* 33.1

A linhagem 33.1 produz as enzimas: lipase, esterase, endoglicanase e pectinase não sendo detectada a produção de protease. A linhagem 33.1 sofreu alteração no perfil da produção enzimática durante interação com cana-de-açúcar em meio MS. A linhagem 33.1 parou de produzir lipase, apresentando também uma redução significativa da produção de endoglicanase e pectinase (Tabela 2.2).

2.2.2.7 Inibição de patógenos de cana-de-açúcar

A linhagem 33.1 apresentou uma baixa atividade antagônica contras os isolados patogênicos de cana-de-açúcar. O fitopatógeno *F. verticillioides* FV-01 CTC foi o mais inibido, tendo seu crescimento reduzido em 22% pela ação bacteriana. Já o patógeno *C. paradoxa* não foi inibido pela *P. agglomerans* 33.1.

Tabela 2.2- Alteração fisiológica da linhagem 33.1 durante interação com plantas micropropagadas de cana-de-açúcar

Proteínas	Índice da atividade enzimática ^a	
	sem interação	com interação
Protease	1	1
Lípase	3,35	1*
Esterase	3,93	3,68
Endoglicanase	2,5	1,91*
Pectinase	3,1	2,3*

^a O índice da atividade enzimática foi expresso pela relação entre diâmetro médio do halo e a média do diâmetro da colônia bacteriana. As avaliações foram realizadas com seis repetições para cada tratamento: meio MS contendo a linhagem 33.1 com e sem interação com plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. Valores das médias com asterisco (*) na mesma linha diferem estatisticamente ($\alpha = 0,05$) de acordo com o teste t de Student

2.2.3 Discussão

P. agglomerans (sin: *Erwinia herbicola*) pode ser classificada como uma bactéria cosmopolita, encontrada nos mais diversos ambientes: solo (OMAR; WEINHARD; BALANDREAU, 1989; YEUNG; LEE; WOODARD, 1998), água (MOSSO et al., 1994), insetos (DILLON; VENNARD; CHARNLEY, 2001) e ocasionalmente em humanos (DE CHAMPS et al., 2000). A mesma também merece destaque na agricultura onde tem sido encontrada endofiticamente em inúmeras culturas de importância econômica (HSIEH; HUANG; ERCKSON, 2005). A importância agrônômica de *P. agglomerans* deve-se ao potencial da mesma na promoção de crescimento vegetal (ASIS; ADACH, 2003; LOIRET et al., 2004; MALBOOBI et al., 2009a, 2009b; SINGH et al., 1988; SUBARAN et al., 2009; TSAVKELOVA et al. 2007; VERMA LADHA; TRIPATHI, 2001; ZIMMER; HUNDESHAGEN; NIEDERAU, 1994), controle de fitopatógenos (BARDIN et al., 2003; BONATERRA et al., 2003, PLAZA et al., 2004) além de indução resistência (JEUN et al., 2004; LIU, KLOEPPER, TUZIN, 1995; ONGENA et al., 2000). Dessa forma, no presente estudo, foi avaliada a interação de *P. agglomerans* e cana-de-açúcar a fim de avaliar a sua capacidade em promover o crescimento e a fitossanidade de mudas de cana-de-açúcar em casa de vegetação. A linhagem escolhida foi a 33.1, uma vez que a mesma é conhecida promotora de crescimento de *E. grandis*, espécie vegetal da qual foi isolada (PROCÓPIO, 2004). Os mecanismos de promoção de crescimento pelos quais atuam a linhagem 33.1, bem como a interação da mesma

com outras plantas hospedeiras não haviam sido ainda descritos, sendo assim justificável e de suma importância os dados obtidos no presente trabalho.

A linhagem 33.1 foi capaz de interagir com a cana-de-açúcar, formando biofilme ao redor das raízes e invadindo passivamente as plantas micropropagadas por fissuras oriundas da formação de raízes laterais. Esses resultados estão de acordo com Baldani et al. (1997) que classificaram a espécie *P. agglomerans* como bactérias diazotróficas facultativas, uma vez que habitam tanto a rizosfera como o interior das plantas. As bactérias endofíticas, geralmente são oriundas do solo, inicialmente infectando e colonizando a planta hospedeira por fissuras causadas pela emergência de raízes laterais e então se espalhando rapidamente pelos espaços intercelulares das raízes (CHI, et al., 2005). Outras formas de entrada que existem são os ferimentos causados por nematóides, fitopatógenos ou mesmo estômatos presentes na superfície foliar (McCULLY, 2001), entretanto as fissuras nas raízes são os principais pontos para colonização bacteriana (SØRENSEN; SESSITSCH, 2006).

A formação de biofilme pela linhagem 33.1 deve estar associada à produção de AHLs, pois essas moléculas produzidas por diversas bactérias, apresentam a capacidade de atuar na comunicação celular bactéria-bactéria e bactéria-planta (CHA et al., 1998; GRAM et al., 1999) regulando a expressão gênica que é responsável por diferentes fenótipos. Um dos mecanismos envolvidos com estes reguladores é a produção de compostos antifúngicos (WOOD et al., 1997), formação de biofilme (DAVIES et al., 1998) e produção de polissacarídeos extracelulares, sendo estas características de importância fundamental na interação bactéria-planta. A linhagem 33.1 formou mais consistentemente biofilme durante a interação com planta do que nos palitos de madeira, demonstrando a provável comunicação bactéria-planta mediada pela AHLs, e a regulação dessa produção por exsudados vegetais.

Em relação à importância da formação do biofilme, Morris e Monier (2003) discutem a formação de biofilme como importante fator da interação bactéria-planta, segundo esses autores, quando se observa a associação de bactérias com plantas, esses microrganismos estão na forma de agregados ou biofilmes. Isso ocorre não só na superfície de folhas e raízes, mas também em espaços intercelulares, pois os biofilmes são importantes para formação de microcolônias com funções específicas para cada

grupo bacteriano, as quais não seriam realizáveis fora do biofilme, e, portanto impediria a adaptação destas bactérias em novos habitats como à superfície ou o interior de novos hospedeiros. O presente trabalho por MO e MEV demonstrou a formação de microcolônias de *P. agglomerans* 33.1 fixadas às raízes de cana-de-açúcar.

Monier (2002) discute a importância da formação de biofilme quando co-inoculada as bactérias *P. agglomerans* e *P. syringae* em feijão. Este autor observou maior taxa de mortalidade das bactérias desagregadas e interface do biofilme formado pela co-agregação destas duas bactérias, demonstrando assim a importância do biofilme na sobrevivência e adaptação das bactérias associadas às plantas.

A promoção de crescimento da cana-de-açúcar mediante inoculação da linhagem 33.1 foi observada pelo aumento da massa seca da parte aérea e raízes, sendo testadas duas variedades distintas. Esses dados demonstram que a *P. agglomerans* 33.1 é capaz de promover o crescimento de outras culturas, além de *E. grandis*, sendo consistente o potencial dessa linhagem na promoção de crescimento de cana-de-açúcar e provavelmente de outras espécies vegetais, não havendo apenas a interação bactéria-hospedeiro de origem.

A utilização de inoculantes agrícolas na cultura de soja gera uma economia de milhões, uma vez que a adubação nitrogenada é substituída pela adição nas sementes de linhagens fixadoras de nitrogênio como *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp.. Esses microrganismos são ótimos fixadores de nitrogênio em leguminosas, entretanto a sua eficiência em cana-de-açúcar e outras gramíneas não foi ainda demonstrada. A fixação de nitrogênio por microrganismos que vivem na rizosfera ou endofiticamente em cana-de-açúcar tem sido bem estudada. As bactérias comumente isoladas de tecidos de cana-de-açúcar são *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* (BALDANI et al., 1997, 2002; BODDEY et al., 2003; JAMES, 2000). Outros microrganismos como *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella oxytoca* tem sido encontradas (SAJJAD et al., 2001), entretanto nenhuma dessas espécies são aplicadas atualmente como inoculantes comerciais.

A cultura de tecidos da cana-de-açúcar tem sido utilizada pelos programas de melhoramento devido à redução no tempo de multiplicação de clones e de variedades promissoras, facilitando a rápida obtenção de grandes quantidades de material

propagativo do genótipo de interesse, além da eliminação de um grande número de patógenos (HENDRE et al., 1983). Por essa razão, o presente trabalho visou a promoção de crescimento de mudas de cana-de-açúcar o que possibilitaria um menor tempo das mudas em casa de vegetação reduzindo assim o custo e acelerando a produção das mudas.

Dentre os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal, a linhagem 33.1 foi eficiente na produção de AIA e solubilização de fosfato. Diferentes linhagens de *E. cloacae*, *E. agglomerans* e *P. agglomerans* tem apresentado a capacidade de converter triptofano em AIA (KUKLINSKY-SOBRAL et al, 2004; TSAVKELOVA et al. 2007; ZIMMER; HUNDESHAGEN; NIEDERAU, 1994), as quantidades produzidas pela linhagem 33.1 foram altas e acima dos resultados obtidos por Assumpção et al. (2009) ao testarem isolados de *Enterobacter* e *Pantoea* isolados de soja. A quantidade de AIA produzidos por esses isolados foi de 24 a 39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que a linhagem 33.1 produziu nas mesmas condições utilizadas. quantidades superiores à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Devido à diminuição de fontes naturais de fósforo utilizados na fertilização dos solos agrícola, novas alternativas vêm sendo investigadas, destacando-se os solubilizadores de fosfatos. Nesse contexto, os microrganismos têm participação crucial no ciclo do fósforo, pois podem disponibilizar o mesmo para as plantas por meio da solubilização de fosfato insolúvel (MALBOOBI et al., 2009a). Vários isolados de *P. agglomerans* tem sido descritos como importantes solubilizadores de fosfato (MALBOOBI et al., 2009a, 2009b, VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001), sendo geralmente utilizado fosfato de cálcio como fonte de fósforo. Entretanto, o presente trabalho demonstrou que a linhagem 33.1 é capaz também de solubilizar fosfato de alumínio, em baixo pH, sendo uma grande vantagem na utilização dessa linhagem em solos ácidos onde a fixação de fósforo é maior (LUCHINI, 2008).

Além de promover o crescimento de cana-de-açúcar a linhagem 33.1 estimulou a produção de quitinase e endoglicanase nas raízes das plantas inoculadas, onde provavelmente a bactéria teve maior contato e permaneceu por mais tempo devido à formação de biofilme. Trotel-Aziz et al. (2008) relatam o aumento de resistência de videiras contra *Botrytis cinerea* por indução de resistência, mediante aumento de

quitinases e outros compostos quando as plantas foram inoculadas com o isolado PTA-AF1 de *P. agglomerans*.

Quando avaliada a produção enzimática da linhagem 33.1 com e sem interação com cana-de-açúcar, o padrão de produção enzimática da mesma se alterou, sendo observada uma redução na produção de lipases, endoglicanase e pectinases devido à presença vegetal. As paredes celulares das plantas são constituídas principalmente de celulose, sendo que a lamela média que conecta as paredes celulares consiste principalmente de pectina. Atividade pectinolítica tem sido proposta como a responsável pela invasão de *Azospirillum* spp. nas raízes pela penetração da lamela média e pontos de emergência das raízes laterais (BEKRI et al., 1999; PLAZINSKI; ROLFE, 1985). Apesar do importante papel das pectinases na interação planta-microrganismos e colonização intercelular das raízes, essas enzimas tem sido pouco estudadas em bactérias endofíticas (BARRAS; VAN GIJSEGEN; CHATTERJEE, 1994; REINHOLD - HUREK; HUREK, 1998).

Essas enzimas são também produzidas por patógenos, e, conhecidamente a sua regulação de expressão distingue a sutil diferença entre patógenos e endófitos. Como exemplo, infecções por rizóbios em leguminosas é um delicado balanço, onde baixos níveis de pectinases e celulasas têm sido detectados (JIMENEZ-ZURDO et al., 1996). A degradação da parede celular por rizóbios é limitada para lenta e localizada penetração sem destruição dos cabelos radiculares. As enzimas hidrolíticas devem ser produzidas somente durante os primeiros estágios de infecção, mas não durante a colonização dos tecidos. A porção de atividade enzimática extracelular é portanto um importante determinante de patogenicidade.

P. agglomerans, tem sido descrita como endófito, mas também como fitopatogênica (HINTON; BACON, 1995). Muitos desses patógenos também produzem AIA (ZIMMER; HUNDESHAGEN; NIEDERAU, 1994) e possui a habilidade de degradar polímeros de plantas como celulose e pectina. O presente trabalho demonstrou que a linhagem 33.1 é capaz de produzir diferentes níveis de celulasas e pectinase, sendo a secreção da mesma reduzida na interação com cana-de-açúcar, sugerindo que a expressão dessas enzimas devem ser reguladas durante a interação com as plantas de cana-de-açúcar, com potencial para colonização inter e intracelular sem apresentar

patogenicidade.

Estudos no controle de doença usando *P. agglomerans* endofíticas têm demonstrado que a mesma pode combater diferentes doenças fúngicas: tombamento causado por *Pythium* spp. (BARDIN et al., 2003; LIANG et al., 1996) mofo branco e ferrugem do feijão causados respectivamente por *Sclerotinia sclerotiorum* e *Uromyces appendiculatus* (YUEN et al., 2001). Entretanto, no presente trabalho *P. agglomerans* 33.1 não foi capaz de controlar eficientemente *in vitro* os patógenos *F. verticillioides* e *C. paradoxa* de cana-de-açúcar, causadores de *Pokkah boeng* e podridão abacaxi respectivamente.

Os resultados apresentados no presente trabalho são inéditos, pois se trata do primeiro relato do estudo entre a promoção de crescimento de cana-de-açúcar por uma bactéria endofítica isolada de outro vegetal como *E. grandis*, trazendo uma nova perspectiva no foco de estudo e compreensão da interação endófito-planta e a real viabilidade de aplicação da bactéria *P. agglomerans* 33.1 como inoculante na agricultura.

Referências

ASIS, C. A.; ADACHI, C. A. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.38, p.19–23, 2003.

ASSUMPÇÃO, L. C.; LACAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, p. 503-510, 2009.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI-JÚNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS. 2002. p. 233-268.

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**, London, v. 29, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, Victória, v. 29, p. 417–423, 2002.

BARDIN, S. D.; HUANG, H. C.; LIU, L.; YANKE, L. J. Control, by microbial seed treatment, of damping-off caused by *Pythium* sp. on canola, safflower, dry pea, and sugar beet. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 25, p. 268–275, 2003.

BARRAS, F.; VAN GIJSEGEM, F.; CHATTERJEE, A. K. Extracellular enzymes and pathogenesis of sot-rot *Erwinia*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.32, 210–234, 1994.

BEKRI, M. A.; DESAIR, J.; KEIJERS, V.; PROOST, P.; SEARLE-VAN LEEUWEN, M.; VANDERLEYDEN, J.; VANDE BROEK, A. *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 181, p. 2440–2447, 1999.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, p. 139–149, 2003.

BONATERRA, A.; MARI, M.; CASALINI, L.; MONTESINOS, E. Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, p. 93–104, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.57, p.535–538, 1991.

CHA, C.; GAO, P.; CHEN, Y. C.; SHAW, P. D.; FARRAND, S. K. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by Gram-negative plant associated bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, p. 1119–1129, 1998.

CHI, F.; SHEN, S. H.; CHENG, H. P.; JING, Y. X.; YANNI, Y. G.; DAZZO, F. B. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 7271–7278, 2005.

CONRATH, U.; BECKERS, G. J. M.; FLORS, V.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; JAKAB, G.; MAUCH, F.; NEWMAN, M. A.; PIETERSE, C. M. J.; POINSSOT, B.; POZO, M. J.; PUGIN, A.; SCHAFFRATH, U.; TON, J.; WENDEHENNE, D.; ZIMMERLI, L.; MAUCH-MANI, B. Priming: getting ready for battle. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.19, p.1062–1071, 2006.

DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, P. E. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilm. **Science**, Washington, 280, 295-298, 1998.

DE CHAMPS, C.; LE SEAUX, S.; DUBOST, J. J.; BOISGARD, S.; SAUVEZIE, B.; SIROT, J. Isolation of *Pantoea agglomerans* in two cases of septic monoarthritis after plant thorn and wood sliver injuries. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 460–461, 2000.

DILLON, R. J.; VENNARD, C. T.; CHARNLEY, A. K. Exploitation of gut bacteria in the locust. **Nature**, London, v. 403, p. 851, 2001.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPAB. 1995. 60p.

DÖBEREINER, J.; BODDEY, R. M. Nitrogen fixation in association with gramineae. In: GIBSON, A. H; NEWTON, W. E. (Ed.). **Current perspectives in nitrogen fixation**, Canberra: Australian Academy Science. 1981. p. 305-312.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; McCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. G.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 1139-1147, 1994.

DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 2804-2810, 2000.

FÁVARO, L.C. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2009. 291p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

GRAM, L.; CHRISTENSEN, A. B.; RAVN, L.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Production of acylated homoserine lactones by psychotrophic Enterobacteriaceae isolated from foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 3458-3463, 1999.

GUNASINGHE, R. N.; IKIRIWATTE, C. J.; KARUNARATNE, A. M. The use of *Pantoea agglomerans* and *Flavobacterium* sp to control banana pathogens **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Ashford, v. 79, p. 1002-1006, 2004.

GUZZO, S. D.; HAKAKA, R.; KIDA, K.; MARTINS, E. M. F.; ROVERATTI, D. S. Proteção de cafeeiros contra *Hemileia vastatrix* por cloreto de benzalcônio (composto de amônio quaternário). **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 25, p. 339–345, 1999.

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

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, Lancaster, v. 67, p. 597-607, 1975.

HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D. C. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 22, p. 205-209, 1971.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álcos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, p. 343-357, 2004.

HARDOIM, P. S.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, p. 463-471, 2008.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 43, p. 1185–1207, 1968.

HENDRE, R. R.; IVER, R. S.; KOTWAL, M.; KHUSPE, S. S.; MASCARENHAS, A. F. Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. **Sugar Cane**, Manchester, v. 1, p. 5-8. 1983.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 129, p. 117–125, 1995.

HSIEH, T. F.; HUANG, H. C.; ERICKSON, R. S. Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans* **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, p. 608–614, 2005.

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

JEUN, Y. C.; PARK, K. S.; KIM, C. H.; FOWLER, W. D.; KLOEPPER, J. W. Cytological observation of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 39-42, 2004.

JIMENEZ-ZURDO, J. I.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ- MOLINA, E. Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 28, p. 917–921, 1996.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1244-1251, 2004.

LIANG, X. Y.; HUANG, H. C.; YANKE, L. J.; KOZUB, G. C. Control of damping-off of safflower by bacterial seed treatment. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 18, p. 43-49, 1996.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Lancaster, v. 85, p. 695-698, 1995.

LOIRET, F. G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODE, P.; RODE'S, R.; DONG, Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, p. 504-511, 2004.

LUCHINI, I. **Fósforo disponível em solos ácidos e corrigidos com aplicação de fosfatos solúvel, reativo e natural**. 2008. 33p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista, Unoeste, Presidente Prudente, 2008.

MALBOOBI, M. A.; OWLIA, P.; BEHBAHANI, M.; SAROKHANI, E.; MORADI, S.; YAKHCHALI, B.; DELJOU, A.; HERAVI, K.M. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, 1471-1477, 2009a.

MALBOOBI, M. A.; BEHBAHANI, M.; MADANI, H.; OWLIA, P.; DELJOU, A.; YAKHCHALI, B.; MORADI, M.; HASSANABADI, H. Performance evaluation of potent phosphate solubilizing bacteria in potato rhizosphere. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 25, p. 1479-1484, 2009b.

MARQUES, L. L. R.; CERI, H.; MANFIO, G. P.; REID, D. M.; OLSON, M. E. Characterization of biofilm formation by *Xylella fastidiosa* in vitro. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 86, p. 633-638, 2002.

MCCULLY, M.E. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's view. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, p. 983-990, 2001.

MONIER, J.M. **Biological significance of bacterial aggregation of leaf surfaces: The social life of epiphytic bacteria**. Berkeley: University of California. 2002. 176p.

MORRIS, C.E.; MONIER, J.M. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 429-53, 2003.

MOSSO, M. A.; DE LA ROSA, M. C.; VIVAR, C.; MEDINA, M. R. Heterotrophic bacterial populations in the mineral waters of thermal springs in Spain. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.77, p. 370-381, 1994.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

OMAR, A. M. N.; WEINHARD, P.; BALANDREAU, J. Using the spermosphere model technique to describe the dominant nitrogen-fixing microflora associated with wetland rice in two Egypt soils. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 7, p. 158–163, 1989.

ONGENA, M.; DAAYF, F.; JACQUES, P.; THONART, P.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C.; BELANGER, R. R. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. **Plant Pathology**, London, v. 49, p. 523–530, 2000.

PILLAY, V. K.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 354–361, 1997.

PLAZA, P.; USALL, J.; SMILANICK, J. L.; LAMARCA, N.; VINAS, I. Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, p. 781-786, 2004.

PLAZINSKI, J.; ROLFE, B. G. Analysis of the pectolytic activity of *Rhizobium* and *Azospirillum* strains isolated from *Trifolium repense*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 120, p. 181–187, 1985.

PROCÓPIO, R.E.L. **Diversidade bacteriana endofítica de *Eucalyptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 115p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Bimédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RAMAMOORTHY, V.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SMAIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, p. 1–11, 2001.

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

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.19, p. 827–837, 2006.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 278, p. 1–9, 2008.

SAJJAD, M.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 237, p. 47–54, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2344p.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C. P. Endophytic colonization of spruce by growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, p. 191-196, 1999.

SIERRA, G. A. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 28, p. 15-22, 1957.

SINGH, M.; KREUTZER, R.; ACKER G.; KLINGMÜLLER, W. Localization and physical mapping of a plasmid-borne 23-kb nif gene cluster from *Enterobacter agglomerans* showing homology to the entire nif gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* M5a1 **Plasmid**, New York, v. 19, p. 1-12, 1988.

SØRENSEN, J.; SESSITSCH, A. Plant-associated bacteria lifestyle and molecular interactions. In: van Elsas, J. D.; Jansson; J. K.; Trevors, J.T. (Ed.). **Modern soil microbiology**. 2nd ed. Fort Collins: CRC Press, 2006. p. 211–236.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 67, p. 491-502, 2003.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 19, p. 1–30, 2000.

SULBARAN, M.; PÉREZ, E.; BALL, M. M.; BAHSAS, A.; YARZABAL, L. A. Characterization of the mineral phosphate-solubilizing activity of *Pantoea agglomerans* MMB051 isolated from an iron-rich soil in Southeastern Venezuela (Bolívar State) **Current Microbiology**, New York, v. 58, p. 378–383, 2009.

SUZUKI, M. T. **Isolamento, identificação e caracterização de linhagens de *Bacillus thuringiensis* de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2006. 86p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SZENTHE, A.; PAGE, W. J. Quorum sensing in *Agrobacterium tumefaciens* using N-oxo-Acyl-homoserine lactone chemical signal. In: WORKSHOP/CONFERENCE OF THE ASSOCIATION FOR BIOLOGY LABORATORY EDUCATION. 24., 2002, Louisiana. **Proceedings ... Louisiana: ABLE**. 2002. p 145-152.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 43, p. 777–780, 1982.

TROTEL-AZIZ, P.; COUDERCHET, M.; BIAGIANTI, S.; AZIZ, A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 64, p. 21–32, 2008.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 162, p. 69–76, 2007.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 36, p. 453–483, 1998.

VAN OVERBEEK, L.; VAN ELSAS, J. D. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 64, p. 283–296, 2008.

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

VON BODMAN, S. B.; MAJERCZAK, D. R.; COPLIN, D. L. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 7687–7692, 1998.

WOOD, D. W.; GONG, F.; DAYKIN, M. M.; WILLIAMS, P.; PIERSON, L. S. N-acetyl-homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 179, p. 7663–7670, 1997.

YEUNG, K. F.; LEE, K. M.; WOODARD, R. W. Isolation and identification of two l-azetidine-2-carboxylic acid-degrading soil microorganisms, *Enterobacter agglomerans* and *Enterobacter amnigenus*. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 61, p. 207–211, 1998.

YUEN, G. Y.; STEADMAN, J. R.; LINDGREN, D. T.; SCHAFF, D. JOCHUM, C. Bean rust biological control using bacterial agents. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, p. 395–402, 2001.

ZIMMER, W.; HUNDESHAGEN, B.; NIEDERAU, E. Demonstration of the indolepyruvate decarboxylase gene homologous in different auxin producing species of the Enterobacteriaceae. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, p. 1072–1076, 1994.

3 COLONIZAÇÃO CRUZADA DE CANA-DE-AÇÚCAR POR *Pantoea agglomerans* 33.1

Resumo

A capacidade de colonizar plantas é uma característica favorável aos microrganismos com potencial de aplicação na agricultura visando a promoção de crescimento vegetal e o antagonismo de pragas e fitopatógenos. Um ponto importante a ser avaliado é o comportamento desses microrganismos, sendo necessário o desenvolvimento de ferramentas capazes de monitorar esses organismos no ambiente ou quando associado à planta hospedeira. O método direto, baseado no re-isolamento, é uma das técnicas mais utilizadas no monitoramento de microrganismos. Por técnicas baseadas em biologia molecular, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), detecta-se a presença de fragmentos específicos do DNA microbiano no hospedeiro, sem a necessidade de cultivá-lo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da linhagem endofítica *Pantoea agglomerans* 33.1 colonizar cana-de-açúcar. A linhagem endofítica foi transformada com o plasmídio integrativo pNKGFP e adicionada em meio de cultura e substrato contendo mudas de cana-de-açúcar. O monitoramento da colonização de cana-de-açúcar foi realizado por re-isolamento e PCR quantitativo (qPCR). *Primers* específicos foram desenhados e testados quanto aos parâmetros de especificidade e sensibilidade. Os resultados obtidos por re-isolamento e qPCR foram similares e provaram que a linhagem 33.1:pNKGFP é capaz de colonizar as plantas de cana-de-açúcar. Foi observado um predomínio da colonização da rizosfera da cana-de-açúcar pela linhagem 33.1:pNKGFP. Comparando as duas técnicas empregadas, os resultados obtidos por qPCR apresentaram uma menor variação entre as repetições e conseqüentemente um coeficiente de variação menor. A densidade da comunidade bacteriana associada à cana-de-açúcar não foi afetada pela adição das linhagens 33.1 e 33.1:pNKGFP em substrato. No presente trabalho, foi desenvolvido um plasmídio integrativo, pNKGFP, que possibilitou a marcação da linhagem 33.1, provando a colonização cruzada de cana-de-açúcar por esse endófito.

Palavras-chave: Colonização cruzada; Monitoramento, Plasmídio; GFP; qPCR; Re-isolamento

3 SUGARCANE CROSS-COLONIZATION BY *Pantoea agglomerans* 33.1

Abstract

Plant-colonization activity is an important characteristic of micro-organisms with potential agricultural application as plant-growth promoters and plant-pathogen antagonists. The behavior of these micro-organisms must be evaluated, thus necessitating the development of tools that are able to monitor these organisms in the environment or in association with plants. Direct methods of monitoring are based on re-isolation. Indirect methods are based on molecular biology, such as polymerase chain reaction (PCR). This technique detects DNA fragments of the micro-organism inside the host, without the need to culture them. The aim of this work was to evaluate the *Pantoea agglomerans* 33.1 capacity to colonize sugarcane. The endophyte harboring the integrative plasmid pNKGFP, 33.1:pNKGFP, was added in liquid media and substrate containing sugarcane seedlings. The sugarcane colonization was evaluated by re-isolation and qPCR. Specific primers were designed and tested regarding sensitivity and specific parameters. The re-isolation and qPCR results were similar and proved that the 33.1:pNKGFP is able to colonize sugarcane. The highest 33.1:pNKGFP density was observed in rhizosphere plant. Comparing the two techniques, the qPCR results had fewer variables among the replicates and, consequently, a minor coefficient of variation. The addition of 33.1 and 33.1:pNKGFP in substrate had no effects on the bacterial density sugarcane-associated. In this work, an integrative plasmid pNKGFP was developed. It became possible to monitor 33.1:pNKGFP during sugarcane cross-colonization.

Keywords: Cross-colonization; Monitoring; Plasmid; GFP; qPCR; Re-isolation

3.1 Introdução

Endófitos são microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro ou formar estruturas externas visíveis (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; HOLLIDAY, 1989; MENDES; AZEVEDO, 2007; SCHULZ; BOYLE, 2006), podem ser usados no controle biológico de patógenos ou para a promoção de crescimento de plantas. As espécies pertencentes ao grupo das enterobacteriáceas como exemplo: *Enterobacter* sp. (BODDEY et al., 1991; MIRZA et al., 2001), *Klebsiella* (Mirza et al., 2001), *Enterobacter cloacae* e *Erwinia herbicola* (agora *P. agglomerans*) (RENNIE et al., 1982), são geralmente consideradas preferencialmente colonizadoras de rizosfera de cana-de-açúcar e outras gramíneas (ZAKRIA et al., 2008). Entretanto há estudos em que membros de enterobacteriáceas têm sido isolados endofiticamente do interior de várias plantas de importância econômica. Asis; Adachi (2003) isolaram *P. agglomerans* do interior de ramos de batata. Isolados de *P. agglomerans* obtidos de sementes de arroz irrigado foram capazes de re-colonizar essas plantas (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001; VERMA et al., 2004). Além disso, *P. agglomerans* tem sido descrita como endofítica de várias gramíneas como milho, trigo e cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1986; CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988; DONG et al., 1994; LOIRET et al., 2004; NUNEZ; COLMER, 1968; RUPPEL et al., 1992). Todos esses isolados possuem um enorme potencial na agricultura, devendo ser realizados estudos a fim de observar se os mesmos são realmente capazes de colonizar a planta de onde foram isoladas ou hospedeiros pertencentes a outra família vegetal.

Atualmente, discute-se a capacidade de bactérias endofíticas em colonizar uma vasta gama de hospedeiros de interesse agrícola, sendo esse mecanismo denominado colonização cruzada. Entretanto o estudo desse fenômeno é ainda incipiente no Brasil. Em um dos poucos estudos relatando a colonização cruzada com enterobacteriáceas, Zakria et al. (2008) provaram que as linhagens de *Pantoea* sp. (18-2), isolado de batata doce e *Enterobacter* sp. (35-1), isolado de cana-de-açúcar podem se estabilizar endofiticamente em arroz e promover o crescimento do mesmo, sugerindo assim, a falta de especificidade pelo hospedeiro.

A mais antiga técnica empregada para monitoramento de microrganismos é a semeadura em meio de cultura. Entretanto, dentre as várias limitações que esta técnica

oferece, a demora dos resultados é um fator importante a ser considerado. Recentemente, vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos para monitoramento de espécies bacterianas no ambiente ou no interior do hospedeiro. Por exemplo, os métodos baseados em genes marcadores ou PCR têm se demonstrado muito úteis (ATLAS, 1992; SAYLER; LAYTON, 1990). Como exemplo, Thiem et al. (1994) distinguiram um isolado degradador de 3-clorobenzoate, *Pseudomonas* sp. (B13), após inoculação em aquífero por amplificação de PCR e sonda de uma região única de DNA presente nesse isolado.

Alternativamente, o uso de biomarcadores é uma importante ferramenta para identificação da bactéria na natureza. Genes marcadores ou biomarcadores são definidos como uma sequência de DNA introduzida num organismo que confere um genótipo ou fenótipo específico, capaz de ser monitorado num dado ambiente (JANSSON; DE BRUIJN, 1999). Um biomarcador bastante utilizado no monitoramento de inoculantes agrícolas é o gene da *gfp* (*green fluorescence protein* - GFP). A grande vantagem desses biomarcadores em relação aos demais é que a GFP necessita apenas da luz ultravioleta (UV) para brilhar, e, nenhum outro recurso adicionado ao meio. A GFP tem sido otimizada como biomarcador (TOMBOLINI; JANSSON, 1998; UNGE et al., 1997), sendo hoje encontrada uma vasta gama de fluoróforos: vermelho, azul, amarelo, entre outros.

A técnica de qPCR, a partir de equipamentos específicos e por meio da fluorescência combina: amplificação, detecção e quantificação em uma única reação, sendo utilizada para detecção de vários microrganismos no ambiente (BASSLER et al., 1995; CUBERO; GRAHAM, 2002; LACAVA et al., 2006; MAREFAT; OPHEL-KELLER; McKAY, 2007). As técnicas de qPCR mais utilizadas são a TaqMan qPCR, o Scorpion qPCR e o SYBR Green qPCR.

O qPCR independente do mecanismo de fluorescência empregado, tem sido abundantemente utilizado para quantificar e estudar bactérias de importância clínica como *Listeria monocytogenes* (BASSLER et al., 1995), *Mycobacterium tuberculosis* (DESJARDIN et al., 1998) e *Borrelia burgdoferi* (PAHL et al., 1999) e bactérias fitopatogênicas como *Xylella fastidiosa* (OLIVEIRA et al., 2002), *Ralstonia solanacearum* (WELLER et al., 2000), *Xanthomonas campestris* (CUBERO; GRAHAM,

2002), *Clavibacter michiganensis* subsp. *Insidiosus* (MAREFAT; OPHEL-KELLER; McKAY, 2007), *Erwinia amylovora* (BELLIS; SCHENA; CARIDDI, 2007).

Recentemente, essa técnica tem sendo utilizada em estudos de bactérias endofíticas, Lacava et al. (2006) utilizaram a qPCR para estudar a interação de uma bactéria endofítica *Methylobacterium mesophilicum* (SR1.6/6) com planta modelo durante o desenvolvimento da doença causada pela bactéria fitopatogênica *X. fastidiosa*.

A linhagem de *P. agglomerans* 33.1, previamente isolada de *E. grandis*, é capaz de promover o crescimento do seu hospedeiro original, e recentemente foi descrita como promotora de crescimento de cana-de-açúcar (capítulo 2). No presente trabalho foi desenvolvido um plasmídio integrativo, pNKGFP, para marcação de *P. agglomerans* 33.1 visando seu monitoramento durante interação com cana-de-açúcar. A colonização cruzada de cana-de-açúcar por *P. agglomerans* 33.1 foi também avaliada por meio de re-isolamento e qPCR.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Materiais e Métodos

3.2.1.1 Microrganismos e plasmídios utilizados

P. agglomerans, linhagem 33.1 foi geneticamente modificada com o plasmídio pNKGFP para monitoramento da colonização cruzada em de cana-de-açúcar. As linhagens *Escherichia coli*: DH5- α TOP-10 (Invitrogen) e DH5- α pir, gentilmente cedida por Dr. Prof. Frédéric Boccard (Centre de Génétique Moléculaire du CNRS - França) foram utilizadas como hospedeiras para os experimentos de clonagem e de qPCR. As linhagens utilizadas foram crescidas em meio Luria Bertani - LB (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) suplementado com glicerol (15%) e o antibiótico apropriado (50 μ g.mL⁻¹) e estocadas à -80°C. Todos os experimentos foram iniciados com culturas frescas crescidas primeiramente em meio LB a temperatura apropriada (Tabela 3.1).

Para a extração dos plasmídios, *E. coli* foi crescida em 5 mL de meio LB adicionado com a marca de resistência específica de cada plasmídio e incubada a 37°C

sob agitação (200 rpm) por 18 horas, o precipitado obtido pela centrifugação dessas suspensões bacterianas foram utilizados na extração plasmidial por Kit de Extração (Mobio).

A integridade e a concentração dos DNAs e plasmídios extraídos durante o trabalho foram verificadas em gel de agarose 1,2%, a 3 volts.cm⁻¹ juntamente com o marcador de peso molecular λ (Fermentas). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg.mL⁻¹) e fotodocumentado sobre luz UV.

3.2.1.2 Construção do plasmídio pNKGFP

O gene da GFP foi obtido por amplificação a partir de *primers* desenvolvidos com sequências do gene *gfp* presente no plasmídio pMUT-GFP. Na reação de PCR foram utilizados os *primers*: PGFPF - 5'-TACGCCGAATTCAAGCTTGCATGCCTGCAGG-3' (adiante) e PGFPR - 5'-GGCCCGGAATTCTACGGCCGACTAGTAGGTC-3' (reverso). As condições da PCR utilizadas foram: 5 minutos a 94°C; 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 55°C e 1 minuto a 72°C; extensão final de 4 minutos a 72°C. As reações de 25 μ L foram compostas por 2,5 μ L de tampão para PCR (Invitrogen); 0,05 μ L de cada *primer* (100 μ M); 1,5 μ L MgCl₂ (50 mM); 2,5 μ L dNTP (2,5 mM de cada); 1 unidade de Taq Polimerase (Invitrogen) e 1 μ L do plasmídio pMUT-GFP.

Com o objetivo de clonar o gene *gfp* no vetor integrativo pNKBOR, o mesmo foi clivado de acordo com Sambrook e Russel (2001) com enzima de restrição *Bam*HI (Gibco) por 2 horas a 37°C e em seguida purificado (GFX - Gel Purification Kit - Pharmacia). O vetor linearizado com terminais abruptos foi tratado com as enzimas T4 DNA Polimerase (Invitrogen) por 15 minutos (11°C) e Klenow (Invitrogen) por 15 minutos (temperatura ambiente). Em seguida o DNA foi separado em gel de agarose (1% *low melting* temperature agarose - Gibco) e o DNA linearizado (5,198 Kb) foi purificado (GFX - Gel Purification Kit - Pharmacia), e em seguida defosforilado (Invitrogen).

Tabela 3.1 - Plasmídios e linhagens bacterianas utilizados no trabalho

Plasmídios e Bactérias	Descrições relevantes	Referência
Plasmídios		
pNKBOR	Km ^r <i>miniTn10</i>	Rossignol et al. (2001)
pNKGFP	Km ^r <i>miniTn10</i> , GFP	Presente trabalho
pUC18	Ap ^r	Perron, Viera e Messing (1985)
pCM88	Tetra ^r , GFP	Marx e Lindstrom (2001)
pSMC21	Ap ^r , Km ^r , GFP	Kuchma et al. (2005)
pUC4K	Km ^r	Taylor e Rose (1988)
pJTT	Km ^r <i>cry1Ac7</i>	Downing; Leslie e Thomson (2000)
pGEMT-easy	Ap ^r	Promega
pMUT-GFP	Ap ^r , GFP	Clontech Laboratories
pEGLA	Ap ^r , <i>EgIA</i>	Lima et al. (2005)
pDsRed		Brandl e Mandrell (2002)
Bactérias		
DH5- α - λ pir	<i>recA1 endA1 hsdR1 relA1 $\lambda::pir$</i>	Kolter, Inuzuka e Helinski (1978)
33.1	Isolado de <i>Eucalipto ssp.</i>	Procópio, (2004)
33.1:pDsRed	33.1 contendo pDsRed	Ferreira, A. (não publicado)
33.1:pNKGFP	33.1 contendo pNKGFP	Presente trabalho
33.1:pUC4K	33.1 contendo pUC4K	Presente trabalho

Ao vetor, foi então ligado (T4 DNA ligase - Invitrogen) ao gene *gfp* amplificado, sendo que este foi previamente tratado com T4 DNA Polimerase, Klenow e defosforilase como indicado acima. Após a reação de ligação (24 horas a 14°C), o produto da mesma foi introduzido por eletroporação (Gene Pulser, BioRad - 2,5 Kv, 25 μ F, 400 Ω , cubetas de 0,2 cm) em células eletrocompetentes de *E. coli* (DH5- α pir).

As células foram semeadas e incubadas por 18 horas a 37°C em meio sólido LB mais canamicina (50 μ L.mL⁻¹). Os clones que continham o produto da ligação e estavam expressando o gene da GFP foram selecionados por meio da observação da fluorescência em luz ultravioleta.

3.2.1.3 Transformação de *P. agglomerans* 33.1 com o plasmídio pNKGFP

Culturas eletrocompetentes da linhagem 33.1 foram obtidas a partir da inoculação de uma colônia bacteriana em 5 mL de meio LB líquido incubando a 28°C por 18 horas a 250 rpm. Após o crescimento, 1 mL da cultura foi transferido para 50 mL de LB e incubados a 28°C a 180 rpm até atingir a densidade óptica (DO_{600nm}) de 0,7 medida em espectrofotômetro (Ultrospec 3000 Amersham Pharmacia Biotech). Em seguida a cultura foi centrifugada a 3.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi

descartado e o precipitado ressuspenso em água deionizada esterilizada e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o precipitado bacteriano ressuspenso em glicerol 10% e centrifugado. O sobrenadante foi novamente descartado. O precipitado foi ressuspenso em glicerol 10% ($DO_{600nm} = 0,15$) para diluição de 500X e distribuído em alíquotas de 100 μ L que foram estocadas a -80°C .

O plasmídio quantificado (100ng) foi adicionado a 100 μ L da cultura eletrocompetente e introduzidos por eletroporação (Gene Pulser, BioRad - 2,5 kV, 25 μ F, 200 Ω , cubetas de 0,2 cm). As células eletroporadas foram semeadas e incubadas por 18 horas a 28°C em meio sólido LB adicionado de canamicina. Vários clones resistentes a canamicina e que expressavam o gene da GFP foram estocados a -80°C . Um dos clones foi selecionado para realização dos ensaios posteriores sendo então denominado linhagem 33.1:pNKGFP.

3.2.1.4 Teste de estabilidade da expressão da GFP

Uma colônia da linhagem 33.1:pNKGFP foi inoculada em 5 mL de LB adicionados de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina e incubados sob agitação (180 rpm) a 28°C por 18 horas. Após este período, 50 μ L da cultura bacteriana foram adicionadas em 50 mL de LB sem canamicina e após 24 horas de crescimento nas condições citadas acima, alíquotas da cultura foram diluídas e semeadas em placas de LB sólido sem antibiótico e incubadas a 28°C por 24 horas. Após esse período, foram selecionadas aleatoriamente 100 colônias, as quais foram inoculadas em LB sólido mais antibiótico, incubadas por 24 horas a 28°C , e, feita a avaliação do número de bactérias portadoras que expressaram o gene da GFP. O mesmo procedimento foi realizado para avaliação da estabilidade de expressão da GFP após 48, 72 e 146 horas na ausência de pressão de seleção. A expressão da GFP foi observada por meio de fluorescência em luz ultravioleta.

3.2.1.5 Southern Blot

O *Southern Blot* foi realizado para verificação da inserção do fragmento do plasmídio pNKGFP no cromossomo da linhagem 33.1:pNKGFP.

3.2.1.5.1 Extração de DNA bacteriano

As linhagens 33.1 e 33.1:pNKGFP foram crescidas separadamente em 4 mL de meio tripticaseína de soja (TSB) a 28°C por 48 horas sob agitação (180 rpm). No precipitado obtido pela centrifugação de cada suspensão foram adicionados 700 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM), 30 µL de SDS 10% e 0,5 g de sílica (0,1 mm). Em seguida, a suspensão foi agitada no Homogeneizador de células (Ação Científica) por 30 segundos a 3.500 g e em seguida centrifugada por 10 minutos a 10.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionados 500 µL de fenol, a suspensão foi homogeneizada por inversão e centrifugada nas condições anteriores. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionados 500 µL de clorofórmio. A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada novamente. O sobrenadante foi então transferido para novo tubo com 500 µL de fenol/clorofórmio (1:1), homogeneizado, centrifugado e coletado, sendo então adicionados 0,1 do volume de NaCl (5 M) e 0,6 do volume de isopropanol. A mistura foi deixada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada por 15 minutos a 10.000 g. O DNA foi lavado com etanol 70 %, seco a 40°C por 20 minutos e ressuspenso em 50 µL de água deionizada esterilizada.

3.2.1.5.2 Restrição do DNA genômico e transferência para membrana de náilon

Os DNA's extraídos foram clivados com a enzima de restrição *EcoRI* (Invitrogen). As reações de restrição em um volume total de 250 µL, contendo 7,5 µg de DNA bacteriano ou 500 ng do plasmídeo pNKGFP, 25 µL de tampão React[®] 3 10X e 40U da enzima *EcoRI* foram incubadas a 37°C durante 12 horas. Para concentrar foi realizada uma precipitação adicionando 25 µL de acetato de amônio (7,8 M) e 625 µL de álcool absoluto. Após incubação a -20°C por 12 horas, o material foi centrifugado (10.000 g por 40 minutos a 4°C). O sobrenadante foi descartado e adicionados 700 µL de álcool 70%. As amostras foram centrifugadas por mais 10 minutos (10.000 g, 4°C). O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado seco a 37°C. Após a secagem, o DNA hidrolisado foi ressuspenso em 32 µL de TE e 8 µL de sacarose 40%. Os 40 µL de DNA foram aplicados em gel de agarose 1%. Foi utilizado como marcador de peso molecular 40 µL do DNA Ladder 1kb (0,2µg.µL⁻¹) (Fermentas). A eletroforese foi

realizada a 1 volts.cm⁻¹. O gel foi posteriormente corado com brometo de etídio (1,0 mg.mL⁻¹) e fotodocumentado.

O gel de agarose foi então submetido à depurinização por incubação em 500 mL de solução HCl 0,25 M por 10 minutos. Após este período, o gel foi lavado com água destilada e transferido para 500 mL de solução desnaturante (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) por 30 minutos. O gel foi lavado novamente com água destilada e em seguida neutralizado por incubação por 15 minutos em 250 mL de solução neutralizadora (Tris-HCl 0,5 M; NaCl 1,5 M; EDTA 0,001 M; pH 7,2), com agitação branda à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Por capilaridade, o DNA contido no gel foi transferido para a membrana de náilon (HYBOND-N+ – AMERSHAMP), sendo utilizada a solução de transferência SSC 20X (NaCl 3 M; citrato de sódio 0,3 M; pH 7,0). O DNA foi fixado à membrana por aquecimento (80°C por 2 horas) e então armazenada à temperatura ambiente.

3.2.1.5.3 Preparo da sonda e hibridação molecular

Para a hibridação foi utilizado como sonda um fragmento de DNA contendo uma região interna ao sítio de inserção do plasmídeo pNKBOR. Este fragmento foi obtido por PCR com os *primers* PPNKF (5' - CCT TCA TTA CAG AAA CGG C - 3') e PPNKRII (5' - GGT GAT GCG TGA TCT GAT CC- 3'). A marcação da sonda e a hibridação foram realizadas segundo o protocolo do kit Gene ImagesTM AlkPhos DirectTM Labelling and Detection System (GE Healthcare).

3.2.1.6 Colonização de cana-de-açúcar pela linhagem 33.1:pNKGFP

As plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) utilizadas no experimento foram gentilmente cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, SP. As plantas micropropagadas utilizadas eram da variedade SP80-1842 e estavam em estágio F3 na cultura *in vitro*. Foram realizados dois distintos experimentos para avaliação da colonização de cana-de-açúcar pela linhagem 33.1:pNKGFP.

3.2.1.6.1 Experimento 1 – Colonização de plantas micropropagadas

A colonização das plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade convencional SP80-1842, foi avaliada utilizando-se as linhagens 33.1, 33.1:pNKGFP e 33.1:pDsRed que foram cultivadas até a fase log de crescimento em meio LB e então adicionadas, 10^5 UFC.mL⁻¹, em Meio Murashige e Skoog – MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) contendo as plantas micropropagadas. O tratamento controle foi a adição de meio de cultura LB sem crescimento bacteriano. Todas as amostras foram incubadas a 28°C em estufa com fotoperíodo controlado de 16 horas de luz.

3.2.1.6.2 Experimento 2 - Colonização de plantas aclimatadas em casa de vegetação

A aclimação e inoculação das plantas de cana-de-açúcar foram realizadas de acordo com a metodologia descrita no capítulo 2 (item 2.2.1.4.1). O tratamento controle consistiu da adição do meio de cultura LB sem crescimento bacteriano.

3.2.1.7 Observações por Microscopia Óptica de Fluorescência

Nos ensaios de MOF foram utilizadas as plantas provenientes do experimento 1 (item 3.2.1.6.1), sendo os materiais dispostos em lâmina com água e visualizados imediatamente. A captura da imagem foi realizada pela câmera CCD acoplada ao Microscópio de Fluorescência Axiophot, com utilização do filtro para excitação em luz ultravioleta. Foram utilizadas três amostras para cada tratamento e tempo avaliado. Durante 18 dias foram realizadas várias coletas das amostras das plantas.

3.2.1.8 Monitoramento por qPCR da linhagem 33.1:pNKGFP em cana-de-açúcar

Após 5 e 14 dias da inoculação bacteriana em meio MS contendo as plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, foram realizadas coletas de amostras vegetais para posterior extração de DNA e quantificação por qPCR.

Após obtenção das bactérias aderidas na superfície das raízes (item 3.2.1.8.2) e antes da extração de DNA total (item 3.2.1.8.1), as amostras vegetais foram lavadas em água corrente, sendo então desinfestadas de acordo com a metodologia proposta por Araújo et al. (2002).

3.2.1.8.1 Extração de DNA total

O DNA total de plantas de cana-de-açúcar, raiz e parte aérea foi extraído de acordo com a metodologia adaptada de Doyle e Doyle (1987). Para tanto, 50-100 mg de tecido vegetal, previamente desinfestados, foram macerados em cadinho de porcelana (previamente aquecido a 180° C por 6 horas) na presença de 1 mL de tampão de extração (NaCl 1,4 M; TrisHCl 100 mM pH 8; EDTA 20 mM pH8; PVP-40 1% ; CTAB 2%; Proteinase-K 100 µg/mL e β-mercaptoetanol 1%). O material macerado foi então transferido para microtubos (1,5 mL) e incubado por 20 minutos a 55°C, sendo o mesmo homogeneizado suavemente a intervalos de 10 minutos. Após o período de incubação, as amostras permaneceram por 5 minutos à temperatura ambiente e então foram adicionados 600 µL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico na relação de 24:1) sendo a solução homogeneizada até formar uma emulsão. Os microtubos foram centrifugados a 10.000 g a temperatura ambiente por 7 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para novo tubo e então foram adicionados 200 µL de tampão de extração (sem β-mercaptoetanol e sem proteinase-K) e 650 µL de CIA, sendo novamente as amostras homogeneizadas por inversão dos tubos. Novamente os tubos foram centrifugados a 10.000 g, temperatura ambiente por 7 minutos. A fase aquosa superior foi novamente transferida para outro tubo novo, sendo esse procedimento repetido mais uma vez.

Após a centrifugação, a fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo e então adicionados 600 µL de isopropanol para precipitar o DNA à temperatura ambiente. Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g, 4°C por 15 minutos e o sobrenadante descartado suavemente. O precipitado foi lavado com 600 µL etanol 70%, incubado no freezer por 20 minutos e então centrifugado por 15 minutos a 4°C, 10.000 g. O sobrenadante foi novamente descartado e deixado à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos para evaporação completa do etanol. Após a evaporação do etanol, o pellet foi ressuspenso em 50 µL de tampão TE, contendo 10 µg.mL⁻¹ RNase e então incubado 37° C por 45 minutos antes de ser armazenado a 4°C, para completa dissolução.

3.2.1.8.2 Extração de DNA das bactérias associadas à raiz de cana-de-açúcar

Antes da desinfestação superficial e extração de DNA de cana-de-açúcar (itens 3.2.1.8 e 3.2.1.8.1), as raízes das plantas inoculadas com a linhagem 33.1:pNKGFP foram incubadas em 2 mL de tampão PBS (140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 10 mM de Na₂HPO₄ e 2 mM de KH₂PO₄, pH 7,4) a 28°C por 2 horas. Ao precipitado obtido pela centrifugação dessa suspensão foram adicionados 700 µL de tampão TE, 30 µL de SDS 10% e 0,5 g de sílica (0,1 mm). Em seguida, a suspensão foi agitada no Homogeneizador de Células (Ação Científica) por 30 segundos a 5000 bpm e em seguida centrifugada por 10 minutos a 10.000 g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionados 500 µL de fenol, a suspensão foi homogeneizada por inversão e centrifugada nas condições anteriores. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionados 500 µL de clorofórmio. A solução foi homogeneizada por inversão e centrifugada novamente. O sobrenadante foi então transferido para novo tubo com 500 µL de fenol/clorofórmio (1:1), homogeneizado, centrifugado e coletado, sendo então adicionados 0,1 do volume de NaCl (5 M) e 0,6 do volume de isopropanol. A mistura foi deixada por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugada por 15 minutos a 10.000 g. O DNA foi lavado com etanol 70%, seco a 40°C por 20 minutos e ressuspensão em 50 µL de água deionizada esterilizada.

3.2.1.8.3 Desenho dos *primers*

Os *primers* utilizados no monitoramento de 33.1:pNKGFP por qPCR durante a colonização de cana-de-açúcar foram desenhados a partir da sequência do plasmídeo pNKBOR (Figura 3.1A). A sequência do pNKBOR foi introduzida no programa OligoPerfect Designer (Invitrogen), sendo então selecionados amplicons com até 400pb localizados entre os sítios de inserção do plasmídeo. A partir de uma relação de possíveis pares de *primers* a serem utilizados, foi selecionado um par de *primers* que anelava na região de resistência a canamicina e em uma região conservada do fragmento inserido no cromossomo bacteriano. O par de *primers* utilizado foi: PPNKF (5' - CCT TCA TTA CAG AAA CGG C - 3') e PPNKRII (5' - GGT GAT GCG TGA TCT GAT CC- 3') com amplicon de 362 de pares de base (Figura 3.1B).

minutos a 72°C em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research). O produto amplificado foi então verificado em gel de agarose 1,2 %, a 3 volts cm^{-1} juntamente com o marcador de peso molecular. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg.mL⁻¹) e fotodocumentado.

3.2.1.8.5 Curva padrão do qPCR

A reação da qPCR continha 5 μL do plasmídio com número de cópias conhecidos, 10 μM do *primer* PPNKF e 10 μM do *primer* PPNKRII e 12,5 μL de Platinum Sybr Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) em um volume total de 25 μL de reação adicionadas em placas de microtítulo (Bio-Rad). O ciclo da reação de qPCR começou com 95°C por 4 minutos para desnaturação do DNA, seguido de 40 ciclos de amplificação de 15 segundos a 95°C para dissociação do DNA e 15 segundos a 60°C de anelamento e extensão. As reações de qPCR foram realizadas em termociclador *iCycler iQ Real Time PCR* (Bio-Rad Laboratories Inc., USA). A curva padrão foi obtida a partir dos valores da fluorescência de fundo (CP), conhecida como *threshold cycle* (Ct), das quantidades conhecidas do plasmídio pNKGFP (10^5 a 10^8 número de cópias) adicionadas na reação. Para a construção da curva padrão foram consideradas as médias de quatro repetições de reações para cada concentração plasmidial. A partir desses valores foram obtidos o R^2 e o E da curva (Figura 3.2).

3.2.1.8.6 PCR quantitativo (qPCR)

O monitoramento por qPCR da linhagem 33.1:pNKGFP associada à plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foi realizado a partir de reações de qPCR que continham 5 μL de DNA (10 -100ng) diluídos 100X. Os parâmetros da qPCR: quantidade de reagentes e ciclos das reações, foram os mesmos descritos no item 3.2.1.8.5. Foram utilizadas 4 repetições por tratamento, sendo preparadas duas reações para cada repetição. As reações de qPCR foram realizadas em termociclador *iCycler iQ Real Time PCR* (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) acompanhadas das amostras plasmidiais para o cálculo da curva padrão como descrito acima.

Figura 3.2 - Curva padrão do plasmídeo pNKGFP. As unidades utilizadas para curva padrão foram 10^8 , 10^7 , 10^6 e 10^5 número de cópias do plasmídeo. Para cada corrida foram utilizadas quatro repetições por concentração.

3.2.1.9 Análise da densidade bacteriana

A densidade da linhagem 33.1:pNKGFP, presente na rizosfera e tecidos de cana-de-açúcar inoculadas de acordo com o experimento 1 e 2, foi avaliada após 4 e 15 dias (experimento 1) e 30 dias (experimento 2). A densidade da comunidade bacteriana associada à cana-de-açúcar provenientes do experimento 2 foi também avaliada. Raízes das plantas micropropagadas foram imersas em 2mL de tampão PBS. O acesso a células bacterianas presentes na rizosfera das plantas aclimatadas foi realizado adicionando-se (0,5 g) de substrato agregado a raiz em 5 mL tampão PBS. Ambos foram incubados por 1 hora a 28°C. Parte aérea e raízes (0,1 - 0,5 g) de plantas de ambos os experimentos foram desinfestadas e então foram macerados na presença de 1 - 5 mL de tampão PBS (ARAÚJO et. al., 2002). Após a obtenção da suspensão de microrganismos, foram feitas diluições em tampão PBS, e alíquotas de 100 μ L foram semeadas sobre meio TSB 5%, suplementado com benomyl-benzimidazole (50 μ g.mL⁻¹), com e sem canamicina (50 μ g. mL⁻¹) e incubadas a 28°C por 5 dias.

3.2.1.10 Análise de dados

A análise estatística de todos os dados obtidos por qPCR e re-isolamento foi realizada com o auxílio do programa SAS - *Copyright (c) 1989-1996 pelo SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*, considerando o delineamento experimental como sub-fatorial, amostras retiradas ao longo do tempo, com quatro repetições cada. Os dados de densidade bacteriana (UFC.grama de amostra⁻¹) foram transformados em $\text{Log}_{10}(\text{UFC.grama de amostra}^{-1} + 2)$ para normalização dos dados.

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Construção do plasmídio pNKGFP e transformação de *P. agglomerans* 33.1

A confirmação da inserção do gene *gfp* no plasmídio pNKBOR, originado assim o plasmídio pNKGFP foi realizada por PCR e digestão plasmidial (dado não apresentado). A eficiência de transformação da linhagem 33.1 com o plasmídio pNKGFP foi $2,3 \times 10^4$ transformantes.μg de DNA⁻¹. Foi observada *in vitro* uma forte expressão da GFP pela linhagem 33.1:pNKGFP (Figura 3.3). A linhagem 33.1:pNKGFP, apresentou alta estabilidade na expressão do gene da GFP *in vitro*, 100% após 280 gerações.

Figura 3.3 - Expressão heteróloga da GFP pela linhagem 33.1:pNKGFP estriada em meio LB adicionado canamicina, observação em luz ultravioleta (A), e, observação por esfregaço, aumento de 1000X (B) e 400X (C) em microscópio óptico de fluorescência

3.2.2.2 Análise molecular

Por cPCR, utilizando-se os *primers* PNKF e PNKRII foi possível obter o fragmento do tamanho esperado (362 pb) a partir das amostras: colônias bacterianas e DNA extraído da linhagem 33.1:pNKGFP, plasmídio pNKGFP e plasmídio pNKBOR. Não houve amplificação quando utilizado material genético ou colônia da linhagem 33.1 (Figura 3.4A).

A inserção do fragmento plasmidial no genoma bacteriano da linhagem 33.1:pNKGFP foi confirmada por *Southern Blot*. Ocorreu uma única inserção. O isolado 33.1 não apresentou fragmentos detectáveis pela sonda marcada durante hibridação (Figura 3.4B).

Figura 3.4 - Análise molecular dos transformantes da linhagem endofítica *P. agglomerans*, 33.1. **(A)** Identificação dos transformantes por PCR utilizando os *primers* PNKF e PNKRII. M - contém o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Fermentas), e as demais colunas as amplificação do fragmento de DNA (~360pb), sendo as amostras: 1 - plasmídio pNKBOR, 2 - plasmídio pNKGFP, 3 - 33.1:pNKGFP (DNA), 4 - 33.1:pNKGFP (colônia), 5 - 33.1 (DNA), 6 - 33.1 (colônia). **(B)** *Southern Blot* do plasmídio pNKGFP e do DNA cromossomal de *Pantoea agglomerans* digeridos por *EcoRI* e hibridizados com a sonda, fragmento de DNA obtida a partir dos *primers* PNKF e PNKRII. 1 - 33.1, 2 - plasmídio pNKGFP 3- 33.1:pNKGFP

3.2.2.3 Microscopia Óptica de Fluorescência

O comportamento da linhagem 33.1:pNKGFP, durante a interação com plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foi observada por MOF. A formação de biofilme pela linhagem 33.1:pNKGFP na superfície das raízes da cana-de-açúcar foi constatado durante todo o tempo de observação. A fluorescência da linhagem 33.1:pNKGFP só foi observada no biofilme após 5 dias de inoculação, havendo uma diminuição gradativa da fluorescência após este período. Entretanto, não foi observada a diminuição do agregado bacteriano (Figura 3.5).

Figura 3.5 - Observação da fluorescência das bactérias 33.1:pNKGFP presente no biofilme sobre as raízes de cana-de-açúcar micropropagadas em meio MS. **(A)** Observação das bactérias fluorescendo após cinco dias de inoculação, **(B)** diminuição da fluorescência aos 12 dias e **(C)** poucas bactérias fluorescendo aos 25 dias da inoculação. As setas indicam a presença de bactérias expressando a GFP. A captura de imagem a luz ultravioleta (UV). Aumento de 400X para todas as amostras

A fluorescência da linhagem não foi afetada quando as células estavam em suspensão do meio MS, livre do biofilme (Figura 3.6). Utilizando a linhagem 33.1:DsRed a fluorescência foi observada mesmo quando as células estavam agregadas ao biofilme (Figura 3.7).

Figura 3.6 - Observação da fluorescência das bactérias 33.1:pNKGFP fora do agregado de biofilme, no meio MS. **(A)** Captura de imagem à luz visível e **(B)** captura de imagem sobre luz ultravioleta. Aumento de 1000X

Figura 3.7 - Observação da fluorescência das bactérias 33.1:pDsRed durante formação de biofilme sobre as raízes de cana-de-açúcar micropropagadas em meio MS. **(A)** Tratamento controle, **(B)** 33.1:pDsRed após 4 dias e **(C)** 10 dias. A captura de imagem a luz ultravioleta (UV). Aumento de 400X para todas as amostras

3.2.2.4 Testes preliminares para qPCR

Os *primers* desenhados foram testados primeiramente por cPCR e depois realizadas as reações da qPCR. A extração do DNA vegetal total pela metodologia descrita acima se mostrou bastante eficiente, visto que todo o material vegetal, raiz e parte aérea, apresentaram DNA total extraído visível em gel de agarose (dado não apresentado). Quando realizada a extração do DNA das bactérias associadas à raiz de cana-de-açúcar, o mesmo não foi observado em gel de agarose. Entretanto, na cPCR todas as amostras amplificaram (rizosfera, raízes e parte aérea), exceto as amostras do tratamento controle.

Por cPCR foi avaliada a especificidade e a sensibilidade dos *primers* desenvolvidos para o qPCR. O resultado da amplificação pela cPCR demonstrou que os *primers* desenvolvidos apresentaram-se específicos para amostras que continham apenas o sítio de anelamento para os *primers* PNKF e PNKR11, sendo obtido fragmentos de tamanho esperado (Figura 3.8A).

A sensibilidade dos *primers* foi confirmada na cPCR pela observação da diminuição gradativa da concentração dos amplicons mediante as diluições das células da linhagem 33.1:pNKGFP, 10^8 a 10^4 UFC (Figura 3.8B).

Figura 3.8 - cPCR com os *primers* PNKF e PNKRII. **(A)** Teste de especificidade: 1 - plasmídeo pNKBOR, 2 - plasmídeo pNKGFP, 3 - plasmídeo pUC18, 4 - plasmídeo pCM88, 5 - plasmídeo pSMC21, 6 - plasmídeo pUC4K, 7 - plasmídeo pJTT, 8 - plasmídeo pGEMT-easy, 9 - plasmídeo DsRed, 10 - 33.1:pNKBOR, 11 - 33.1:pNKGFP, 12 - 33.1, 13 - 33.1:Dsred., 14 - DH5- α - λ pir. As colunas com a letra M contém o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb (Fermentas). **(B)** teste de sensibilidade: 1 - 33.1:pNKGFP (10^8 células), 2 - 33.1:pNKGFP (10^7 células), 3 - 33.1:pNKGFP (10^6 células), 4 - 33.1:pNKGFP (10^5 células), 5 - 33.1:pNKGFP (10^4 células)

3.2.2.5 Monitoramento por qPCR e re-isolamento de *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP em cana-de-açúcar micropropagada

Após 4 dias (primeira amostragem), a linhagem 33.1:pNKGFP foi observada em maior densidade na rizosfera de cana-de-açúcar, migrando posteriormente para a parte aérea do vegetal, visto que após 15 dias (segunda amostragem) foi observado um aumento no número de bactérias presentes na parte aérea, fato este comprovado pela diminuição da densidade da linhagem 33.1:pNKGFP existentes na rizosfera e raízes de cana-de-açúcar quando comparado os dois tempos avaliados (Figura 3.9).

Figura 3.9 - Densidade de *P. agglomerans* 33.1:pNKGFP mensurada por qPCR **(A)** e re-isolamento **(B)** em associação com cana-de-açúcar micropropagada. As amostras foram coletadas após 4 e 15 dias da inoculação bacteriana. As barras apresentadas são a média $\pm$ desvio padrão de quatro repetições.

A quantidade de bactérias mensuradas pela técnica de qPCR foi o dobro do observado por re-isolamento. Entretanto, o padrão de colonização de cana-de-açúcar pela linhagem 33.1:pNKGFP obtido pelas duas técnicas foi similar. O alto desvio padrão das repetições dos dados obtidos por re-isolamento refletiu um maior coeficiente de variação (CV=42,3), dez vezes maior do obtido na análise dos dados de qPCR (CV=4,5).

3.2.2.6 Densidade bacteriana associada à cana-de-açúcar aclimatada

A linhagem 33.1:pNKGFP quando adicionada em substrato foi capaz de colonizar eficientemente as plantas de cana-de-açúcar aclimatadas, havendo um gradiente decrescente dessa linhagem da rizosfera para parte aérea (Tabela 3.2). A densidade bacteriana associada à cana-de-açúcar não foi alterada pela adição da linhagem 33.1 e 33.1:pNKGFP. Em todos os tratamentos, com e sem adição da *P. agglomerans* foi observado maior densidade bacteriana na rizosfera.

Tabela 3.2 – Densidade bacteriana associada à cana-de-açúcar

Ponto de amostragem na planta	Densidade 33.1:pNKGFP (UFC/grama de amostra) ^a	Densidade bacteriana (UFC/grama de amostra) ^b		
		Controle	33.1	33.1:pNKGFP
Rizosfera	2,9 x10 ⁵ a	8,6x10 ⁵ a	12,4x10 ⁵ a	18,4x10 ⁵ a
Raiz	4,3x10 ² b	7,1x10 ⁵ a	10,5x10 ⁵ a	4,5x10 ⁵ ab
parte aérea	2,2 x10 ¹ b	2.2x10 ³ b	1,4x10 ³ b	1,5x10 ³ b

^a A densidade da linhagem 33.1:pNKGFP foi mensurado após 30 dias de inoculação da linhagem em substrato contendo plantas aclimatadas de cana-de-açúcar. Os dados apresentados são a média de quatro repetições e valores com a letra dentro da coluna não diferem estatisticamente (P>0,05) de acordo com o teste de Tukey

^b A densidade bacteriana total foi mensurado após 30 dias de inoculação das linhagens 33.1 e 33.1:pNKGFP em substrato contendo plantas aclimatadas de cana-de-açúcar. O tratamento controle consistia da adição de meio LB sem crescimento bacteriano. Os dados apresentados são a média de quatro repetições, tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente (P>0,05) de acordo com o teste de Tukey

3.2.3 Discussão

As frequências de transformação da linhagem 33.1 tanto com o plasmídio pNKBOR (dado não apresentado) quanto com o pNKGFP foram semelhantes àquela observada para *Klebsiella pneumoniae* (5x10⁴ transformantes.μg de DNA⁻¹) transformada com o plasmídio pNKBOR (ROSSIGNOL et al.; 2001). Segundo os autores, essa frequência é suficiente para a obtenção de um grande número de eventos

de transposição. Esse resultado também demonstra que a inserção do gene da GFP no plasmídeo pNKBOR, derivando assim o pNKGFP, não deve ter alterado a capacidade de integração do mesmo. O teste de estabilidade da expressão foi realizado e como esperado, todas as colônias bacterianas avaliadas da linhagem 33.1:pNKGFP expressaram, após 280 gerações, o gene *gfp*. Existem na literatura vários relatos da alta estabilidade de vetores integrativos utilizados na marcação de bactérias com o gene da GFP (DE LORENZO et al., 1990; HERRERO; DE LORENZO; TIMMIS, 1990). Dados satisfatórios também foram obtidos por Suarez et al. (1997), os quais inseriram o gene da GFP no cromossomo bacteriano de *Pseudomonas* spp. e *Alcaligenes eutrophus* por meio da fusão com o minitransposon *Tn5*. Dessa forma, a inserção do gene GFP no cromossomo da linhagem 33.1 por meio do minitransposon *Tn10*, demonstrou a eficiência dessa técnica na clonagem de genes que poderão ser futuramente transferidos para bactéria *P. agglomerans* 33.1 a fim de aumentar a eficiência da mesma quando possivelmente utilizada na área agrícola.

Os transposons têm sido importantes ferramentas na engenharia genética, tanto para causar mutações aleatórias, quanto para inserção ou clonagem de genes do genoma hospedeiro (LI; ZHANG, 2006; MARSCH-MORENO; HERNÁNDEZ-GUZMÁN, G.; ALVAREZ-MORALES 1998). Como exemplo, pode-se citar uma vasta gama de gêneros bacterianos geneticamente modificados utilizando-se transposons: *Yersinia* (PIERSON, 1994), *Legionella* (VISWANATHAN et al., 2000), *Pseudomonas* (CORNELIS et al., 1992), *Haemophilus* (KRAISS; SCHLOR; REIDL, 1998), *Bacillus* (PETIT et al., 1990), *Rhodococcus* (IBRAHIM; TAMUR; TAMURA, 2007), *Actinobacillus* (RIOUX et al., 1999), *Gluconobacter* (GUPTA et al., 1999), entre outras.

Quando os transposons são utilizados para inserir genes exógenos no genoma hospedeiro, as inserções mediadas pelas transposases geralmente são únicas e aleatórias, e, em muitos casos, o sítio de inserção pode fazer parte de um gene importante para sobrevivência ou adaptação do microrganismo geneticamente modificado. Pelo *Southern Blot* foi comprovado que o minitransposon *Tn10* inseriu-se no genoma da linhagem 33.1:pNKGFP em sítio único, e não afetou a adaptação na mesma durante colonização de cana-de-açúcar, nem alterou a expressão de genes relacionados a colonização como produção de N-acil-homoserina-lactona,

endoglicanases e pectinases (dado não apresentado).

Após a marcação, a linhagem 33.1:pNKGFP foi utilizada na avaliação da interação planta-microrganismo. A formação de agregado bacteriano, ao redor das raízes de cana-de-açúcar foi observada por MOF, entretanto a fluorescência da linhagem 33.1:pNKGFP foi afetada pela interação com a cana-de-açúcar, uma vez que ocorreu uma redução gradativa de células expressando a GFP, mas não uma redução do agregado bacteriano ao redor das raízes. Quando a linhagem 33.1:pNKGFP foi re-isolada, ou foram observadas células bacterianas livres do agregado, crescendo no médio MS, houve a restituição da fluorescência. Já a linhagem 33.1:pDsRed agregada a raízes de cana-de-açúcar expressou satisfatoriamente a fluorescência vermelha. O plasmídio pDsRed é replicativo e o plasmídio pNKGFP integrativo, a partir desse fato duas hipóteses podem ser discutidas a fim de justificar esse fenômeno. Talvez, exudados das raízes podem estar degradando a proteína da GFP impedindo assim a fluorescência verde, entretanto, esse exudado não estaria degradando a proteína de fluorescência vermelha. Outra hipótese é a regulação epigenética, que ocorre geralmente por metilação de DNA em procariotos, sendo esse fenômeno pouco estudado (CASADÉSUS; LOW, 2006). Apesar das limitações na observação da fluorescência da GFP pela linhagem 33.1:pNKGFP, esse evento de transformação foi extremamente eficiente nas análises de colonização por re-isolamento e qPCR.

Muitos endófitos aparentemente possuem um amplo espectro de hospedeiros, por exemplo, *Herbaspirillum seropedicae* tem sido encontrado em uma grande variedade de culturas como sorgo, cana-de-açúcar, milho e outras gramíneas (BALDANI et al., 1986; OLIVARES et al., 1996). Isso indica que um endófito que foi isolado de uma família de hospedeiro pode colonizar uma espécie vegetal de outra ou da mesma família sugerindo a não especificidade de hospedeiro para endófitos. Este fenômeno é denominado colonização cruzada (ZAKRIA et al., 2008).

A capacidade de colonização cruzada de cana-de-açúcar por *P. agglomerans* 33.1, foi avaliada por duas técnicas: re-isolamento e qPCR, sendo possível observar que a bactéria 33.1:pNKGFP coloniza eficientemente as plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. As duas metodologias utilizadas foram adequadas e com resultados similares.

Os resultados obtidos pelo re-isolamento, por ser uma técnica pouco sensível, com maiores probabilidades de erros, apresentou uma grande diferença entre as densidades da linhagem 33.1:pNKGFP nas diferentes repetições de um mesmo tratamento. Esse método vem perdendo terreno para as técnicas mais refinadas e sensíveis como análises independentes do cultivo microbiano, por exemplo, a qPCR (LACAVA et al., 2006).

O padrão de colonização de cana-de-açúcar pela linhagem 33.1:pNKGFP obtido por qPCR foram bem parecidos ao obtido por re-isolamento: diminuição da densidade de 33.1:pNKGFP na rizosfera e raiz ao longo do tempo e aumento na parte aérea. A quantidade de bactérias obtidas por qPCR podem ter sido superestimadas, visto que o sistema de qPCR detecta o material genético bacteriano, incluindo bactérias já mortas. Além disso, a desinfestação superficial do material vegetal antes da extração de DNA pode não ter sido eficiente, sobrando algumas células agregadas à planta. Devido à alta sensibilidade da técnica, apesar das limitações apresentadas, a utilização da qPCR para monitoramento microbiano vem aumentando ao longo do tempo.

O sistema SYBR Green é o menos específico dentre as técnicas de qPCR porque o SYBR Green intercala em qualquer fita dupla de DNA formada durante a reação de PCR, incluindo a fita alvo, produtos de PCR inespecíficos e dímeros de oligonucleotídeos (GIULIETTI et al., 2001). Entretanto a precisão e a sensibilidade do SybrGreen são altas. Francis et al. (2006) a partir de uma curva de regressão com $R^2 = 0,97$ na qPCR, obtiveram um valor de fluorescência de fundo (C_p), entre 20 a 36 ciclos para 5 a 10^5 células bacterianas por reação, visando a quantificação de diferentes isolados de *Xylella fastidiosa*, agente causal de doenças em citrus, videira, alfafa, pêssigo, café entre outras.

Outra aplicação agronômica da técnica de qPCR foi a detecção da bactéria *Clavibacter michiganensis* subsp. *Insidiosus* (*Cmi*), importante patógeno em alfafa. Essa metodologia foi mais específica e sensível quando comparada com as metodologias publicadas anteriormente para detecção de *Cmi* (MAREFAT; OPHEL-KELLER; MCKAY, 2007).

O qPCR desenvolvido no presente trabalho pode ser aplicado no monitoramento de qualquer bactéria geneticamente modificada que tenha sido engenheirada a partir do

plasmídio pNKBOR e/ou pNKGFP. Esses plasmídios podem também receber genes de interesse agrícola, pois os *primers* anelam em uma região fora do sítio de clonagem dos plasmídios, mas dentro dos sítios de inserção. Uma vez transformada, a bactéria receptora pode ser facilmente monitorada, como ficou comprovado utilizando nesse trabalho a linhagem 33.1:pNKGFP.

Bactérias endofíticas geralmente são encontradas em maior concentração nas raízes havendo uma gradiente decrescente dessa densidade dos ramos para folhas (LAMB; TONKYN; KLUEPFEL, 1996), esses endófitos devem colonizar a superfície das raízes antes de entrar nos hospedeiros (GYANESHWAR et al., 2001; JAMES et al., 2002; RONCATO-MACCARI et al., 2003). Os dados observados também descrevem a transferência da bactéria 33.1:pNKGFP da rizosfera para a raiz e posteriormente parte aérea, demonstrando assim um comportamento típico de endófito durante penetração des raízes.

Vários métodos de inoculação de bactérias endofíticas têm sido empregados nas mais diversas culturas, inoculação de sementes, raízes e parte aérea (BRESSAN; BORGES, 2004; ELBELTAGY et al., 2001; NJOLOMA et al., 2006; RUPPEL et al., 1992; VERMA; LADHA; TRIPATHI 2001) não havendo assim, um consenso da melhor metodologia, entretanto, a praticidade de aplicação é um fator que deve ser levado em conta, e a inoculação da 33.1:pNKGFP em substrato contendo cana-de-açúcar aclimatada mostrou-se eficiente visando a colonização dessas plantas.

A colonização de várias espécies vegetais por um determinado isolado endofítico tem sido descrito: *Klebsiella pneumoniae* (Kp342), que foi originalmente isolada de milho foi capaz de colonizar raízes de arroz, trigo, *Arabidopsis thaliana* e *Medicago sativa* (DONG et al., 2003); assim como a linhagem Kp342 também foi capaz de colonizar raiz e ramos de *Citrus sinensis* e *Catharanthus roseus* (LACAVA; ARAÚJO.; AZEVEDO, 2007). *Azoarcus indigenes*, isolado de gramínea de pastagens, também coloniza arroz e sorgo (EGENER; HUREK; REINHOLD-HUREK, 1999; REINHOLD-HUREK et al., 1993; STEIN; HAYEN-SCHNEG; FENDRIK, 1997). Similarmente, *Herbaspirillum* sp. linhagem B501, isolado de arroz selvagem, foi capaz de colonizar cana-de-açúcar (NJOLOMA et al., 2006). *Burkholderia* sp. isolada de cebola colonizou parreiras (COMPANT et al., 2005).

Os dados obtidos no presente capítulo demonstraram que a *P. agglomerans* 33.1, isolada de *E. grandis*, foi capaz de colonizar a rizosfera, raiz e parte aérea de cana-de-açúcar, sem afetar a densidade bacteriana associada ao hospedeiro. Essa mesma linhagem em trabalho recente apresentou colonização cruzada também em *Citrus* sp. e *Catharanthus roseus* (TORRES, 2005).

Surpreendentemente, há poucos estudos de interação entre cana-de-açúcar – endófitos de colonização cruzada, visando o aumento da fitossanidade ou promoção de crescimento vegetal dessa cultura que é uma das mais importantes na exportação e consumo doméstico para a maioria dos países tropicais (Asis et al., 2000). Para essa planta, estudos têm sido direcionados para as bactérias diazotróficas oriundas dessa cultura. Entretanto, o nitrogênio produzido pelos endófitos fixadores de nitrogênio é inadequado para o crescimento da planta (NISHIGUCHI et al., 2005). Asis et al. (2000) isolaram, a partir de cana-de-açúcar, várias linhagens de *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Herbaspirillum*, sendo observado que apenas 40% dessas linhagens apresentaram redução de acetileno. Assim, nenhum inoculante foi ainda comercialmente desenvolvido, talvez a busca de novos organismos com outros mecanismos de promoção de crescimento seja interessante, abrindo enorme precedente para que estudos como o desenvolvido no presente trabalho sejam válidos.

Futuramente, genes de interesse podem ser transferidos para a linhagem 33.1 a fim de aumentar os benéficos de dessa linhagem para a cana-de-açúcar, como maior aumento da promoção de crescimento, e, controle de fitopatógenos e pragas agrícolas. A mesma também poderá ser testada em outras culturas. Além disso, pouco se sabe sobre os fatores envolvidos na interação bactéria-planta, pois a mesma sofre efeitos de muitas variáveis, tanto das plantas quanto das bactérias, fato esse que corrobora a importância de futuros trabalhos, mais detalhados que avaliem os mecanismos de especificidade bactéria-planta hospedeira.

Referências

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Manual**: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002. 86p.

ASIS, C. A.; ADACHI, C. A. Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.38, p.19–23, 2003.

ASIS, C. A.; KUBOTA, M.; OHTA, H.; ARIMA, Y.; CHEBOTAR, V. W.; TSUCHIYA, K.; AKAO, S. Isolation and partial characterization of endophytic diazotrophs associated with Japanese sugarcane cultivar. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 46, p. 759–765, 2000.

ATLAS, R. M. Molecular methods for environmental monitoring and containment of genetically engineered microorganisms. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 3, p. 137-146 1992.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESMHUKH, S. K. (Org.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007. p.189-207.

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.

BASSLER, H. I.; FLOOD, S. J. A.; LIVAK, K. J.; MARMARO, J.; KNORR, R.; BATT, C. A. Use of fluorogenic probe in a PCR-base assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 3724-3728, 1995.

BELLIS, P. D.; SCHENA, L.; CARIDDI, C. Real-time Scorpion-PCR detection and quantification of *Erwinia amylovora* on pear leaves and flowers. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 118, p. 11–22, 2007.

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.

BRANDL, M. T.; MANDRELL, R. E. Fitness of *Salmonella enterica* serovar thompson in the cilantro phyllosphere, **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 3614-3621, 2002.

BRESSAN, W.; BORGES, M. T. Delivery methods for introducing endophytic bacteria into maize. **Biocontrol**, Dordrecht, v. 49, p. 315–322, 2004.

CASADESUS, J.; LOW, D. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 70, p. 830–856, 2006.

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

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by a plant growth-promoting bacterium, *Burkholderia* sp. strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 1685–1693, 2005.

CORNELIS, P.; ANJIAH, V.; KOEDAM, N.; DELFOSSE, P.; JACQUES, P.; THONART, P.; NEIRINCKX, L. Stability, frequency and multiplicity of transposon insertions in the pyoverdine region in the chromosomes of different fluorescent pseudomonads. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 138, p. 1337–1343, 1992.

CUBERO, J.; GRAHAM J. H. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 1257–1264, 2002.

DE LORENZO, V.; HERRERO, M.; JAKUBZIK, U.; TIMMIS, K. N. Mini Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram-negative eubacteria. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 172, p. 6568–6572, 1990.

DESJARDIN, L. E.; CHEN, Y.; PERKINS, M. D.; TEIXEIRA, L.; CAVE, M. D.; EISENNACH, K. D. Comparison of the ABI 7700 system (Taqman) and competitive PCR for quantification of IS 6110 DNA in sputum during treatment of tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, p. 1964–1968, 1998.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; McCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. G.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 1139–1147, 1994.

DONG, Y.; INIGUEZ, A. L.; TRIPLETT, E. W. Quantitative assessments of the host range and strain specificity of endophytic colonization by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 257, p. 49–59, 2003.

DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis cry1Ac7* and *Serratia marcescens chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 2804–2810, 2000.

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rochester, v. 12, p. 13–15, 1987.

EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. strain BH72 in rice roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 12, p. 813–819, 1999.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 5285–5293, 2001.

FRANCIS, M.; LIN, H.; CABRERA-LA-ROSA, J.; DODDAPANENI, H.; CIVEROLO, E. L. Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 115, p. 203–213, 2006.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, Orlando, v. 25, p. 386–401, 2001.

GUPTA, A.; FELDER, M.; VERMA, V.; CULLUM, J.; QAZI, G. N. A mutant of *Gluconobacter oxydans* deficient in gluconic acid dehydrogenase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 179, p. 501–506, 1999.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P. M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. K. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 183, p. 2634–2645, 2001.

HERRERO, M.; DE LORENZO, V.; TIMMIS, K. N. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosome insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, 172, 6557–6567, 1990.

HOLLIDAY, P. A. **Dictionary of plant pathology**. Cambridge: Cambridge University Press. 1989. 331p.

IBRAHIM, K. S.; TAMUR, N.; TAMURA, T. A multipurpose transposon-based vector system mediates protein expression in *Rhodococcus erythropolis*. **Gene**, Amsterdam, v. 386, p. 173–182, 2007.

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

JANSSON, J. K.; DE BRUIJN, F. J. Biomarkers and bioreporters. In: DAVIES, J. (Org.). **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington: ASM Press. 1999. p. 651–655.

KOLTER, R.; INUZUKA, M.; HELINSKI, D. R. Trans-complementation dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid R6K. **Cell**, Cambridge, v. 15, p. 1199–1208, 1978.

KRAISS, A.; SCHLOR, S.; REIDL, J. In vivo transposon mutagenesis in *Haemophilus influenzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 4697–4702, 1998.

KUCHMA, S. L.; CONNOLLY, J. P.; O'TOOLE, J. P. Component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 187, p. 1441-1454, 2005.

LACAVA, P. T.; LI, W. B.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; HARTUNG, J. S. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in inoculated plants. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 535-541, 2006.

LACAVA, P. T.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. . Evaluation of endophytic colonization of *Citrus sinensis* and *Catharanthus roseus* seedlings by endophytic bacteria. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 45, p. 11-14, 2007

LAMB, T. G.; TONKYN, D. W.; KLUEPFEL, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, p. 1112–1120, 1996.

LI, Y.Y.; ZHANG, J.P. Gene trapping: techniques and current progress. **Acta Genetica Sinica**, Beijing, v. 33, p. 189-198, 2006.

LIMA, A. O. S.; QUECINE, M. C.; FUNGARO, M. H. P.; ANDREOTE, F. D.; MACCHERONI, JUNIOR, W.; ARAÚJO, W. L.; SILVA-FILHO, M. C.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Molecular characterization of a 1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 68, p. 57-65, 2005.

LOIRET, F. G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODE, P.; RODE'S, R.; DONG, Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.97, p.504–511, 2004.

MAREFAT, A.; OPHEL-KELLER K.; McKAY, A. A real-time PCR assay for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* in Lucerne. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 36, p. 262–269, 2007.

MARSCH-MORENO, R.; HERNÁNDEZ-GUZMÁN, G.; ALVAREZ-MORALES, A. pTn5cat: A Tn5-derived genetic element to facilitate insertion mutagenesis, promoter probing, physical mapping, cloning, and marker exchange in phytopathogenic and other Gram-negative bacteria. **Plasmid**, New York, v. 39, p. 205-214, 1998.

MARX, C. J.; LIDSTROM, M. E. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria. **Microbiology**, Reading, v. 147, p. 2065-2075, 2001.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de importância econômica. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A.M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife:UFPE, 2007.p. 129-140.

MIRZA, S. M.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 237, 47–54, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NISHIGUCHI, T.; SHIMIZU, T.; NJOLOMA, J.; OOTA, M.; SAEKI, Y.; AKAO, S. The estimation of the amount of nitrogen fixation in the sugarcane by ¹⁵N dilution technique. **Bulletin of the Faculty of Agriculture, Miyazaki University**, Miyazaki, v. 51, p. 53–62, 2005.

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

NUNEZ, W. J.; COLMER, A. R. Differentiation of *Aerobacter-Klebsiella* isolated from sugarcane. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 16, p. 1875-8, 1968.

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

OLIVEIRA, A. C.; VALLIM, M. A.; SEMIGHINI, C. P.; ARAÚJO, W. L.; GOLDMAN, G. H.; MACHADO, M. A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from citrus trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction assay. **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, p. 1048-1054, 2002.

PAHL, A.; KUHLBRANDT, U.; BRUNE, K.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSNER, A. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1958-1963, 1999.

PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene**, Amsterdam, v. 33, p. 103-119, 1985.

PETIT, M. A.; BRUAND, C.; JANNIERE, L.; EHRLICH, S. D. Tn10- derived transposons active in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 172, p. 6736–6740, 1990.

PIERSON, D. E. Mutations affecting lipopolysaccharide enhance ail-mediated entry of *Yersinia enterocolitica* into mammalian cells, **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 176, p. 4043–4051, 1994.

PROCÓPIO, R. E. L. **Diversidade bacteriana endofítica de *Eucalyptus spp.* e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 115p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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 indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, p. 574–584, 1993.

RENNIE, R. J.; DE 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.

RIOUX, S.; GALARNEAU, C.; HAREL, J.; FREY, J.; NICOLET, J.; KOBISCH, M.; DUBREUIL, J. D.; JACQUES, M. Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, p. 1017–1026, 1999.

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

ROSSIGNOL, M.; BASSET, A.; ESPELI, O.; BOCCARD, F. NKBOR, a mini-Tn10-based transposon for random insertion in the chromosome of Gram-negative bacteria and the rapid recovery of sequences flanking the insertion sites in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 152, 481–485, 2001.

RUPPEL, S.; HECHT-BUCHHOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, U.; 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.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344p.

SAYLER, G. S., LAYTON, A. C. Environmental application of nucleic acid hybridization. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 44, p. 625–648, 1990.

SCHULZ B. J. E.; BOYLE, C. J. C. What are endophytes? In: SCHULZ B.J.E.; BOYLE, C.J.C.; SIEBER, T.N. (Org.). **Microbial root endophytes**. Berlin: Springer-Verlag. 2006. p. 1–13.

STEIN, T.; HAYEN-SCHNEG, N.; FENDRIK, I. Contribution of BNF by *Azoarcus* sp. BH72 in *Sorghum vulgare*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, 969–971, 1997.

SUAREZ, A.; GUTTLE, A.; STRATZ, M.; STAENDNER, L. H.; TIMMIS, K. N.; GUZMAN, A. C. Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications. **Gene**, Amsterdam, v. 196, p. 69–74, 1997.

TAYLOR, L. A.; ROSE, R. E. A correction in the nucleotide sequence of the Tn903 kanamycin resistance determinant in pUC4K **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, p. 358, 1988.

THIEM, S. M.; KRUMME, M. L.; SMITH, R. L.; TIEDJE, J. M. Use of molecular techniques to evaluate the survival of a microorganism injected into an aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 60, p. 1059–1067, 1994.

TOMBOLINI, R.; JANSSON, J. K. Monitoring of GFP tagged bacterial cells. In LAROSSA, R. (Org.). **Methods in molecular biology**: bioluminescence methods and protocols. Totowa: Humana Press. 1998. p. 285–298.

TORRES, A.R. **Diversidade genética de enterobactérias endofíticas de diferentes hospedeiros e colonização de *Catharantus roseus* por endófitos expressando o gene gfp**. 2005. 137p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

UNGE, A.; TOMBOLINI, R.; DAVEY, M. E.; DE BRUIJN, F. J.; JANSSON, J. K. GFP as a marker gene. In: AKKERMANS, A. D. L.; VAN ELSAS, J. D.; DE BRUIJN, F. J. (Org.). **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer. 1997. p. 1–16.

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

VERMA, S. C.; SINGH, A.; CHOWDHURY, S. P.; TRIPATHI, A. K. Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp., using green fluorescent protein reporter. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 26, p. 425–429, 2004.

VISWANATHAN, V. K.; EDELSTEIN, P. H.; POPE, C. D.; CIANCOTTO, N. P. The *Legionella pneumophila* iraAB locus is required for iron assimilation, intracellular infection, and virulence. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 68, p. 1069–1079, 2000.

WELLER, A.; ELPHINSTONE, J. G.; SMITH, N. C.; BOONHAM, N.; STEAD, D. E. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 2853-2858, 2000.

ZAKRIA, K. U.; OGAWA, T.; YAMAMOTO, A.; SAEKI, Y.; AKAO, S. Influence of inoculation technique on the endophytic colonization of rice by *Pantoea* sp. isolated from sweet potato and by *Enterobacter* sp. isolated from sugarcane Muhammad. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 54, p. 224–236, 2008.

4 CONTROLE BIOLÓGICO DE *Diatraea saccharalis* PELA BACTÉRIA ENDOFÍTICA *Pantoea agglomerans* 33.1 EXPRESSANDO O GENE *cry1Ac7*

Resumo

O desenvolvimento de uma agricultura sustentável é uma preocupação mundial, que tem levado a busca de alternativas menos prejudiciais ao meio ambiente, como a substituição dos pesticidas químicos por agentes de controle biológico. Os métodos biológicos ainda são pouco empregados, representando somente 1% do total utilizado no controle de insetos. Deste total, 98% correspondem ao uso de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Isso se deve à faixa restrita de hospedeiro, à rápida ação dos cristais protéicos, denominadas proteínas Cry, contra a praga alvo e à facilidade de obtenção destes cristais, tornando economicamente viável a sua utilização. Entretanto, apesar do extenso uso de Bt, algumas características ainda limitam a sua aplicação, como a incapacidade de controlar pragas que se alojam no interior das plantas. Para minimizar esse problema atualmente estão sendo desenvolvidos diversos organismos geneticamente modificados expressando as proteínas Cry, destacando-se microrganismos endofíticos que colonizem o mesmo ambiente do inseto praga. A partir desses fatos, o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento de uma bactéria endofítica geneticamente modificada expressando o gene da proteína Cry, visando o controle da praga de cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*, um lepidóptero que tem causado grandes prejuízos à lavoura canavieira. Para tanto, a bactéria endofítica *Pantoea agglomerans* (33.1), conhecidamente colonizadora de cana-de-açúcar, foi transformada com o plasmídeo pJTT, o qual carrega o gene *cry1Ac7*. Após a confirmação da inserção do gene no cromossomo bacteriano por *Southern Blot*, foram conduzidos em dieta artificial os bioensaios de controle da praga *D. saccharalis* pela linhagem 33.1:pJTT. Confirmado o potencial de controle das lagartas pela linhagem 33.1:pJTT, uma nova metodologia foi desenvolvida, submetendo as lagartas de *D. saccharalis* aos fragmentos de colmos autoclavados e tratados com linhagens endofíticas. Os resultados demonstraram que a linhagem 33.1:pJTT foi capaz de aumentar a taxa de mortalidade das lagartas *D. saccharalis* em dieta artificial e em colmos de cana-de-açúcar, sendo observado inclusive, um retardamento do desenvolvimento larval até o estágio de pupa, além da diminuição do peso larval. Os testes de toxicidade desenvolvidos em colmos de cana-de-açúcar foram eficientes, sendo, portanto uma alternativa para que sejam desenvolvidos bioensaios mais próximos da realidade. Por re-isolamento foi observado que a linhagem 33.1:pJTT foi capaz de sobreviver nos colmos e em menor quantidade dentro do interior das lagartas *D. saccharalis*. Foi também observado que a linhagem 33.1:pJTT é capaz também de infectar e colonizar naturalmente as mudas de cana-de-açúcar, demonstrando assim o potencial da aplicação da bactéria *P. agglomerans* (33.1) expressando a proteína Cry no controle biológico da praga *D. saccharalis*.

Palavras-chave: *Pantoea agglomerans*; Proteína Cry; Expressão heteróloga; *Diatraea saccharalis*

4 BIOLOGICAL CONTROL OF *Diatraea saccharalis* BY ENDOPHYTIC BACTERIUM *Pantoea agglomerans* 33.1 EXPRESSING THE HETEROLOGOUS *cry1Ac7* GENE

Abstract

The development of sustainable agriculture is a world concern that has stimulated the search for alternatives with fewer environmental impacts; for example, the replacing of chemical pesticides with biological control agents. Unfortunately, biological controls are used infrequently, representing just 1% of the total products used against insects. 98% of this amount is the utilization of *Bacillus thuringiensis* (Bt). This is because Bt is highly specific for targeted insects due to the fast action of protein crystals, named Cry protein, that are easily produced. Despite the success of conventional *B. thuringiensis*-based products, they have several disadvantages as bio-insecticides due to their difficulty in reaching the internal regions where the larvae feed. To solve this problem, many genetically modified organisms capable of expressing the Cry protein, with special emphasis on endophytic micro-organisms that colonize the same niche as the pests, have been developed. Thus, the objective of this work was the development of an endophytic bacterium genetically modified to express Cry protein to control the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*; a wide-spread sugarcane pest which causes considerable crop loss in cane-growing areas of Brazil. The endophytic bacterium *Pantoea agglomerans* (33.1), a known sugarcane colonizer, was genetically modified with the plasmid pJTT resulting in the expression of the *cry1Ac7* gene. After confirmation of gene insertion into the bacterial genome by *Southern Blot*, the bio-assays of *D. saccharalis* control by 33.1:pJTT, was conducted in artificial diet. Confirming the partial control of larvae by 33.1:pJTT, a new methodology was developed. 33.1:pJTT was inoculated into sugarcane stalks which were fed to the *D. saccharalis* larvae. The results proved that 33.1:pJTT was able to increase the mortality of *D. saccharalis* larvae in artificial diet and sugarcane stalks. The larval development of *D. saccharalis* was also impaired and the larval weights were significantly reduced by strain 33.1:pJTT. The bio-assay using sugarcane stalks was very efficient. It should be considered as a desirable alternative in developing bio-assays closer to the natural environment. It should be an alternative to develop bioassays closer to reality. 33.1:pJTT was re-isolated from sugarcane stalks and *D. saccharalis* larvae. Sugarcane seedling re-infection by 33.1:pJTT was also confirmed. All these results proved the potential of *P. agglomerans* (33.1) in expressing the Cry protein essential to the control of the *D. saccharalis* sugarcane borer.

Keywords: *Pantoea agglomerans*; Cry Protein; Heterologous expressing; *Diatraea saccharalis*

4.1 Introdução

A bactéria Gram-positiva, *Bacillus thuringiensis* (Bt) é atualmente utilizada como uma alternativa ambientalmente segura em comparação aos pesticidas químicos. O Bt é um patógeno de larvas de insetos, pois produz cristais altamente específicos durante a esporulação. Esses cristais consistem predominantemente de proteínas tóxicas, conhecidas como δ -endotoxinas, toxinas Cry ou proteínas Cry. O modo de ação das δ -endotoxinas ocorre a partir da ingestão das oclusões protéicas de Bt pelos insetos susceptíveis, incluindo os seguintes passos: (a) solubilização do cristal para liberação da proteína Cry na forma de protoxina inativa, (b) ativação da protoxina pelas proteases do intestino médio, (c) ligação da toxina a receptores presentes no intestino médio, (d) formação de poros nas células da membrana do intestino médio e consequente morte do inseto (SCHNEPF et al., 1998). Apesar de altamente tóxico aos insetos, as proteínas Cry são altamente seletivas e seguras no ambiente, pois a seletividade das proteínas Cry está relacionada com o sítio de ligação da proteína com o receptor presente nas células epiteliais do intestino médio dos insetos (PIGOTT; ELLAR, 2007).

A classificação das proteínas Cry é baseada na identidade da sequência dos aminoácidos (CRICKMORE et al., 1998). As famílias das proteínas Cry que apresentam maior interesse para agricultura são: Cry1, Cry2 e Cry3, sendo esses tóxicos a larvas de insetos das ordens Lepidóptera, Díptera, Coleóptera e ainda nematóides e ácaros (DEAN, 1984; KOTZE et al., 2005; WEI et al., 2003). Devido a esse amplo espectro de ação, o Bt responde atualmente por 90% dos produtos de controle biológico comercializados mundialmente (VALADARES-INGLIS; SOUZA; SHILER, 1998).

Apesar do sucesso de produtos baseados no Bt convencional, existem diversas desvantagens da utilização dos mesmos como bioinseticidas, sendo uma dessas a dificuldade em atingir a larva alvo, visto que muitos insetos alojam-se e alimentam-se no interior das plantas (DOWNING; LESLIE; THOMSON, 2000). Assim, uma importante alternativa é a clonagem de genes codificadores de proteínas Cry que podem então ser inseridas em microrganismos endofíticos que ocupam o mesmo nicho ecológico dos insetos praga (BARBOZA-CORONA et al., 1999; BARBOZA-CORONA et al., 2003; CHOI et al., 2008; DOWNING; LESLIE; THOMSON, 2000; FAHEY et al., 1991; RAGEV et al., 1996; TOMASINO et al., 1995).

Um exemplo de praga que se aloja no interior da planta hospedeira é a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), cujos adultos colocam os ovos nas folhas da planta e as larvas (lagartas), recém emergidas, migram para se alimentar do colmo, inicialmente na região do crescimento vegetal e posteriormente abrindo galerias em todo o colmo. Esses efeitos provocam danos diretos como a morte da gema apical, redução de peso, encurtamento de entre-nós, quebra de colmos e brotações laterais e danos indiretos como a inversão da sacarose, pela ação de fungos dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum*, que invadem as galerias do inseto (ALMEIDA; 2005).

Dentre diversas bactérias endofíticas potencialmente transformáveis com os genes *cry* e que, além de controlar insetos pragas, poderiam ser benéficas a planta hospedeira, destacam-se os isolados de *P. agglomerans*, visto que essa espécie já foi amplamente estudada, com várias aplicações na área agrícola: no controle de pragas e fitopatógenos e na promoção de crescimento vegetal (BONATERRA et al., 2003; JEUN et al., 2004; LIU; KLOEPPER; TUZUN, 1995; ONGENA et al., 2000; PLAZA et al., 2004). Além disso, a espécie tem sido encontrada colonizando endofiticamente plantas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1986; CAVALCANTE; DOBEREINER, 1988; DONG et al., 1994; LOIRET, 2004; NUNEZ; COLMER, 1968). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi transferir o gene *cry1Ac7* para bactéria *P. agglomerans* (33.1), previamente avaliada quanto a colonização de cana-de-açúcar, e, avaliar o potencial dessa linhagem transformada no controle biológico da lagarta *D. saccharalis*, importante inseto praga de cana-de-açúcar.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Materiais e Métodos

4.2.1.1 Bactérias e plasmídios

A bactéria endofítica *P. agglomerans*, linhagem 33.1, proveniente de *Eucalyptus grandis* (PROCÓPIO, 2004) como descrito nos capítulos anteriores, foi transformada por eletroporação com o plasmídio pJTT (DOWNING; LESLIE; THOMSON, 2000). O

plasmídio possui como características: presença do gene *cry1Ac7*, sítios de homologia para inserção no cromossomo bacteriano e gene de resistência à canamicina (Figura 4.1). As metodologias utilizadas na obtenção de plasmídio, células competentes, transformação bacteriana e *Southern blot* foram as mesmas descritas no capítulo 3. A linhagem 33.1:pNKGFP, por possuir a marca de resistência a canamicina, foi utilizada como controle negativo nos bioensaios contra a lagartas de *D. saccharalis*. Todos os ensaios foram iniciados com culturas frescas das linhagens bacterianas estocadas (-80 °C), sendo as mesmas crescidas em meio sólido Luria Bertani - LB (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) e incubadas a 28°C por 24 horas.

4.2.1.2 Inseto praga: *D. saccharalis*

Os bioensaios com as lagartas *D. saccharalis* foram conduzidos em conjunto com o Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia (ESALQ-USP) em colaboração com o Prof. Dr. José Roberto Postali Parra que, gentilmente, cedeu as lagartas de *D. saccharalis*. Essas foram alimentadas em dieta artificial a base de farelo de soja e germe de trigo (KING; HARTLEY, 1985), mantidas a 25°C, 50-70% de umidade e foto-período de 14/10 horas de claro/escuro, sendo os bioensaios conduzidos nas mesmas condições acima.

Figura 4.1 - Plasmídio pJTT utilizado na transformação da bactéria endofítica *P. agglomerans* (33.1). A parte linearizada é o fragmento do plasmídio que se insere no cromossomo da célula hospedeira (DOWNING; LESLIE; THOMSON, 2000)

4.2.1.3 Bioensaios contra lagartas de *D. saccharalis*

Os testes de toxicidade das linhagens de *P. agglomerans* (33.1, 33.1:pNKGFP e 33.1:pJTT) contra *D. saccharalis* foram realizados inicialmente em dieta artificial (bioensaio *in vitro*) e então desenvolvida uma metodologia de inoculação das linhagens em colmos de cana-de-açúcar dos quais se alimentaram as lagartas de *D. saccharalis* (bioensaio *in vivo*).

4.2.1.3.1 Bioensaio *in vitro*

Foram realizados dois tipos de bioensaios *in vitro* com a linhagem 33.1:pJTT expressando a proteína Cry contra lagartas de *D. saccharalis*. O primeiro bioensaio foi realizado adicionando as linhagens 33.1:pNKGFP e 33.1:pJTT, em fase log de crescimento, na dieta artificial dos insetos, acrescida de canamicina ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$). A dieta foi preparada sem a adição bacteriana, após o cozimento e resfriamento (55°C), 10^7 UFC.mL⁻¹ das linhagens bacterianas foram adicionadas à dieta que foi então vertida em placas de Petri. Após 24 horas, foram introduzidas 10 lagartas de *D. saccharalis* do segundo instar por placa. As avaliações da mortalidade das lagartas foram realizadas após sete dias de incubação. O controle foi a adição do meio de cultura à dieta artificial. Foram utilizadas seis repetições (placas) por tratamento, sendo o ensaio realizado duas vezes.

O segundo ensaio foi realizado incorporando à dieta duas concentrações distintas da linhagem 33.1:pJTT (10^2 e 10^7 UFC.mL⁻¹) e o tratamento controle. A dieta (10 mL) acrescida de canamicina ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$) e das linhagens foi vertida em tubos de vidro onde foram introduzidas duas lagartas do primeiro instar por tubo, num total 20 tubos por tratamento. Neste ensaio foi avaliado o tempo de desenvolvimento das lagartas até o estágio de pupa.

4.2.1.3.2 Bioensaio *in vivo*

No bioensaio *in vivo*, foram utilizados colmos de cana-de-açúcar da variedade SP80-1842, plantados na área experimental do Departamento de Genética, ESALQ-USP, Piracicaba-SP. Os mesmos foram cortados, 2.5 cm, e autoclavados (121°C por 15 minutos). Após a autoclavagem, foram colocados em de LB contendo 10^8 UFC.mL⁻¹ das

linhagens bacterianas, os antimicrobianos: canamicina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), exceto no tratamento com a linhagem 33.1, benomyl-benzimidazole ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), e, ácido ascórbico (0,1%) para evitar oxidação dos colmos. Os mesmos foram incubados a 28°C durante 1 hora sob agitação constante (100 rpm). Após esse período cada colmo foi transferido para um vidro previamente autoclavado e incubados a 28°C por 24 horas em BOD com fotoperíodo de 14/10 horas de claro/escuro para o estabelecimento bacteriano. Passado 24 horas as lagartas no segundo instar (15 lagartas por colmo). Os parâmetros avaliados após 10 e 30 dias foram: a) taxa de mortalidade, b) peso das lagartas e c) presença bacteriana em lagarta e colmo. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, sendo o ensaio realizado duas vezes.

4.2.1.4 Colonização de cana-de-açúcar por *P. agglomerans* 33.1:pJTT

A fim de avaliar a capacidade de colonização da cana-de-açúcar pela linhagem 33.1:pJTT, uma suspensão de 10^7 UFC.mL^{-1} dessa linhagem foi adicionada em vasos (60 cm^3) onde foram previamente aclimatadas as plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, variedade SP80-1842, em casa de vegetação com temperatura controlada de 28°C como descrito no capítulo 2 (item 2.2.1.4.1). 30 dias após inoculação foram re-isoladas a linhagem 33.1:pJTT. O tratamento controle consistiu da adição e meio de cultura (LB) no substrato, sem adição da bactéria.

4.2.1.5 Re-isolamento bacteriano

Foram realizados vários re-isolamentos das linhagens de *P. agglomerans*: bioensaio *in vitro* - da dieta artificial e das lagartas; bioensaio *in vivo* - do colmo e das lagartas; re-inoculação nas plantas aclimatadas - substrato, raiz e parte aérea. As lagartas, raízes e parte aérea foram previamente desinfestadas (ARAÚJO et al., 2002) e 1 grama dos materiais avaliados (com exceção das lagartas) foi macerado na presença de 5mL de tampão PBS (140 mM de NaCl, 3 mM de KCl, 10 mM de Na_2HPO_4 e 2 mM de KH_2PO_4 , pH 7,4) e incubados por 1 hora a 28°C . Cada lagarta foi macerada em 100 μL de PBS. Para as lagartas foram utilizados 100 μL de PBS.lagarta⁻¹.

Após a obtenção da suspensão de microrganismos, foram realizadas diluições em tampão PBS e alíquotas de 100 μL foram semeadas sobre meio tripticaseína de

soja - TSB 5%, suplementado com benomyl-benzimidazole ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$), canamicina ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$) e incubados a 28°C por três dias. Para os re-isolamentos foram utilizadas quatro repetições de cada tratamento.

4.2.1.6 Análise estatística

A análise estatística de todos os dados obtidos foi realizada com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, considerando o delineamento experimental como inteiramente casualizado para os bioensaios em dieta artificial e sub-fatorial para os bioensaios utilizando-se colmos de cana-de-açúcar. Quando necessários, os dados foram modificados para normalização dos mesmos, possibilitando assim a análise estatística.

4.2.2 Resultados

4.2.2.1 Transformação da *P. agglomerans* 33.1 com o plasmídio pJTT

A linhagem 33.1 foi transformada com o plasmídio pJTT, com uma eficiência de transformação de 4.10^2 transformantes. μg de DNA^{-1} . Dentre os transformantes 33.1:pJTT foram selecionados aleatoriamente alguns clones para verificação por *Southern Blot* da integração do fragmento plasmidial no genoma bacteriano. Após confirmação da integração do fragmento plasmidial, um dos clones foi selecionado para ser utilizado nos ensaios posteriores (Figura 4.2). O isolado 33.1 (controle negativo) não apresentou fragmentos detectáveis pela sonda.

4.2.2.2 Bioensaio *in vitro*

A taxa de mortalidade da lagarta *D. saccharalis* quando alimentada com a dieta artificial suplementada com a linhagem 33.1:pJTT (10^7 UFC. mL^{-1}) foi estatisticamente superior do que a encontrado no tratamento controle e no tratamento onde foi adicionada à dieta a linhagem 33.1:pNKGFP na mesma concentração. O tratamento onde foi adicionada a linhagem 33.1:pNKGFP não diferiu estatisticamente do tratamento controle (Figura 4.3).

Figura 4.2 - *Southern Blot* do plasmídeo pJTT e do DNA cromossomal de *P. agglomerans* digeridos por *EcoRI* e hibridizados com a sonda de 4Kb obtida pela digestão do pJTT com *BamHI*. 1. linhagem 33.1, 2. plasmídeo pJTT, 3. linhagem 33.1:pJTT

Posteriormente, foi observado que a densidade populacional da linhagem 33.1:pJTT foi um importante fator na toxicidade da lagarta *D. saccharalis*, uma vez que quando adicionada a concentração de 10^7 UFC.mL⁻¹, o desenvolvimento da lagarta até o estágio de pupa foi afetado quando comparado com o tratamento controle, mas quando adicionada a linhagem na concentração de 10^2 UFC.mL⁻¹, o tempo de desenvolvimento da lagarta foi similar ao tratamento controle (Figura 4.4).

Assim, foi confirmado que a linhagem 33.1:pJTT foi capaz de controlar parcialmente em dieta artificial a lagarta *D. saccharalis*, aumentando a taxa de mortalidade da mesma e também retardando o tempo necessário para o desenvolvimento da lagarta em pupa, fato este que esta diretamente relacionado a dose adicionada a dieta. Entretanto uma vez capaz de se desenvolver em pupa não foi observada alteração no peso das mesmas, independente da dose aplicada.

O re-isolamento da linhagem 33.1:pJTT presente na dieta e no interior das lagartas *D. saccharalis* foi realizado após 24 dias à adição das culturas bacterianas na dieta artificial. Os resultados obtidos demonstraram que na dieta não foi encontrada a linhagem 33.1:pJTT, independentemente da dosagem aplicada. Entretanto, quando realizado o re-isolamento bacteriano presente no interior das lagartas foi observada a presença de 10^3 UFC.lagarta⁻¹ da linhagem 33.1:pJTT no tratamento de alta dosagem

comprovando assim que a mesma foi ingerida pela lagarta.

Figura 4.3 - Efeitos da linhagem 33.1:pJTT, *P. agglomerans*, sobre taxa de mortalidade das lagartas *D. saccharalis* alimentadas em dieta artificial. A taxa de mortalidade das lagartas de *D. saccharalis* foi mensurada após 7 dias de inoculação bacteriana (10^7 UFC.mL⁻¹) na dieta dos insetos. A taxa de mortalidade foi a média de lagartas mortas por placa, sendo avaliadas seis repetições (placas) por tratamento. Cada placa continha 15 lagartas. Tratamentos com a mesma letra não diferem estatisticamente ($P>0,05$) de acordo com o teste de Tukey

4.2.2.3 Bioensaio *in vivo*

A taxa de mortalidade da lagarta quando alimentada em colmo inoculado com a linhagem 33.1:pJTT foi estatisticamente superior as obtidas nos demais tratamentos, e, bem similar ao obtido em dieta artificial, mostrando a consistência da metodologia adotada. Em colmo, surpreendentemente, a mortalidade das lagartas nos demais tratamentos foi menor do que em dieta artificial após 10 dias de inoculação. A mortalidade das lagartas aos 30 dias de inoculação foi alta em todos os tratamentos, isso provavelmente se deve ao fato de que, nesse período os colmos estavam ressecados.

Figura 4.4 - Efeitos da linhagem 33.1:pJTT, *P. agglomerans*, sobre o desenvolvimento das lagartas *D. saccharalis* alimentadas em dieta artificial. O efeito de duas dosagens: alta (10^7 UFC.mL⁻¹) e baixa (10^2 UFC.mL⁻¹) da linhagem 33.1:pJTT foram testadas sobre o desenvolvimento das lagartas até atingir o estágio de pupa. A porcentagem de lagartas pupadas foi mensurada a partir do número total de lagartas que sobreviveram e puparam

Entretanto, a taxa de mortalidade das lagartas alimentadas com a linhagem 33.1:pJTT foi estatisticamente superior aos demais tratamentos (Tabela 4.1). Nesse período foi também observado que além de aumentar a taxa de mortalidade das lagartas, a linhagem 33.1:pJTT afetou negativamente o tamanho e peso das lagartas, sendo que muitas das lagartas encontradas mortas nos colmos colonizados pela linhagem 33.1:pJTT estavam deterioradas e com coloração escura típica da ação do cristal proteico (Figura 4.5).

Figura 4.5 - Bioensaio *in vivo* avaliado após 30 dias de inoculação. **(A)** – Lagartas de *D. saccharalis* alimentadas dos colmos de cana-de-açúcar inoculados com a linhagem 33.1:pJT. **(B)** - A esquerda - lagarta retirada do colmo do tratamento controle e a direita - lagarta retirada do colmo inoculado com a linhagem 33.1:pJT. **(C)** - Lagarta infectada por ingestão de colmo colonizado pela linhagem 33.1:pJT

O ciclo das lagartas foi mais longo em colmo do que em dieta, uma vez que aos 30 dias de inoculação nenhuma tinha pupado em colmo, e como demonstrado no ensaio *in vitro*, após 32 dias todas as lagartas sobreviventes em dieta artificial havia pupado.

As bactérias diferentemente do que foi observado em dieta artificial sobreviveram bem nos colmo de cana-de-açúcar, não sendo observado diferenças de colonização entre as linhagens 33.1:pNKGFP e 33.1:pJT nos dois tempos avaliados. Foi observado também que a densidade bacteriana sofreu redução após 30 dias. Entretanto, a densidade bacteriana foi significativamente diferente, sendo que a linhagem 33.1:pNKGFP foi observada em quantidade superior no primeiro re-isolamento.

Tabela 4.1 - Efeitos das linhagens de *P. agglomerans* sobre lagartas *D. saccharalis* alimentadas com colmos de cana-de-açúcar

Tratamentos	Mortalidade (%) ^a		Peso das lagartas (µg) ^b		Densidade bacteriana ^c			
					lagartas (UFC.lagarta ⁻¹) ^d		colmos (UFC.g de colmo ⁻¹)	
	10 dias	30 dias	10 dias	30 dias	10 dias	30 dias	10 dias	30 dias
Controle	4 (4) b	41(7) b	8,5 a	29,4 a	0 b	0 a	0 c	0 c
33.1	12 (5) b	54 (8) ab	8,8 a	29,2.a	nd	nd	nd	nd
33.1:pNKGFP	10 (8) b	52 (8) b	11,1 a	27,4 a	41272 a	6 a	125x10 ⁵ a	81,4x10 ⁴ a
33.1:pJTT	52(10) a	69 (4) a	9,2 a	20,1 b	41 b	16 a	7,7x10 ⁵ b	6,4x10 ⁴ a

^a A taxa de mortalidade das lagartas de *D. saccharalis* foi mensurada após 10 e 30 dias de inoculação das linhagens nos colmos dos quais se alimentaram as lagartas, sendo avaliadas cinco repetições por tratamento

^b Os dados são o valor médio do peso de 20 lagartas por tratamento sendo aferidos após 10 e 30 dias

^c A densidade das linhagens re-isoladas de lagarta e colmo foram respectivamente transformadas em $\log(\text{UFC}+2).\text{lagarta}^{-1}$ e $\log(\text{UFC}+2).\text{grama de colmo}^{-1}$ para normalização dos dados, sendo então realizadas as análises estatísticas. Os dados são a média de quatro repetições por tratamento.

^d As repetições eram compostas por parcelas de 5 lagartas cada

nd = não determinado

Para todos os dados apresentados, tratamentos com a mesma letra e na mesma coluna não diferem estatisticamente ($P>0,05$) de acordo com o teste de Tukey

4.2.2.4 Colonização de cana-de-açúcar por *P. agglomerans* 33.1:pJTT

Visando avaliar a equivalência da linhagem 33.1:pJTT em colonizar cana-de-açúcar, foi realizada a inoculação dessa linhagem no substrato onde as plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas, e após 30 dias foi realizado o re-isolamento a partir do substrato, do interior das raízes e da parte aérea dos vegetal. Os resultados demonstraram que a linhagem 33.1:pJTT tem capacidade de sobreviver no substrato agregado a raízes e colonizar eficientemente todos os tecidos avaliados da cana-de-açúcar, ou seja, não afeta a capacidade de interação cana-de-açúcar-33.1 devido introdução de gene heterólogo (Figura 4.6). Entretanto, foi observada uma maior densidade da linhagem 33.1:pJTT presente na rizosfera das plantas, o qual diferiu estatisticamente do tratamento controle, mas não diferiu estatisticamente dos outros tecidos da planta como raiz e parte aérea.

Figura 4.6 - Re-isolamento da linhagem 33.1:pJTT presentes no substrato e no interior das plantas de cana-de-açúcar após 30 dias da inoculação bacteriana. Os dados da média de 4 repetição da densidade bacteriana foram transformados em $\log_{10} (UFC+2)/\text{grama}$ para normalização, sendo avaliados estatisticamente pelo teste de Tukey ($P>0,05$)

4.2.3 Discussão

A clonagem do gene codificador da proteína Cry proporcionou uma enorme exploração do potencial biotecnológico dessas proteínas, sendo descobertas novas proteínas Cry, novos isolados recombinantes para uso comercial, e, a criação e comercialização em larga escala de plantas (algodão, milho, batata) expressando os mais diversos genes *cry*. Entretanto, o uso de microrganismos transgênicos, contendo o gene *cry*, como agentes de controle biológico possuem algumas vantagens sobre a utilização de plantas expressando a δ - endotoxina. A relativa rapidez na obtenção dos recombinantes, e o fato de que o genoma de bactérias é mais parecido com o de Bt, com porcentagem de bases e códons semelhantes, sem a necessidade do uso de códons sintéticos, como ocorre em plantas expressando o gene *cry* (ESTRUCH et al., 1997; FEARING et al., 1997; PERLAK et al. 1991), são algumas das características vantajosas desta estratégia.

Por essas razões, os genes *cry* provenientes de Bt têm sido introduzidos em várias bactérias visando o controle biológico de pragas agrícolas, como exemplo as bactérias rizosféricas, uma das primeiras geneticamente modificadas com esses genes, *Pseudomonas fluorescens* e *Agrobacterium radiobacter*, as quais foram geneticamente modificadas com o genes *cry* e utilizadas no controle de *Manduca sexta* (OBUKOWICZ et al., 1986; OEDA et al., 1987). Downing, Leslie e Thomson (2000) clonaram o gene *cry1Ac7* em uma bactéria da filosfera *P. fluorescens* (14) e em uma bactéria endofítica diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54), visando o controle da praga *Eldana saccharina* presente em canaviais da África do Sul. Entretanto, o único produto comercial composto por bactéria geneticamente modificada expressando o gene *cry* lançado no mercado foi o “Incide”. Esse produto era composto pela bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, na qual foi introduzido o gene da endotoxina (FAHEY et al., 1991; TOMASINO et al., 1995), e, exibe toxicidade à broca do milho (*Ostrinia nubilalis*). Em relação ao hospedeiro, observou-se que a presença deste endófito levava a um aumento na quantidade de nitrogênio na planta, independente da presença do gene exógeno; mas não foi observada alteração na composição de N₂ dos resíduos das plantas no solo, após inoculação.

Assim, devido à necessidade de estudo e desenvolvimento de bactérias

endofíticas expressando genes inseticidas heterólogos, a *P. agglomerans* 33.1 foi transformada com o gene *cry1Ac7*. A linhagem transformada teve o gene inserido no seu genoma, e a estabilidade da integração foi observada após 180 gerações (dado não apresentado). Downing, Leslie e Thomson (2000), desenvolveram o plasmídio pJTT e transformaram *P. fluorescens*, linhagem 14. Herrera; Snyman e Thomson (1994) provaram que o cassette Omegon-Km-*cry* em *P. fluorescens* 14 foi estável por mais de 100 gerações. A estabilidade do gene no genoma bacteriano, bem como a expressão satisfatória do gene heterólogo, é um dos requisitos principais para aplicação de microrganismos geneticamente modificados no ambiente. A inserção do *cry1Ac7* na linhagem 33.1;pJTT apresentou-se bem estável.

Apesar de várias espécies bacterianas já terem sido transformadas com o gene *cry*: *Escherichia coli* (GE; PWSTER; DEAN, 1990; OEDA et al., 1987), *C. xyli* (TURNER et al., 1991) *P. fluorescens* (DOWNING; LESLIE; THOMSON, 2000), *Burkholderia cepacia*, *B. megaterium* (BORA et al., 1994), *B. cereus* (MOAR et al., 1994), *B. pumulis* (SELINGER et al., 1998), *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense* (UDAYASURIAN et al., 1995), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (FALCÃO-SALLES et al., 2000), *H. seropedicae* (DOWNING; LESLIE; THOMSON, 2000; FALCÃO-SALLES et al., 2000), *Methylobacillus fagellatum* (MARCHENKO et al., 2000), *B. subtilis* e *B. licheniformis* (THEODULOZ et al., 2003), *M. extorquens* (CHOI et al., 2008), esse é o primeiro relatado na literatura da manipulação genética de uma linhagem de *P. agglomerans* com o gene *cry* visando o controle biológico de uma praga.

Em Bt, os genes *cry1* codificam proteínas com peso molecular de 130 a 140 kDa, que se acumulam na célula mãe na forma de cristais bipiramidais, durante a fase de esporulação. Após a solubilização destes cristais em pH alcalino, ocorre a liberação da protoxina, que é ativada por proteases presentes no intestino médio das larvas, liberando o fragmento tóxico com tamanho variável de 60 a 70 kDa (HÖFTE; WHITELEY, 1989). Esta classe contém 6 subclasses de genes (*cryIA* a *F*), com identidade de aminoácidos superior a 55% (HÖFTE; WHITELEY, 1989).

Udayasuriyan et al. (1995) transferiram o gene *cry1Aa* para *A. lipoferum* e *A. brasilense*. Entretanto, não foram obtidos transconjugantes desta última espécie. Apesar de confirmada a presença do plasmídio contendo o gene *cry* nos

transconjugantes de *A. lipoferum*, não foi detectada a expressão deste gene. Estudos avaliando a estabilidade do plasmídeo e do crescimento do transconjugante revelaram que a manutenção do gene *cry* inibia o crescimento de *A. lipoferum*, talvez devido ao conteúdo de bases G+C no genoma desta bactéria ser muito elevado (variando de 67 a 71%) com relação ao gene *cry1Aa* (37%). O mesmo não foi observado com a linhagem 33.1:pJTT que apresentou crescimento semelhante a linhagem selvagem 33.1, independente do meio de crescimento utilizado (dado não apresentado).

Os testes de *Western blot* foram considerados dispensáveis uma vez que a expressão do gene *cry1ac7* no plasmídeo pJTT sob ação do promotor *tac* já havia sido realizado por Downing; Leslie e Thomson (2000). A comprovação da expressão do gene *cry1ac7* pela linhagem 33.1:pJTT foi observado apenas de maneira indireta, nos bioensaios, onde a presença da linhagem 33.1:pJTT aumentou a taxa de mortalidade da praga *D. saccharalis* em dieta artificial. Por ser endofítica, e já descrita como colonizadora de cana-de-açúcar, essa linhagem pode atingir os insetos que se alimentam no interior da planta hospedeira como a lagarta *D. saccharalis*, um lepidóptero que tem causado grandes prejuízos à lavoura canavieira.

D. saccharalis é uma das principais pragas em cana-de-açúcar e causa prejuízos diretos como abertura de galerias que vão ocasionar perda de peso na cana-de-açúcar e provocar a morte das gemas, causando falhas na germinação. Nas canas novas, a broca produz o secamento dos ponteiros, conhecido como coração morto. Dentre os prejuízos indiretos destacam-se a penetração de fungos através dos orifícios e galerias, abertos pela broca, causando a podridão vermelha do colmo. Os fungos *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium verticillioides* invertem a sacarose, diminuindo a pureza e ocasionando menor rendimento em açúcar e álcool (GALLO et al., 2002; ALMEIDA, 2005).

A linhagem também foi adicionada nos colmos de cana-de-açúcar que serviram de alimento para as lagartas de *D. saccharalis*. Apesar das limitações encontradas: desenvolvimento do ensaio em ambiente controlado, pouco tempo de avaliação o que impossibilitou o monitoramento de todo o ciclo do inseto, a mortalidade das lagartas em ensaios com colmos de cana-de-açúcar foi bem similar aos ensaios utilizando dieta artificial, demonstrando assim a eficiência da metodologia desenvolvida

Os testes preliminares de equivalência foram realizados, sendo observado que como a linhagem 33.1, a linhagem 33.1:pJTT não afeta a densidade bacteriana associada a cana-de-açúcar, sendo também verificada por re-isolamento a colonização de cana-de-açúcar pela linhagem 33.1:pJTT.

O aumento na produção de cana-de-açúcar é um desafio, visto que fatores bióticos e abióticos são responsáveis por enormes perdas econômicas. O uso de inimigos naturais como *Cotesia flavipes* no controle de *D. saccharalis* tem sido uma eficiente forma de controle biológico (BOTELHO; MACEDO, 2002), entretanto injúrias residuais de 10% é uma ótima justificada para visar o aumento da eficiência de controle dessa praga (FALCO et al., 2003). Além disso, a produção de tais parasitóides nas usinas de cana-de-açúcar acarreta custos e poucos estudos têm avaliado os efeitos de predadores nativos contra esses parasitóides e os efeitos dos mesmos nas populações da broca da cana-de-açúcar (ROSSI; FOWER, 2002).

Uma alternativa para conferir resistência ao inseto é a expressão de δ -endotoxinas provenientes de Bt (ARENCEBIA et al, 1997; BRAGA et al, 2001). Essa expressão deve ocorrer no local de infecção da broca, dentro dos colmos de cana-de-açúcar. A linhagem de *P. agglomerans* (33.1), como demonstrado anteriormente, produz o fitormônio vegetal ácido-indol-acético em grandes quantidades e solubiliza fosfato possuindo potencial para a promoção de crescimento de cana-de-açúcar. Além de ter sido avaliada quanto à colonização de cana-de-açúcar. A manipulação genética dessa linhagem visando o controle da lagarta *D. saccharalis* no interior de cana-de-açúcar é uma atrativa opção de manejo dessa praga. Outros genes podem ser adicionados a 33.1, possibilitando também o controle dos fitopatógenos associados a *D. saccharalis* como o fungo *Fusarium verticillioides*. Apesar dos resultados promissores obtidos no presente trabalho, ainda são necessários estudos mais completos em casa de vegetação com cana-de-açúcar comercial, bem como a determinação da melhor forma de aplicação em condições de campo.

Referências

- ALMEIDA, L. C. **Dados de produção dos laboratórios de controle biológico da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*), nas usinas Cooperadas do Centro de tecnologia Canavieira, de 1990 a 2005**. Piracicaba: Centro de Tecnologia Canavieira, 2005. 28p.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. **Manual: isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ. 2002. 86p.
- ARENCIBIA, A.; VAZQUEZ, R. I.; PRIETO, D.; TELLEZ, P.; CARMONA, E. R.; COEGO, A.; HERNANDEZ, L.; DELARIVA, G. A.; SELMANHOUSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack, **Molecular Breeding**, Berlin, v. 3, 247–255, 1997.
- 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.
- BARBOZA-CORONA, J. E.; CONTRERAS, J. C.; VELAZQUEZ-ROBLEDO, R.; BAUTISTA-JUSTO, M.; GOMEZ-RAMIREZ, M.; CRUZ-CAMARILLO, R.; IBARRA, J. E. Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 21, p. 1125–1129, 1999.
- BARBOZA-CORONA, J. E., NIETO-MAZZOCCO, E.; VELAZQUEZ-ROBLEDO, R.; SALCEDO-HERNANDEZ, R.; BAUTISTA, M.; JIMENEZ, B.; IBARRA, J. E. Cloning, sequencing, and expression of the chitinases gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 1023–102, 2003.
- BONATERRA, A.; MARI, M.; CASALINI, L.; MONTESINOS, E. Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonism. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, p. 93-104, 2003.
- BORA, R. S.; MURTY, M. G.; SHENBAGARATHAI, R.; SEKAR, V. Introduction of a lepidopteran-specific insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by conjugal transfer into a *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 60, p. 214–222, 1994.
- BOTELHO, P. S. M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA- FERREIRA, B. S. BENTO, J.M.S. (Org.). **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**, São Paulo: Editora Manole. 2002, p. 409–425.

BRAGA, D. P. V.; ARRIGONI, E. D. B.; BURNQUIST, W. L.; SILVA-FILHO, M. C.; ULIAN, E. C. A new approach for control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) through the expression of an insecticidal CryIa(b) protein in transgenic sugarcane. In: INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 24., 2001. Brisbane, 2001. **Proceedings ...** Brisbane: ISSCT, 2001, p. 331–336.

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

CHOI, Y. L.; GRINGORTEN, J. L.; BELANGER, L.; MOREL, L.; BOURQUE, D.; MASSON, L.; GROLEAU, D.; MIGUEZ, C. B. Production of an insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* by the methylotroph *Methylobacterium extorquens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 74, p. 5178–5182, 2008.

CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D. R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, p. 807–813, 1998.

DEAN, D. H. Biochemical genetics of the bacterial insect-control agent *Bacillus thuringiensis*: basic principles and prospect for genetic engineering. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, Andover, v. 2, p. 341–363, 1984.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; McCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. G.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. **Plant Physiology**, Rockville, v. 105, p. 1139–1147, 1994.

DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* *cry1Ac7* and *Serratia marcescens* *chiA* genes in sugarcane-associated bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 2804–2810, 2000.

ESTRUCH, J. J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, New York, v. 15, p. 137–141, 1997.

FAHEY, J. W.; DIMOCK, M. B.; TOMASINO, S. F.; TAYLOR, J. M.; CARLSON, P. S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: A case study in industry. In: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S. S. (Org.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer – Verlag. 1991. p. 401–411.

FALCÃO-SALLES, J.; DEMEDEIROS-GITAHY, P.; SKOT, L.; BALDANI, J. I. Use of endophytic diazotrophic bacteria as a vector to express the *cry3A* gene from *Bacillus thuringiensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, p. 31, v. 155–161, 2000.

FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, p. 41, v. 761–766, 2003.

FEARING, P.L.; BROWN, D.; VLACHOS, D.; MEGHJI, M.; PRIVALLE, L. Quantative analysis of CryIA(b) expression in *Bt* maize plants, tissue and silage, and stability of expression over successive generations. **Molecular Breeding**, Berlin, v. 3, p. 169–176, 1997.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 2002. 920p.

GE, A. Z.; PWSTER, R. M.; DEAN, D. H. Hyperexpression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin-encoding gene in *Echerichia coli*: properties of the product. **Gene**, Amsterdam, v. 93, p. 49–54, 1990.

HERRERA, G., SNYMAN, S. J.; THOMSON, J. A. Construction of a bioinsecticidal strain of *Pseudomonas fluorescens* active against the sugarcane borer, *Eldana saccharina*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 60, p. 682–690, 1994.

HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 53, p. 242–255, 1989.

JEUN, Y. C.; PARK, K. S.; KIM, C. H.; FOWLER, W. D.; KLOEPPER, J. W. Cytological observation of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 39–42, 2004.

KING, E. G.; HARTLEY, G. G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, H. P.; MOORE, R. F. (Org.). **Handbook of insects rearing**, New York: Elsevier: 1985. p. 265-270.

KOTZE, A. C.; O'GRADY, J.; GOUGH, J. M.; PEARSON, R.; BAGNALL, N. H.; KEMP, D. H.; AKHURST, R. J. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to parasitic and free-living life-stages of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 35, p. 1013–1022, 2005.

LIU, L.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Lancaster, v. 85, p. 695-698, 1995.

LOIRET, F. G.; ORTEGA, E.; KLEINER, D.; ORTEGA-RODE, P.; RODE'S, R.; DONG, Z. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.97, p.504–511, 2004.

MARCHENKO, N. D.; MARCHENKO, G. N.; GANUSHKINA, L. O.; AZIZBEKYAN, R. R. Cloning and expression of mosquitocidal endotoxin gene cryIVB from *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* in the obligate methylotroph *Methylobacillus xagellatum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 24, p. 14–18, 2000.

MOAR, W. J.; TRUMBLE, J.; HICE, R.; BACKMANN, P. Insecticidal activeity of the CryIIA protein from the NRD-12 isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* and in a leaf-colonizing strain of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 60, p. 896–902, 1994.

NUNEZ, W. J.; COLMER, A. R. Differentiation of *Aerobacter-Klebsiella* isolated from sugarcane. **Applied Microbiology**, Baltimore, v. 16, p.1875-8, 1968.

OBUKOWICZ, M. G.; PERLAK, F. J.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E.J.; WATRUD, L.S. Integration of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root colonizing pseudomonads using *Tn5*. **Gene**, Amsterdam, v. 45, p. 327-331, 1986.

OEDA, K.; OSHIE, K.; SHIMIZU, M.; NAKAMURA, K.; YAMAMOTO, H.; NAKAYAMA, I.; OHKAWA, H. Nucleotide sequence of the insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis* strain aizawai IPL7 and its high-level expression in *Escherichia coli*. **Gene**, Amsterdam, v. 53, p. 113-119, 1987.

ONGENA, M.; DAAYF, F.; JACQUES, P.; THONART, P.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C.; BELANGER, R. R. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. **Plant Pathology**, London, v. 49, p. 523–530, 2000.

PERLAK, F. J.; FUCHS, R. L.; DEAN, D. A.; MCPHERSON, S.; FISCHHOFF, D. A. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.88, p. 3324–3328, 1991.

PIGOTT, C. R.; ELLAR, D. J. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 71, p. 255–281, 2007.

PLAZA, P.; USALL, J.; SMILANICK, J. L.; LAMARCA, N.; VINAS, I. Combining *Pantoea agglomerans* (CPA-2) and curing treatments to control established infections of *Penicillium digitatum* on lemons **Journal of Food Protection**, Ames, v. 67, p. 781-786, 2004.

PROCÓPIO, R.E.L. **Diversidade bacteriana endofítica de *Eucaliptus spp.* e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 115p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Bimédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

RAGEV, A.; KELLER, M.; STRIZHOV, N.; SNEH, B.; PRUDOVSKY, E.; CHET, I.; GINZBERG, I.; KONCZ-KALMAN, Z.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p. 3581–3586, 1996.

ROSSI, M. N.; FOWLER, H. G. Manipulation of fire ant density, *Solenopsis* spp., for short-term reduction of *Diatraea saccharalis* larval densities in Brazil. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, p. 13-15, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2344p.

SCHNEPF, E. ; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D. R.; DEAN, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, p. 775-806, 1998.

SELINGER, L. B.; KHACHTOURIANS, G. G.; BYERS, J. R.; HYNES, M. F. Expression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin gene by *Bacillus pumilus*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 259–269, 1998.

THEODULOZ, C.; VEGA, A.; SALAZAR, M.; GONZALEZ, E.; MEZA-BASSO, L. Expression of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin *cry1Ab* gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, p. 375–381, 2003.

TOMASINO, S. F.; LEISTER, R. T.; DIMOCK, M. B.; BEACH, R. M.; KELLY, J. L. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* expressing the insecticidal protein gene *cryIA* (c) of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. **Biological Control**, Orlando, v. 5, p. 442-448, 1995.

TURNER, J. T.; LAMPEL, J. S.; STEARMAN, R. S.; SUNDIN, G. W.; GUNYUZLU, P.; ANDERSON, J. J. Stability of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xily* subsp. *cyondontis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 57, p. 3522–3528, 1991.

UDAYASURIAN, V.; NAKAMURA, A.; MASAKI, H.; UOZUMI, T. Transfer of an insecticidal protein gene of *Bacillus thuringiensis* into plant-colonizing *Azospirillum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 11, p. 163–167, 1995.

VALADARES-INGLIS, M. C.; SOUZA, M. T.; SHILER, W. Engenharia genética de microrganismos agentes de controle biológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Org.). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA 1998, p. 208-217.

WEI, J. Z.; HALE, K.; CARTA, L.; PLATZER, E.; WONG, C.; FANG, S. C.; AROIAN, R. V. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 2760–2765, 2003.

5 O PAPEL DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NO CONTROLE DE *Fusarium* spp. PELA RIZOBACTÉRIA *Pseudomonas fluorescens* (Pf-5)

Resumo

A bactéria *Pseudomonas fluorescens*, Pf-5, é um habitante natural da rizosfera de muitas plantas, agindo como agente de biocontrole de inúmeras doenças de solo e que produz no mínimo 10 diferentes metabólitos secundários incluindo vários com propriedades antifúngicas. No presente trabalho, foram obtidos por sítio-dirigido vários mutantes de Pf-5 contendo simples e múltiplas mutações nos genes presentes em grupo gênico de biossíntese de metabólitos com atividade antifúngica: 2,4-diacetil-floroglucinol (PHL), pirrolnitrina, pioluteorina, cianeto de hidrogênio e rizoxina, além de dois sideróforos, pioverdina e pioquelina. Esses mutantes foram testados contra isolados patogênicos de milho e cana-de-açúcar, *Fusarium verticillioides*, além de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, patógenos de ervilha. Esses fitopatógenos foram similares mas não idênticos quanto a sensibilidade aos metabólitos produzidos por Pf-5, entretanto, para todos os fitopatógenos, o PHL e a rizoxina foram os principais metabólitos responsáveis no antagonismo dos mesmos. Em meio King's B, a produção de sideróforos pela Pf-5 também apresentou inibição para alguns isolados de *Fusarium* spp. Previamente, outros estudos demonstraram que a micotoxina ácido fusárico, produzida por várias espécies de *Fusarium*, é capaz de inibir a produção de PHL por *Pseudomonas* spp. Nesse estudo, a adição de ácido fusárico em meio de cultura reprimiu fortemente a produção de PHL, além do transcrito *phlD*. A produção de rizoxina, pioluteorina, pirrolnitrina e pioverdina e de seus respectivos transcritos *rxzB*, *pltA*, *prnC* e *pvdA* foram sutilmente aumentados na presença de ácido fusárico. Esses resultados indicam que o ácido fusárico influenciou a produção de antibióticos e sideróforos pela Pf-5 inclusive transcricionalmente. Os resultados demonstraram a importância de dois compostos PHL e rizoxina no antagonismo de *Fusarium* spp. Foi também confirmado um sistema de sinalização entre os microrganismos mediado pelo ácido fusárico, que, influenciou a produção de compostos pela bactéria Pf-5, sendo esses compostos envolvidos no controle biológico.

Palavras-chave: Controle biológico; *Fusarium* spp.; Metabólitos secundários; *Pseudomonas fluorescens*; Ácido fusárico

5 THE ROLE OF SECONDARY METABOLITES ON *Fusarium* spp. SUPPRESSION BY RHIZOBACTERIUM *Pseudomonas fluorescens* Pf-5

Abstract

Pseudomonas fluorescens strain Pf-5 is a rhizosphere bacterium that acts as a biocontrol agent of soilborne plant diseases. It produces at least 10 different secondary metabolites including several with antifungal properties. The present work derived site-directed mutants of Pf-5 with single and multiple mutations in the biosynthetic gene clusters for the antifungal metabolites 2,4-diacetylphoroglucinol (PHL), pyrrolnitrin, pyoluteorin, hydrogen cyanide and rhizoxin even the two siderophores pyoverdine and pyochelin. These mutants were tested for suppression of the pathogens from corn and sugarcane *Fusarium verticillioides* and from pea *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*. Those pathogens were similar, but not identical, in their sensitivity to Pf-5 metabolites. However for all strains PHL and rhizoxin were found to be primarily responsible for fungal antagonism by Pf-5 in many tested cultures. On King's Medium B, siderophore production by Pf-5 also played a role in suppression of some *Fusarium* spp. Previously, other workers showed that the mycotoxin fusaric acid, which is produced by many *Fusarium* species, inhibited the production of PHL by *Pseudomonas* spp. In this study, amendment of the culture medium with fusaric acid strongly decreased PHL production and transcript levels of *phlD* biosynthetic genes. Rhizoxin, pyoluteorin, pyrrolnitrin and pyoverdin production, as their transcripts *rzxB*, *pltA*, *prnC* and *pvdA* respectively, were slightly increased in fusaric acid presence. These results indicate that the mycotoxin influenced antibiotic and siderophore production by Pf-5 at the transcriptional and production level. The results demonstrated the importance of two compounds, PHL and rhizoxin, in suppression of *Fusarium* spp. by Pf-5. It also confirmed that an inter-species signaling system mediated by fusaric acid influenced compounds production by the bacterial biological control organism.

Keywords: Biological control; *Fusarium* spp.; Secondary metabolites; *Pseudomonas fluorescens*; Fusaric acid

5.1 Introdução

O gênero *Pseudomonas* não contém somente patógenos de plantas, animais e humanos, mas também importantes espécies de significativo interesse ambiental e agrícola, incluindo entre essas, as *Pseudomonas spp.* fluorescentes promotoras de crescimento vegetal, degradadoras de xenobióticos e agentes de biocontrole para doenças de várias culturas. Além, inúmeros antibióticos têm sido isolados de várias espécies de *Pseudomonas spp.* fluorescentes (CHIN-A-WOENG; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2003; DE SOUZA et al., 2003a,b; LOPER et al., 2008; NIELSEN et al., 2002; RAAIJMAKERS; VLAMI; DE SOUZA, 2002).

A produção desses antibióticos é de suma importância para o controle de doenças na agricultura, destacando-se o controle de doenças causadas por fungos do gênero *Fusarium* (DHINGRA et al., 2006; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, et al. 2008; HERBAR et al., 1992a,b,c; JOHNSON; HÖKEBERG; GERHARDSON, 1998; MAURHOFER et al., 1995). Outro mecanismo de controle é a produção de sideróforos que, em ambientes pobres em ferro, quelam esse mineral, inibindo o crescimento do fitopatógeno (DUFFY; DÉFAGO, 1999; KLOPPER et al., 1980a,b; LAMANCEAU; ALABOUVETTE, 1993).

Isolados de *Fusarium spp.*, patógenos de plantas, causam substanciais perdas na produção de várias culturas, sendo considerado um dos mais importantes patógenos de solo. Em cana-de-açúcar, a fusariose pode ocasionar uma grande variedade de sintomas nas plantas, que dependem do estágio de desenvolvimento da cana-de-açúcar, do seu nível de resistência e das condições ambientais. Em plântulas de cana-de-açúcar os sintomas são: sistema radicular pouco desenvolvido; baixo vigor; podridão de raiz e de colo; tombamento. Em toletes de plantio, os sintomas são: baixa brotação das gemas; podridão de raiz; enfezamento (redução no tamanho) dos brotos. Nos colmos os sintomas são muito parecidos com os da podridão vermelha e seu aparecimento está associado a ferimentos químicos ou físicos como aqueles causados por brocas (ROSSETTO; SANTIAGO, 2009). Outro dano causado é o chamado *Pokkah boeng*, em que ocorre uma deformação do topo da cana-de-açúcar. Essa doença, causada pelo fungo *F. verticillioides*, está amplamente espalhada pelas áreas de cultivo de cana-de-açúcar ao redor do mundo, embora não seja uma das doenças mais

importante dos campos brasileiros essa doença pode causar grandes perdas na produção (RAID, 1998).

Fusarium spp. produzem um amplo espectro de micotoxinas, as quais resultam em diversos efeitos nocivos para a saúde humana e animal (GUPTA; BARAN; SUMMERBEL, 2000; JOFFE, 1986). Durante o ciclo saprofítico e parasítico de vida, *Fusarium* spp. são expostos a vários metabólitos tóxicos, incluindo metabólitos antifúngicos produzidos por microrganismos que coabitam o mesmo nicho (CHIN-A-WOENG; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2003; LAGOPODI et al., 2002). Todavia, *Fusarium* spp. podem tolerar ou combater os metabólitos tóxicos e então serem capazes de se propagar, infectar e colonizar as plantas (SCHOUTEN et al., 2004).

Os mecanismos que capacitam os microrganismos para resistir aos metabólitos tóxicos têm sido descritos nas mais diversas áreas: médica, biorremediação e interações planta-patógenos e microrganismo-patógenos; e, incluem entre outros mecanismos a degradação de enzimas e a inativação de antibióticos (ALEXANDER; MCCORMICK; HOHN, 1999; DE WAARD, 1997; FLEISSNER; SOPALLA; WELTRING, 2002; MORRISSEY; OSBOURN, 1999; SCHOONBEEK; RAAIJMAKERS; DE WAARD, 2002; STEFFENS; PELL; TIEN, 1996; VANETTEN; TEMPORINI; WASMANN, 2001).

Relativamente, pouco é conhecido sobre os mecanismos envolvidos nessas complexas interações e sobre os mecanismos de defesa desenvolvidos pelos fungos. Além disso, estudos têm apresentado que, dentro de várias populações fúngicas, existe uma grande variação na sensibilidade dos mesmos para metabólitos antifúngicos produzidos por bactérias antagonistas, o que dificulta ainda mais os estudos (DUFFY; SCHOUTEN; RAAIJMAKERS, 2003). Por exemplo, vários isolados de *Fusarium* spp. diferem na sensibilidade de 2,4-diacetil-floroglucinol (PHL) e/ou fenazina, importantes antifúngicos produzidos por *Pseudomonas* spp. (MAZZOLA et al., 1995). Assim, em relação à resposta de defesa de *Fusarium* spp. contra antibióticos produzidos por *Pseudomonas* spp. Duffy e Défago (1997) demonstraram que o ácido fusárico (AF) age como uma molécula sinal repressora da biossíntese de PHL pela bactéria antagonista *P. fluorescens* CHA0, sendo que, em vários estudos, o AF tem apresentado ação de repressão sobre o gene *phlA*, tanto em *in vitro* quanto *in situ* (NOTZ et al., 2002; SCHNIDER-KEEL et al., 2000).

Dentre as linhagens de *Pseudomonas* fluorescentes utilizadas na agricultura como agentes de biocontrole, a linhagem Pf-5, *P. fluorescens* (HOWELL; STIPANOVIC 1979), foi a primeira bactéria comensal de rizosfera com seu genoma completamente sequenciado (PAULSEN et al., 2005). Vários metabólitos secundários como antibióticos e sideróforos produzidos pela linhagem Pf-5 são conhecidamente relacionados ao controle biológico de *Fusarium* spp., destacando-se PHL, pioluteorina, pirrolnitrina, cianeto de hidrogênio e sideróforos (LOPER; GROSS, 2007). Além do uso direto da Pf-5 como agente de biocontrole, esses metabólitos podem ser aplicadas na agricultura como biofungicidas, ou, os genes codificadores desses compostos podem ser transferidos e super expressos por outros microrganismos que habitam o mesmo nicho dos fitopatógenos. Assim, o presente estudo visou determinar quais metabólitos secundários produzidos pelo isolado Pf-5 são importantes para o controle de *Fusarium* spp. e qual a influência do AF na modulação molecular durante a expressão desses metabólitos e, conseqüentemente, no controle de *Fusarium* spp.

5.2 Desenvolvimento

5.2.1 Materiais e Métodos

5.2.1.1 Microrganismos e condições de cultivo

P. fluorescens, linhagem Pf-5, foi isolada de solo supressivo cultivado por algodão (HOWELL; STIPANOVIC, 1979). A linhagem Pf-5 e seus mutantes foram estocados em meio nutriente (NB), suplementado com glicerol (15%) e estocado à -80°C (Tabela 5.1). Todos os experimentos foram iniciados com culturas frescas crescidas primeiramente em meio King's B (KB) ágar (KEEL et al., 1992) à 28°C.

Para os ensaios de antagonismo foram utilizados seis diferentes isolados fitopatogênicos de *Fusarium* spp. (Tabela 5.2) que foram rotineiramente crescidos em meio batata dextrose ágar (BDA) (Difco). Os isolados foram estocados à temperatura ambiente, em discos de BDA imersos em água destilada previamente esterilizada. Todos os experimentos foram iniciados com culturas frescas crescidas em meio BDA a 28°C.

Tabela 5.1 - Linhagens de *P. fluorescens* Pf-5 utilizadas nesse estudo

Linhagens	Características da mutação*	Fenótipo	Referências
Pf-5		Tipo selvagem	Howell e Stipanovic (1979)
	Mutantes simples		
JL4577	Mutação no gene PFL_3566, regulador de transcrição <i>gacA</i> .	GacA ⁻	Corbell (1999)
JL4793	Mutação no gene PFL_3606, <i>prnC</i> , requerido para biossíntese de pirrolnitrina.	Prn ⁻	Dimitri Mavrodi (não publicado)
JL4804	Mutação no gene PFL_5957, <i>phlD</i> , requerido para biossíntese de 2,4 diacetil-floroglucinol.	Phl ⁻	Brazelton et al. (2008)
JL4805	Mutação no gene PFL_2787, <i>pltB</i> , requerido para biossíntese de pioluteorina.	Plt ⁻	Presente estudo
JL4806	Mutação no gene PFL4095, <i>pvdI</i> , requerido para biossíntese de pioverdina.	Pvd ⁻	Kidarsa; Hartney (não publicado)
JL4808	Mutação no gene PFL_2989, <i>rzxB</i> , requerido para biossíntese de rizotoxina.	Rzx ⁻	Presente estudo
JL4809	Mutação no gene PFL_2578-, <i>hcnB</i> , requerido para biossíntese de cianeto de hidrogênio.	Hcn ⁻	Presente estudo
JL4898	Mutação no gene PFL3490 <i>pchC</i> , requerido para biossíntese de pioquelina.	Pch ⁻	Kidarsa; Hartney (não publicado)
	Mutantes duplos		
JL4830	Mutação nos genes <i>phlD</i> e <i>prnC</i> .	Phl ⁻ , Prn ⁻	Presente estudo
JL4900	Mutação nos genes <i>pvdI</i> e <i>pchC</i>	Pvd ⁻ , Pch ⁻	Kidarsa; Hartney (não publicado)
JL4901	Mutação nos genes <i>phlD</i> e <i>rzxB</i> .	Phl ⁻ , Rzx ⁻	Presente estudo
JL4902	Mutação nos genes <i>prnC</i> e <i>rzxB</i> .	Prn ⁻ , Rzx ⁻	Presente estudo
JL4913	Mutação nos genes <i>pltB</i> e <i>rzxB</i> .	Plt ⁻ , Rzx ⁻	Presente estudo
	Mutantes triplos		
JL4934	Mutação nos genes <i>prnC</i> e <i>hcnA</i> .	Prn ⁻ , Hcn ⁻	Presente estudo
JL4844	Mutação nos genes <i>phlD</i> , <i>prnC</i> e <i>rzxB</i> .	Phl ⁻ , Prn ⁻ , Rzx ⁻	Presente estudo
JL4936	Mutação nos genes <i>phlD</i> , <i>prnC</i> e <i>hcnA</i> .	Phl ⁻ , Prn ⁻ , Hcn ⁻	Presente estudo
	Mutantes quintuplos		
JL4865	Mutação nos genes <i>phlD</i> , <i>prnC</i> , <i>hcnA</i> , <i>pltB</i> e <i>rzxB</i>	Phl ⁻ , Prn ⁻ , Hcn ⁻ , Plt ⁻ , Rzx ⁻	Presente estudo

* O acesso dos genes da linhagem Pf-5, PFL_, foram obtidos no site www.pseudomonas.com

F. oxysporum isolados: F234 e R5 são fitopatógenos de ervilha e foram gentilmente cedidos pelo Dr. Lyndon Porter do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da America (United State Departament of Agriculture - USDA), *F. verticillioides*, T4 Ø, isolado patogênico de milho foi gentilmente cedido pela Profa. Dra.

Cynthia M. Ocamb da Universidade do Estado de Oregon (Oregon States University - OSU).

A linhagem Pf-5, seus respectivos mutantes e os fitopatógenos citados acima pertencem ao Laboratório da Dra. Joyce E. Loper, USDA, situado na OSU, Departamento de Botânica e Patologia de Planta, Corvallis, OR, EUA.

F. verticillioides, FV-01 CTC, patógeno de cana-de-açúcar foi gentilmente cedido pela Doutora Sabrina Moutinho Chábregas do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba-SP. Adicionalmente foram obtidos isolados a partir de sintoma de *Pokkah boeng* para serem incluídos nos ensaios de antagonismo, as folhas apresentando sintomas característicos da doença foram gentilmente cedidas pelo Dr. Walter Maccheroni Jr., pesquisador da CanaViallis-SA. Os tecidos foram imersos em solução de etanol 70%, lavados com água estilizada. Após, os fragmentos foram postos em placas de papel de filtro umedecido e incubados a 28°C (MENDES, 2008). Para purificação das colônias, esporos e/ou micélio foram transferidos para microtubos de 2 mL contendo 1 mL de solução salina (NaCl 150 mM) agitado em um agitador do tipo vortex. Alíquotas de 100 µL das diluições 10^{-5} e 10^{-6} foram semeados em meio BDA e incubados a 28°C. As colônias purificadas foram estocadas como descrito acima, dois isolados foram utilizados no testes de antagonismo: FVCana -02 e FVCana-03.

Tabela 5.2 - Isolados fitopatogênicos de *Fusarium* spp. utilizados nesse estudo

Isolados	Espécie	Hospedeiro
T4 Ø	<i>Fusarium verticillioides</i>	Milho
R2 F238	<i>Fusarium oxysporum</i> raça 2	Ervilha
R5	<i>Fusarium oxysporum</i> raça 5	Ervilha
FV-01 CTC	<i>Fusarium verticillioides</i>	Cana-de-açúcar
FVCana – 02	<i>Fusarium verticillioides</i>	Cana-de-açúcar
FVCana - 03	<i>Fusarium verticillioides</i>	Cana-de-açúcar

Os meios utilizados nesse estudo foram: KB, BDA, nutriente glicose (NBG) e nutriente extrato de levedura glicerol (NYBGli), sendo os dois últimos meios preparados de acordo com Duffy e Défago (1999), além de PCG (TOYODA et al., 1988).

5.2.1.2 Mutantes de Pf-5 para produção de metabólitos secundários

A relação entre um determinado metabólito produzido pela linhagem Pf-5 e seu papel no antagonismo de *Fusarium* spp. foi avaliado por meio do desenvolvimento de alguns mutantes defectivos na produção dos antibióticos: pioluteorina (Plt-), pirrolnitrina (Prn-), rizoxina (Rzx-), 2,4-diacetil-flooroglucinol (Phl-) e cianeto de hidrogênio (Hcn-) e dos sideróforos: pioverdina (Pvd-) e pioquelina (Pch-). Uma vez que esses metabólitos secundários são sintetizados por grupos gênicos pela via policetídeos sintase (PKS) ou não ribossomal peptídeos sintetase (NRPS) (LOPER; GROSS, 2007), foram selecionados genes alvos, um para cada metabólito secundário, para o nocaute da expressão dos metabólitos estudados, sendo construídos simples, duplos, triplos e quádruplo mutantes, como descrito a seguir.

5.2.1.2.1 Construção dos mutantes

A construção dos mutantes foi realizada por meio de recombinação de produtos de PCR a partir da metodologia modificada descrita por Choi e Schweizer (2005). Todos os produtos de PCR foram sintetizados utilizando-se KOD Hot Start DNA polimerase. Na primeira reação de PCR, o fragmento 5' - 3' dos genes a serem mutados foi amplificado utilizando os *primers* listados na Tabela 5.3. A amplificação do gene de resistência a gentamicina a partir do plasmídeo pPS856 (HOANG et al., 1989) foi realizada utilizando os *primers* descritos por Choi e Schweizer (2005). Na segunda reação de PCR, 50ng de cada produto de PCR dos fragmentos *Upstream* (UP) e *Downstream* (Dn) dos genes de interesse e FRT-cassete-FRT foram usados por três ciclos de amplificação sem a adição de *primers*. Os *primers* UpF-Bam e DnR-Bam ou UpF-Hind e DnR-Hind de cada gene foram adicionados no meio do terceiro ciclo de extensão. A amplificação dos fragmentos foi completada adicionando-se mais 25 ciclos de PCR. O produto dessa reação foi então digerido com o indicado e clonado nos sítios de *Bam*HI ou *Hind*III no plasmídeo pEX18Tc (HOANG et al., 1989). Essa construção então foi transformada em *Escherichia coli* TOP10 e confirmada por sequenciamento.

As construções das deleções foram transformadas em *E. coli* S17-1 (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983) e introduzidas em Pf-5 por conjugação, sendo que os clones de interesse foram selecionados em meio KB com estreptomicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$),

resistência natural de Pf-5) e gentamicina ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$). As colônias foram crescidas por 3 horas em LB sem seleção por antibiótico e então plaqueadas em LB mais sucrose 5% e gentamicina para resolver o problema de merodiplóides. Colônias sucrose-resistentes foram estriadas em KB com tetraciclina ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e as colônias tetraciclina-sensíveis e gentamicina-resistentes foram consideradas os mutantes desejados.

Para remover o gene de resistência a gentamicina, o plasmídeo pFLP2Km (VIEIRA; MESSING, 1982) expressando *Flp* recombinase foi introduzido em Pf-5 por conjugação. Transconjugantes foram selecionados em KB com estreptomicina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e canamicina ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). As colônias foram estriadas em KB contendo gentamicina ($40 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para selecionar os clones que haviam perdido o gene de resistência a gentamicina. Colônias gentamicina-sensíveis foram estriadas em LB mais 5% sucrose para promover a perda do plasmídeo pFLP2Km. Colônias sucrose-resistentes foram estriadas em KB mais canamicina para confirmar a perda do plasmídeo. Os mutantes resultantes contendo a marca FRT no sítio de deleção foram confirmados por meio de PCR e por sequenciamento do produto resultante. Os mutantes que possuem mais de uma mutação foram obtidos adicionando-se uma mutação por vez.

5.2.1.3 Ensaio de antagonismo

Os dois principais mecanismos de controle de fitopatógenos por *Pseudomonas* spp. fluorescentes são antibiose e competição por nutrientes no ambiente. Assim, para avaliar esses dois mecanismos de controle de *Fusarium* spp. por Pf-5, foram realizados ensaios de antagonismo *in vitro*.

Para o ensaio de antagonismo por antibiose por pareamento *in vitro* foram utilizados diferentes meios de cultura PCG e BDA+Fe, uma vez que o meio BDA foi suplementado com cloreto férrico FeCl_3 (10^{-4} M). Em duas extremidades da placa de Petri, foram inoculados $10 \mu\text{L}$ de solução bacteriana (10^8 UFC.mL $^{-1}$), em um dos lados o isolado Pf-5 (tipo selvagem) e no outro lado o mutante a ser avaliado. No mesmo dia, no centro da placa foi inoculado o isolado de *Fusarium* spp. (discos de 2 cm de diâmetro).

Tabela 5.3 - *Primers* utilizados na construção de mutantes da linhagem Pf-5

Oligonucleotídeos	Sequência (5'→ 3')
Gm-F	GGTGGCTCAAGTATGGGCATCA
Gm-R	ATAGAGAGCCACTGCGGGATCG
FRT-F	CGAATTAGCTTCAAAAGCGCTCTGA
FRT-R	CGAATTGGGGATCTTGAAGTTCCT
plt UpF-Bam	GTGTGGTAGTGGATCCTCCAGGACTGTGCGAGCAAC
plt UpR-FRT	TCAGAGCGCTTTTGAAGCTAATTCGAGCTTGGCATTGACAATGAC
plt DnF-FRT	AGGAACTTCAAGATCCCCAATTCGAGCAGAACTACACCAACTCC
plt DnR-Bam	GCAGAAGAGAGGATCCTACTTGTGCCAGAGGTGTTC
rxz UpF-Bam	GAGAAGGAGAGGATCCGAGGACAATCCTGCCTCGA
rxz UpR-FRT	TCAGAGCGCTTTTGAAGCTAATTCGTCTGCTCGACGAACTGCAC
rxz DnF-FRT	AGGAACTTCAAGATCCCCAATTCGTACCACAGTGACCGTCATTG
rxz DnR-Bam	GTGAGTTGCTGGATCCATGTCAGCAGTTCAAGGTGC
hcn UpFnew-Hind	CACAAGGAGCAAGCTTCCACGTTATGAGCCTGAACC
hcn UpRnew-FRT	TCAGAGCGCTTTTGAAGCTAATTCGTCTGCTTGGCGATCTTGCC
hcn DnFnew-FRT	AGGAACTTCAAGATCCCCAATTCGCAGTTGAGCCAGCAGATGG
hcn DnRnew-Hind	GTAGGAGACCAAGCTTCTTAATCATGCTGGGAGACC

Após a inoculação, as culturas foram incubadas a 27°C por 5 ou 7 dias. O controle negativo de inibição do crescimento dos fitopatógenos foi o mutante JL4577, *gacA*⁻. O isolado Pf-5, tipo selvagem, foi utilizado como controle positivo para inibição dos fitopatógenos.

O ensaio de antagonismo por competição por ferro foi realizado em meio KB. A metodologia foi a mesma descrita acima, e, foi utilizado o mutante defectivo na produção do sideróforos pioverdina e pioquelina, JL4900 (*Pvd*⁻, *Pch*⁻), além mutante *gacA*⁻, produtor de sideróforos mas não de antibióticos.

No ensaio do controle por antibiose e de competição por ferro foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo os ensaios realizados duas vezes. O índice de inibição foi calculado de acordo com o modelo: o raio de crescimento das laterais do fungo que não estavam expostas a ação bacteriana foram consideradas 100%, a partir desse valor foi calculada a redução do crescimento fúngico nas laterais expostas a ação bacteriana (Figura 5.1).

Figura 5.1 - Inibição do crescimento de *Fusarium* spp. por Pf-5 e seus mutantes. A fórmula utilizada foi: $(x1/x2)*100$ para os mutantes avaliados

5.2.1.4 Efeito do AF no crescimento de Pf-5 e na produção de metabólitos secundários

5.2.1.4.1 Efeito no crescimento bacteriano

Os efeitos do AF no crescimento de Pf-5 foram avaliados em quatro diferentes meios de cultura: BDA + Fe, PCG, NBG, NYBGli + Zn, sulfato de zinco (0,35 mM). Um estoque de AF de *Gibberella fujii* (Sigma) foi previamente preparado dissolvendo-se 1 grama de AF em 5 mL de metanol ajustando a concentração para 10 mg/ml com água destilada esterilizada. O pH foi ajustado para 6,5 com duas gotas de NaOH 5N. Os tratamentos controle (AF=0 mM) receberam a mesma quantidade de solvente sem AF.

A linhagem Pf-5 foi crescida em tubos de vidro contendo 5 mL de meio, e AF nas concentrações de 0 e 0,5 mM. As culturas crescidas por doze horas foram então inoculadas em uma concentração inicial de 10^8 UFC.mL⁻¹ ($DO_{600nm} = 0,05$) e incubadas a 27°C por 48 horas em *shaker* sob rotação constante (200 rpm). Durante esse tempo foi mensurado o crescimento bacteriano por meio da leitura de densidade óptica (DO_{600nm}) em espectrofotômetro (Spectronic 20+ - Thermo spectronic). A linhagem Pf-5 foi crescida em todos meios com quatro replicatas para cada tratamento.

5.2.1.4.2 Efeito na produção de metabólitos secundários

5.2.1.4.2.1 Extração de metabólitos

Para determinar quais metabólitos secundários foram afetados pela presença do AF, após 48 horas, a cultura bacteriana, crescida nos meios: BDA+Fe, PCG e NYBGli +Zn, foi centrifugada (5 minutos, 5000 rpm) e do sobrenadante foi extraído os metabólitos secundários com igual volume de acetato de etila. A fase orgânica de ambos os extratos foi seca sob vácuo e armazenado a -20°C. Para todos os experimentos de extração foram utilizadas quatro repetições por tratamento.

5.2.1.4.2.2 HPLC

Para determinação e quantificação dos metabólitos secundários afetados pelo AF, as amostras foram removidas do freezer e adicionado 50 µL de 75% MeCN e então sonicadas por 1 hora. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 g por 1 minuto e o líquido transferido para coluna de HPLC: phenomenex, 250 X 4.6 mm 4 µm) (Synergi 4u Fusion-RP 80A SN: 451436-16). Primeiramente foram injetadas as amostras padrão com concentrações conhecidas, sendo então injetadas as amostras extraídas. O tempo de retenção dos metabólitos conhecidos teve uma mínima variação, não sendo necessária a corrida dos padrões antes de todas as amostras avaliadas. Os metabólitos foram quantificados pelas áreas dos picos previamente estabelecidas pela curva padrão. O extrato de cada amostra (5 µL) foi injetado com fluxo de 1,5 mL.minuto¹, usando se um gradiente binário dos solventes: A (0.1% de AcOH) e B (MeCN), de acordo com o tempo e concentração: inicialmente 20% - B, 45 minutos-100% B, 50 minutos - 100% B, 55 minutos - 90% B, 60 minutos - 90% B, 73 minutos - 20% B, 80 minutos - 20% B, sendo então finalizada a corrida.

5.2.1.4.2.3 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos na presença de AF foi avaliada em CAS-água preparado de acordo com Schwyn e Neilands (1987). Primeiramente 60,5 mg CAS foi dissolvido em 50 ml água destilada e misturada com 10 ml de solução de ferro (III) (1 mM FeCl₃.6H₂O, 10 mM HCl). Em agitação, essa solução foi lentamente adicionada

para 72,9 mg HDTMA dissolvidos em 40 ml de água. O líquido azul escuro resultante, solução corante, foi então autoclavado. Também foi autoclavado o meio de cultura contendo em 180 ml água: 3 g ágar, 4 g sucrose, 0,4 g asparagina, 0,2 g KH_2PO_4 e 100 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Então, 20 mL da solução corante previamente esterilizada foi adicionada ao meio de cultura suplementado com AF (0 e 0,5 mM) e 20 mL da mistura vertidos em placas de Petri. Após solidificação do meio, foram inoculados 10 μL da solução bacteriana ($\text{DO}_{600} = 0,05$), sendo utilizadas as linhagens: Pf-5 (tipo selvagem), JL4577 (GacA-), JL4806 (Pvd-), JL4898 (Pch-) e JL4900 (Pvd-,Pch-). As placas foram incubadas a 27°C por três dias. A produção de sideróforos foi observada mediante a formação de halo amarelo-alaranjado. A razão: diâmetro do halo/diâmetro da colônia bacteriana foi utilizado para estimar a produção de sideróforos pelas linhagens testadas. O ensaio foi realizado utilizando-se quatro repetições para cada linhagem, sendo o experimento realizado duas vezes independentemente.

5.2.1.5 Alteração na expressão genética de Pf-5 *in vitro* na presença de AF

5.2.1.5.1 Extração de RNA

A linhagem Pf-5 foi crescida em 20 mL de meio NBYGli+ Zn e AF (0 e 0,5 mM) sob as condições descritas acima. O RNA foi extraído das culturas bacterianas em três diferentes fases de crescimento: fase log inicial - FLI ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,5$), fase log final - FLF ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 3,0$) e fase estacionária - FE ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 7,5$) (Figura 5.2). Para extração foi utilizado o protocolo adaptado do Kit DNA/RNA Midi Kit (Qiagen) incluindo tratamento por RNase mini Kit (Qiagen). A integridade do RNA foi avaliada pelo Centro de Pesquisa de Genoma e Biocomputação (Center for Genome Research and Biocomputing - CGRB), OSU, EUA, sendo utilizado o programa Agilent Bioanalyzer 2100 system. O RNA foi então utilizado para geração de cDNA usando o superscript kit (Roche Applied Sciences) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA total (1-10 μg) foi transcrito reversamente em cDNA utilizando-se *primers* hexâmeros randômicos (Invitrogen) e 200 U SuperscriptII RNase H - transcriptase reversa (Invitrogen) de acordo com metodologia recomendada pelo fabricante. Para cada amostra de RNA, a não adição de transcriptase reversa, foi usada como controle

negativo nos subsequentes RT-qPCRs.

Figura 5.2 - Influência do AF no crescimento de Pf-5. A linhagem Pf-5 foi cultivado em 20 mL de NYBGli+ Zn e AF 0 e 0,5 mM por 24 horas a 27°C, 200 rpm. Durante o crescimento, a DO_{600nm} foi mensurada em diferentes tempos, sendo coletadas amostras para extração de RNA em diferentes fases de crescimento bacteriano: FLI (fase log inicial), FLF (fase log final) e FE (fase estacionária), indicadas pelas setas

5.2.1.5.2 RT-qPCR

As sondas para os genes avaliados foram desenhadas com o programa *LightCycler probe design*. Todos os *primers* foram testados previamente, e, nas corridas finais da qPCR foram utilizados somente *primers* com eficiência superior a 1,6 (Tabela 5.4). A eficiência dos *primers* foi avaliada pelo programa LinRegPCR (RAMAKERS et al., 2003). Para a reação de RT- qPCR foi usado o *Kit light cycler fast star DNA master Sybr Green I* (Roche Applied Sciences).

A reação contendo os *primers* adiante e reverso (10 µM) e LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (4 µl.reação⁻¹; Roche Diagnostics) foi preparada. Alíquotas de 18 µl foram dispensadas nos capilares de vidro (LightCycler) e então 2 µg de cDNA (250 ng.µl⁻¹) foram adicionados. O ciclo da reação de qPCR começou com 95°C por 10 minutos para desnaturação do cDNA, seguido de 40 ciclos de amplificação de 15 segundos a 95°C para dissociação do cDNA e 15 segundos a 60°C de anelamento e extensão. A reação de qPCR foi realizada em termociclador *Lightcycler 2 System*

(Roche Applied Science). O gene da glicose-fosfato desidrogenase – *zwf* foi utilizado como gene de referência (gene ref), sendo o método de Pfaffl (PFAFFL, 2001) usado para determinar a expressão gênica relativa dos genes alvos em relação ao gene de referência na ausência (controle) e presença de AF (tratamento) de acordo com a fórmula:

$$\text{Expressão Gênica Relativa} = \frac{(E_{\text{gene alvo}})^{\Delta C_p \text{ gene alvo (controle-tratamento)}}}{(E_{\text{gene ref}})^{\Delta C_p \text{ gene ref (controle-tratamento)}}$$

Sendo, E a eficiência do RT-qPCR para o gene alvo e o gene de referência, e o ΔC_p , a diferença entre as fluorescências de fundo (C_p) dos tratamentos sem e com AF.

Tabela 5.4 - *Primers* utilizados nas reações de RT-qPCR

Primer	Número de acesso*	cDNA alvo	Sequência (5'→ 3')
zwfq F	PFL_4610	<i>zwf</i>	ATCTGGCGCTGCGTAAGCTG
zwfq R			TGTCGCTCTGGGTGTTGGAG
phlDqI F	PFL_5957	<i>phl D</i>	ATCGTGTCCCTGGAAT
phlDqI R			TGTAGTGCTCGCTCTT
pltA2-qF	PFL_2787	<i>plt A</i>	GACCTCGGCAGATTCC
pltA2-qR			GGGTCTTTTCTCCGA
prnCq F	PFL_3606	<i>prn C</i>	GACTTCCGCCTATGGG
prnCq R			ATGAGGGCGTGAATCC
hcnAq F	PFL_2577	<i>hcn A</i>	CAACTTCGATATTCAGCCG
hcnAq R			GTGGGCTCCGTTTCAG
rxzBq F	PFL_2989	<i>rxz B</i>	CGTTTCGACTCCCAAG
rxzBq R			CGTTTCGACTCCCAAG
pvdAq F	PFL_4079	<i>pvd A</i>	CCCACGTTCACGATTTG
pvdAq R			GCTTGAGGTAGTTGACGA
pchC2 qF	PFL_3490	<i>pchC</i>	CCACAACGGTTGATCG
pchC2 qR			AGGCATAGGCTTCGTC

* O acesso dos genes da linhagem Pf-5, PFL_, foram obtidos no site www.pseudomonas.com

5.2.1.6 Influência do AF na antibiose de *F. verticillioides* pela Pf-5

O teste de paridade descrito no item 5.2.1.3 foi conduzido novamente para confirmar a influência do AF no antagonismo de *F. verticillioides* (T4 Ø e FV -01 CTC). O meio BDA+Fe e PCG foram suplementados com AF (0 e 0,5 mM). Foram também

confrontadas as corridas de HPLC usando os dois meios: BDA+Fe e PCG para observar se realmente nesses meios o AF afetava a produção de pioluteorina, rizoxina, pirrolnitrina, PHL e monoacetil-floroglucinol pela linhagem Pf-5.

5.2.1.7 Análise estatística

A análise estatística de todos os dados foi realizada com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, considerando os delineamentos experimentais como inteiramente casualizados. As barras apresentadas nos gráficos são os valores dos desvios padrão de cada tratamento. Valores com asteriscos (* ou **) diferem estatisticamente ($\alpha = 0,05$ ou $0,001$ respectivamente) de acordo com o teste *t* de Student.

5.2.2 Resultados

5.2.2.1 Inibição de *Fusarium* spp. por Pf-5 e mutantes

Os mutantes simples continuaram inibindo os isolados fitopatogênicos de *Fusarium* spp. (T4 Ø, F238 e R5), somente a inibição de crescimento dos fitopatógenos testados contra o mutante simples JL4804 (Phl-) foi menor que o observado pelo tipo selvagem, demonstrando que a ausência de PHL diminuiu o controle de *Fusarium* spp. em meio BDA+Fe (Figura 5.3A). Resultado semelhante foi observado quando utilizado o meio PCG (Figura 5.3B). Assim, visto o baixo potencial de análise dos mutantes simples, os demais ensaios com os vários isolados patogênicos de cana-de-açúcar foram realizados somente utilizando mutantes duplos, triplos e quádruplos (Figura 5.4).

Além do PHL, a importância da rizoxina na antibiose dos seis isolados fitopatogênicos foi confirmada pela adição da mutação no gene *rxzB* nos mutantes simples JL4804 e JL4805 (Plt-), gerando respectivamente os mutantes: JL4901 (Phl-, Rzx-) e JL4913 (Plt-,Rzx-), que, apresentaram uma alta redução no potencial de biocontrole dos fitopatógenos nos dois meios e contra todos os fitopatógenos testado.

Figura 5.3 – Antibiose *in vitro* de isolados fitopatogênicos de *Fusarium* spp. por mutantes defectivos na produção de antibióticos, linhagem Pf-5. O crescimento fúngico foi mensurado após cinco dias de incubação a 27°C em BDA + Fe (A) e PCG (B). As barras apresentadas são a média $\pm$ desvio padrão de quatro repetições. Isolados T4 Ø (C) e F238 (D) inibidos por mutantes de Pf-5

Destaca-se que em meio BDA+Fe, contra cinco dos fitopatógenos testados, exceto R5, o duplo mutante JL4901, apresentou desempenho similar ao mutante JL4577 (*GacA*-), que não produz nenhum dos metabólito testados. A baixa toxicidade de pirrolnitrina e cianeto de hidrogênio foram demonstrados pela não redução da inibição dos seis *Fusarium* spp. pelo mutante JL4934 (*Prn*-, *Hcn*-) em BDA+Fe e PCG.

Quando realizado o ensaio de antagonismo no meio PCG, novamente o mutante JL4809 (*Hcn*-) mostrou-se similar ao tipo selvagem. Nesse meio o comportamento do R5 foi atípico, uma vez que esse isolado foi menos inibido pelo mutante JL4844 do que JL4901 (Figura 5.3B). Os fitopatógenos T4 Ø e F238 foram menos inibidos pelas linhagens JL 4577 (*GacA*-), JL4844 (*Phl*-, *Rzx*-, *Prn*-) e JL4901(*Phl*-, *Rzx*-) no meio PCG do que em BDA+Fe, entretanto, independente do meio os mutantes JL4901 e JL4844 tiveram inibição semelhante ao JL4577 (Figura 5.3). Resultado semelhante foi observado quando testados os fitopatógenos de cana-de-açúcar, ou seja, a perda do potencial de inibição dos fitopatógenos devido a mutação dos genes *phlD* e *rxzB*, nos mutante JL4901 e JL4844 (Figura 5.4), confirmando o papel principal de PHL e rizoxina, no controle de *Fusarium* spp..

O mutante quártuplo, JL4865 (*Phl*-, *Prn*-, *Hcn*-, *Plt*-, *Rzx*-), nos dois meios testados (Figura 5.3A e Figura 5.4B), utilizando os diferentes isolados fitopatogênicos, comportou se como o mutante *gacA*-, confirmando que os metabólitos secundários: PHL, rizoxina, pirrolnitrina, cianeto de hidrogênio e pioluteorina produzidos pela Pf-5 são os principais compostos envolvidos na inibição fúngica. Esses compostos atuam sinergicamente contra os patógenos de *Fusarium* spp. testados no presente trabalho.

Os isolados fitopatogênicos foram similares, mas não idênticos quanto a sensibilidade aos metabólitos produzidos pela linhagem Pf-5, por exemplo R5 apresentou maior sensibilidade a pirrolnitrina, T4 Ø e FVC-02 apresentaram maior sensibilidade para rizoxina, e, o isolado FVCana-03 apresentou maior sensibilidade a pioluterina em meio BDA+Fe mas não PCG.

Figura 5.4 – Antibiose *in vitro* de isolados patogênicos de cana-de-açúcar, *F. verticillioides*, por mutantes defectivos na produção de antibióticos, linhagem Pf-5. O crescimento fúngico foi mensurado após cinco dias de incubação a 27°C em BDA + Fe (A) e PCG (B). As barras apresentadas são a média $\pm$ desvio padrão de quatro repetições

O ensaio de competição por ferro demonstrou que os isolados T4 Ø, e F238 são mais susceptíveis ao controle por competição por ferro, uma vez que, na presença do mutante JL4900 (Pvd-, Pch-), a inibição do crescimento desses isolados foi reduzida (Figura 5.5). O isolado R5 e todos os isolados patogênicos de cana-de-açúcar não se mostraram sensíveis a produção de sideróforos pela linhagem Pf-5, sugerindo que a produção de sideróforos é secundária no controle dos mesmos, uma vez que, no ensaio de controle por competição por ferro, a mutação de genes de sideróforos não reduziu substancialmente a inibição dos *Fusarium* spp.

Figura 5.5 – Controle por competição por ferro, *in vitro*, de isolados fitopatogênicos de *Fusarium* spp. por mutante defeitivo na produção de sideróforos, linhagem Pf-5. O crescimento fúngico foi mensurado após cinco dias de incubação a 27°C em KB. As barras apresentadas são a média $\pm$ desvio padrão de quatro repetições

Em relação aos demais mutantes, bem como no ensaio de competição por ferro, os resultados obtidos apresentaram-se dependentes do meio e/ou do fitopatógeno testado, demonstrando a diferencial sensibilidade dos fitopatógenos aos metabólitos avaliados. Também fica clara a complexidade dos fatores envolvidos na produção de metabólitos secundários em determinado meio, uma vez que, os mesmos são

expressos por grupos gênicos, com complexo sistema de regulação genética e modulado por fatores bióticos e abióticos. Portanto, a alteração do ambiente pode modular a produção dos metabólitos secundários de interesse, alterando também o potencial de biocontrole do isolado Pf-5.

Outro fator importante na interação entre um patógeno – bactéria antagonista é que o meio pode também influenciar a produção de metabólitos dos patógenos que influenciam a expressão dos metabólitos produzidos pela bactéria antagonista. Assim, a influência do AF na expressão dos principais metabólitos secundários produzidos pelo Pf-5 relacionados ao controle de *Fusarium* spp. foi avaliada por HPLC, CAS-ágar e RT-qPCR.

5.2.2.2 Efeito do AF no crescimento de Pf-5 e na produção de metabólitos secundários

Foram testados previamente quatro diferentes meios para avaliar o efeito do AF no crescimento bacteriano e no pH do meio para selecionar o melhor meio nos ensaios posteriores de HPLC e RT-qPCR. Em relação ao crescimento bacteriano, foi observado que o AF, em meio NBG, teve um forte efeito somente na FLF. Nos demais meios, o AF não afetou o crescimento de Pf-5 em nenhuma das fases avaliadas (Figura 5.6).

O pH do meio, um importante fator na biossíntese de antibióticos (DUFFY; DÉFAGO, 1997; SLININGER; SHEA-WILBUR 1995), foi também afetado pelo AF no meio NBG. Em NBG (pH = 6,5), houve a acidificação do meio de cultura tratado com AF (pH = 4,3).

Finalmente, os meios selecionados para avaliação dos efeitos do AF sobre a produção metabólitos secundários de Pf-5 foram o NYBGli +Zn, BDA+ Fe e PCG, pois, nesses meios, o crescimento da linhagem Pf-5, e, o pH do meio não foram alterados pela presença de AF.

O AF teve efeito na maioria dos metabólitos secundários avaliados por HPLC. Uma drástica redução foi observada, mais de 100 vezes, na produção de PHL e monoacetil-fluoroglucinol quando adicionado AF ao meio. A produção de pirrolnitrina, pioluteorina e rizoxina foi aumentada pela presença de AF (Tabela 5.5).

Figura 5.6 - Influência do AF no crescimento de Pf-5. O isolado foi cultivado em 5 mL dos meios: **(A)** NBG, **(B)** PCG, **(C)** BDA + Fe e **(D)** NYBGli + Zn e AF 0 e 0,5 mM por 48 horas a 27°C, 200 rpm. Durante o crescimento a DO_{600nm} foi mensurada em diferentes tempos. Barras de erro representando o desvio padrão das quatro repetições podem estar obscurecidas pelos símbolos

Tabela 5.5 - Efeitos do AF na produção de antibióticos pela linhagem Pf-5

Metabólitos secundários	Tratamentos ^a	
	AF (0 mM)	AF (0,5 mM)
pirrolnitrina	0,36 ± 0,07	0,14±0,06 **
rizoxina	0,6 ± 0,3	3,0 ±0,7**
pioluteorina	2,5 ±0,4	4,7 ± 0,9 **
2,4-diacetil-floroglucinol	39,0 ± 7,0	0,2 ± 0,2 **
monoacetil-floroglucinol	26,4 ± 7,6	0,3 ± 0,2 **

^a A linhagem Pf-5 foi cultivada em NYBGli + Zn suplementado com AF (0 e 0,5 mM). A produção dos antibióticos foi avaliada após 48 horas incubação 27°C a 200 rpm. Os valores em µg de cada metabólito, obtidos por HPLC, representam a media de quatro repetições (± desvio). Valores com asteriscos (**) na mesma linha diferem estatisticamente ($\alpha = 0,01$) do tratamento controle (não AF) de acordo com o teste *t* de Student

A linhagem Pf-5 e o mutante JL4898 (Pch-) tiveram um aumento na produção de sideróforos em meio CAS-ágar suplementado com AF, sendo que o mesmo não afetou a produção de sideróforos pelos mutantes JL4806 (Pvd-) e JL4900 (Pvd-,Pch-) (Tabela 5.6). Esses resultados indicam que provavelmente o AF presente no CAS-ágar teve efeito aumentando a produção de pioverdina e não do pioquelina produzidos pela Pf-5.

Tabela 5.6 – Efeitos de AF na produção de sideróforos pela linhagem Pf-5

Fenótipo	Tratamento ^a	
	AF (0 mM)	AF (0,5 mM)
Pf-5	2,4 ±0,2	2,8 ±0,06**
Pvd-	2,4 ±0,1	2,4 ±0,10
Pch-	2,0 ±0,1	2,5 ±0,06*
Pvd-, Pch-	1,9 ±0,1	2,1 ±0,13

^a 10µL da cultura bacteriana (DO₆₀₀ = 0,05) foi incubada em CAS-ágar a 27°C por três dias. O halo foi caracterizado pela coloração amarelo-alaranjado. A razão entre o diâmetro do halo pelo diâmetro da colônia bacteriana foi utilizada para estimar a produção de sideróforos. Os valores representam a media de quatro repetições (± desvio). Valores com asteriscos (* ou **) na mesma linha diferem estatisticamente (α = 0,05 e 0,01 respectivamente) do tratamento controle (não AF) de acordo com o teste *t* de Student

5.2.2.3 Influência do AF na expressão gênica de antibióticos e sideróforos pela Pf-5

Previamente o efeito do AF foi avaliado quanto a repressão de *phlD* na FLI, FLF e FE, sendo que, como esperado, o AF não teve efeito na expressão de *phlD* na FLI (dado não apresentado). Esse gene foi significativamente reprimido pela presença de AF na FLF e FE, assim, somente o cDNA obtido em ambas fases foram utilizados com os outros *primers* para na análise expressão gênica por RT-qPCR.

Na fase FLF e na FE a expressão de *hcnA* não foi afetado pela presença de AF. A transcrição de *pltA*, *rxzB* e *pvdA* foi aumentada pela presença de AF na FLF. Interessantemente, o aumento da expressão de *prnC* foi observada somente na FE (Figura 5.7). Os dados obtidos por RT-qPCR corroboraram fortemente os resultados obtidos pelo HPLC e CAS-ágar, provando que o AF tem efeito na produção de metabólitos secundários produzidos pela Pf-5 e relatados com a inibição de *Fusarium*. Somente a expressão de *pchC* e *hcnA* não foi influenciada pela presença de AF. Entretanto os efeitos do AF na expressão gênica de Pf-5 foi transiente e somente observada durante a FLF, exceto *phlD* e *prnC* que continuou sendo reprimido e super

expresso respectivamente pela presença de AF durante a FE.

Figura 5.7 - Efeito do AF na expressão de metabólitos secundários da linhagem Pf-5 avaliado por RT-qPCR. O RNA foi extraído em duas diferentes fases de crescimento de culturas de Pf-5, **(A)** fase log final e **(B)** fase estacionária. A linhagem Pf-5 foi crescida em meio NYBGli + Zn adicionado AF (0 e 0,5 mM). O efeito da adição de AF na expressão gênica relativa foi mensurado de acordo com o método de Pfaffl (PFAFFL, 2001). As barras apresentadas são a média $\pm$ desvio padrão de quatro repetições

Todos os metabólitos secundários produzidos por Pf-5 e relatados com o controle de *Fusarium* spp., foram afetados pela presença de AF em nível transcricional, dentre esses destacando-se o papel de PHL, pirrolnitrina, pioluteorina e rizoxina que apresentaram importância no controle dos fitopatógenos.

5.2.2.4 Influência de AF na antibiose de *F. verticillioides* por Pf-5

Dois diferentes meios foram testados, BDA+ Fe e PCG, para confirmar o efeito de AF na produção de antibiótico e consequentemente na antibiose de *F. verticillioides* T4 Ø e FV 01- CTC. Em BDA+Fe por HPLC foi observado uma alta repressão de PHL e de seu precursor monoacetil-floroglucinol pela presença de AF. Entretanto, AF aumentou a produção de pirrolnitrina. Ambos os resultados conferem os resultados obtidos por RT-qPCR (Figura 5.8C). Curiosamente, a produção de pirrolnitrina foi inibida em PCG (Figura 5.8 2C).

Os dados de HPLC estão diretamente correlacionados com os dados obtidos nos ensaios de antagonismo *in vitro*. O AF afetou negativamente a quantidade de PHL e seu precursor em PCG e BDA + Fe, respectivamente. O AF também diminuiu a inibição dos isolados fitopatogênicos T4 Ø e FV 01- CTC pela Pf-5 e seus mutantes JL4805 (Rzx-) e JL4913 (Plt-, Rzx-) todos produtores de PHL (Figura 5.8A,B).

Infelizmente a presença de rizoxina e pioluteorina não foi detectada em ambos meios de cultura, sendo impossível concluir se o aumento dos transcritos responsáveis pela biossíntese desses compostos observados por RT-qPCR devido a presença de AF está relacionado com o aumento de biocontrole dos isolados fitopatogênicos *Fusarium* spp. pela Pf-5.

5.3 Discussão

A construção de mutantes com o objetivo de avaliar o papel de determinado metabólito no controle de fitopatógenos é uma estratégia bem estabelecida para o grupo de *Pseudomonas* spp fluorescentes, visto a grande importância das mesmas na agricultura como antagonistas de fitopatógenos (COOK et al., 1995; KEEL; DÉFAGO, 1997; WHIPPS, 2001).

1A

inibição FV-01 CTC (%)

fenótipo

0 mM
500 mM

fenótipo	0 mM (%)	500 mM (%)
tipo selvagem	~42	~33
GalK ⁺	~6	~4
Pfl ⁻	~42	~28
Rzx ⁺	~40	~35
Pfl ⁻ , Rzx ⁻	~37	~32
Pfl ⁻ , Rzx ⁺	~40	~31

1B

inibição T4 φ (%)

fenótipo

0 mM
0.5 mM

fenótipo	0 mM (%)	0.5 mM (%)
tipo selvagem	~40	~32
GalK ⁺	~4	~7
Pfl ⁻	~10	~13
Rzx ⁺	~28	~22
Pfl ⁻ , Rzx ⁻	~10	~14
Pfl ⁻ , Rzx ⁺	~34	~21

transconjugantes que perderam *in vitro* a capacidade de inibição do crescimento de *F. moniliforme*.

Atualmente, com o completo sequenciamento do genoma de várias espécies de *Pseudomonas*, incluindo habitantes de rizosfera (LOPER; GROSS, 2007), surgem novas oportunidades de conhecer um pouco mais dos mecanismos de controle biológico das mesmas, bem como a possibilidade da geração de mutações em reguladores e genes relacionados ao controle de fitopatógenos (BAEHLER et al., 2005; DUFFY; KEEL; DÉFAGO, 2004; WEERT et al., 2003).

Dentre as *Pseudomonas* recentemente sequenciadas, a linhagem *P. fluorescens* Pf-5, foi a primeira bactéria comensal de rizosfera relacionada ao controle de fitopatógenos com o genoma completamente sequenciado (PAULSEN et al., 2005). Assim, a fim de se avaliar os mecanismos de ação no controle de *Fusarium* spp., foram construídos mutantes da linhagem Pf-5 defectivos para produção de cinco importantes antibióticos provenientes da via de metabolismo secundário relacionados ao controle de vários fungos fitopatogênicos: PHL, pioluteorina, pirrolnitrina, cianeto de hidrogênio e rizoxina (LOPER; GROSS, 2007; LOPER et al., 2008). Também foi utilizado nesse estudo, o mutante para o regulador da transcrição global *gacA* (CORBELL, 1999), e mutantes para produção de sideróforos: pioverdina e pioquelina (KIDARSA; HARTNEY, não publicado). A metodologia para geração de mutantes utilizada nesse estudo apresentou-se bastante eficiente como descrito por Choi e Schweizer (2005): rápida obtenção dos mutantes de interesse, ausência de marca de resistência nos mutantes além do baixo custo. Toda nova mutação foi adicionada em etapas individuais, sendo mais difícil a obtenção de mutantes triplos e quádruplo, pois, durante a construção, vários mutantes com recombinações erradas foram obtidos e descartados, todas as mutações foram confirmadas por PCR.

Após a geração dos mutantes, foram realizados ensaios de antagonismo *in vitro* contra diferentes espécies e raças de *Fusarium* spp. patógenos de milho, ervilha e cana-de-açúcar. O potencial de inibição dos mutantes avaliados variou de acordo com o meio utilizado e também com o fitopatógeno testado. Com exceção do mutante JL4809, defectivo para produção de cianeto de hidrogênio, todos os mutantes, inclusive os mutantes simples: JL4793 (Prn-), JL4804 (Phl-), JL4805 (Pit-) e JL4808 (Rzx-),

apresentaram o potencial de inibição reduzido em pelo menos um dos meios utilizados e contra no mínimo um isolado fitopatogênico quando comparado com o tipo selvagem, demonstrado assim que, esses metabólitos são realmente importantes no controle de *Fusarium* spp. por Pf-5. Entretanto os dados eram pouco evidentes, sendo utilizados os mutantes duplos, triplos e quintiplos contra os patógenos de cana-de-açúcar.

Dentre os metabólitos avaliados nesse estudo, os antibióticos fenólicos PHL, pirrolnitrina e pioluteorina produzidos por *P. fluorescens*, linhagens CHA0 e Pf-5, são os mais estudados devido ao seu grande espectro de ação contra vários fitopatógenos (BAEHLER et al., 2005; HAAS; KEEL, 2003; LOPER et al., 1997; RAAIJMAKERS; VLAMI; DE SOUZA, 2002; VOISARD et al., 1994). Maurhofer et al. (1995), aumentando a produção de PHL e pioluteorina pelo isolado de *P. fluorescens* CHA0 transformado com o plasmídio pME3090, obtiveram aumento de cinco vezes na inibição de *F. oxysporum* f. sp. *cucumerium* quando comparado com o tipo selvagem CHA0.

A pioluteorina produzida por Pf-5 apresenta além de toxidade contra *Fusarium* spp. descrito nesse estudo, também toxidade contra o oomiceto *Pythium ultimum* e contra outros patógenos de solo (HOWELL; STIPANOVIC, 1980; MAURHOFER et al., 1995). Fato semelhante repete-se com PHL, que em estudos anteriores apresentou-se tóxico não só contra fungos fitopatogênicos, mas também apresentou propriedades antibacteriana e antinematelmintica (CRONIN et al., 1997; KEEL et al., 1992).

Em relação ao espectro de ação da pirrolnitrina, não só *Fusarium* spp, mas diversos fungos pertencentes a classe de Basidiomicetos, Deuteromicetos e Ascomicetos são sensíveis a esse antibiótico (LIGON et al., 2000), sendo que em Pf-5, o grupo gênico responsável pela codificação desse metabólito é bem conservado e similar ao isolados de *P. fluorescens* CHA0 (BAEHLER et al., 2005) e BL915 (HAMMER et al., 1999). Entretanto, esse foi o primeiro trabalho que descreve a diferencial sensibilidade de fungos da mesma espécie, *Fusarium oxysporum*, e patógenos da mesma cultura, com grande variação de sensibilidade ao metabólito.

A Pf-5 é uma das poucas linhagens estudadas de *P. fluorescens* que produz rizoxina, sendo esse metabólito comumente isolado a partir de *Burkholderia rhizoxinica* sp. nov. (PARTIDA-MARTINEZ et al., 2007), um endossimbionte de *Rhizopus microsporus* (PARTIDA-MARTINEZ; HERTWECK, 2005). Em estudo recente, Loper et

al. (2008) observaram que os análogos de rizoxina produzidos por Pf-5 foram tóxicos e capazes de inibir a germinação das hifas dos fitopatógenos *Phytophthora ramorum* e *Botrytis cinerea*, sendo esse o primeiro relato da grande importância de rizoxina no controle de *Fusarium* spp.

A mutação para produção de cianeto de hidrogênio não afetou a inibição do crescimento de nenhum fitopatógeno em nenhum dos meios testados, demonstrando que a produção desse metabólito não é importante no controle de *Fusarium* spp por Pf-5, o mesmo também não foi afetado pela presença de AF. Entretanto, o HCN é um importante inibidor de citocromo C oxidase e de outras metaloenzimas (BLUMER; HAAS, 2000). Quando produzido por *Pseudomonas* spp, apresentou forte controle das doenças: raiz negra em tabaco (VOISARD et al., 1989), raiz podre em tomate e tombamento por *Pythium* em pepino (RAMETTE et al., 2003). A produção de HCN em *Pseudomonas* spp. requer a presença de três genes (*hcnABC*). Em Pf-5, esses genes estão presentes e possui alto grau de similaridade (90 a 100%) com os genes encontrados em CHA0 (LAVILLE et al., 1998), não suportando assim a hipótese de não produção do mesmo, sendo portanto necessário mais estudos a fim de investigar o papel desse metabólito produzido por Pf-5 no controle de fitopatógenos ou na otimização de produção do mesmo.

O mutante quártuplo (*Phl*⁻, *Prn*⁻, *Hcn*⁻, *Plt*⁻, *Rzx*⁻), bem como o mutante JL4577 (*GacA*⁻) foram ótimos controle negativos. O gene *gacA*, em *Pseudomonas* spp fluorescentes codifica um regulador transcricional, que controla a expressão de grande parte do metabolismo secundário dessas bactérias. Como descrito por Duffy e Défago (2000), mutações nesse gene bloqueiam a síntese de vários antimicrobianos como cianeto de hidrogênio, pioluteorina, pirrolnitrina e PHL na bactéria modelo no biocontrole *P. fluorescens* CHA0, sendo também bloqueada a biossíntese de rizoxina em Pf-5 (Loper, J.E., comunicação pessoal). Entretanto, em ambas as linhagens, CHA0 e Pf-5, mutações em *gacA* não afetam a produção dos sideróforos: pioverdina e pioquelina. Esses sideróforos não apresentaram grande importância no controle de *Fusarium* spp. Esse fato já tinha sido observado por Thomashow e Weller (1996) que afirmam que a produção de antibiótico e não de sideróforos é um dos mais importantes mecanismos de controle de fitopatógenos por *Pseudomonas* spp.

Como observado, as vias biossintéticas e alguns dos mecanismos e espectro de ação dos metabólitos secundários mutados em Pf-5 já são bem conhecidos (LOPER; GROSS, 2007; LOPER et al., 2008; PAULSEN et al., 2005), entretanto esse é o primeiro estudo em que todos esses compostos são testados concomitantemente contra *Fusarium* spp., sendo também estudada a modulação da expressão dos genes codificadores desses compostos mediante a presença de AF.

A escolha de dois meios para realização dos ensaios de antagonismo se justifica, uma vez que, tanto a fonte de carbono quanto os minerais presentes no ambiente influenciam a produção de metabólitos secundários por *Pseudomonas* spp fluorescentes. Utilizando cultivo *in vitro*, Duffy e Défago (1999) estudaram a produção de metabólitos secundários por vários isolados de *P. fluorescens* e observaram que a presença de glicose aumenta a produção de PHL e não reprime a expressão de pioluteorina que foi estimulada pela presença de glicerol. Assim, fica claro que o meio modula a produção de metabólitos secundários por Pf-5 e consequentemente seu potencial de controle de fitopatógenos, acarretando como consequências resultados inconsistentes entre ensaios *in vitro* e resultados no campo, como acontece com a maioria dos isolados de *Pseudomonas* spp, utilizadas no controle de fitopatógenos (COOK, 1993; THOMASHOW; WELLER, 1996). Também fica clara a importância de estudos como esse, primeiramente por elucidar parte do complexo conjunto de fatores bióticos e abióticos que modulam a expressão de metabólitos secundários, além do fato de que a utilização de meios adequados quando realizados ensaios de antagonismo *in vitro* podem acarretar resultados mais coerentes quando os agentes de biocontrole forem levados para ensaio em campo.

A utilização dos mutantes duplos e triplos foi de suma importância para mensurar a importância de cada metabólito secundário no controle de *Fusarium* spp., facilitando assim a seleção dos genes ou dos metabólitos com potencial no controle desses importantes fitopatógenos. Além disso, os mutantes desenvolvidos poderão futuramente ser testados contra outros fitopatógenos visando o estudo e a aplicação de Pf-5 como agente de biocontrole de diversas doenças de várias cultura. Outra interessante alternativa é a clonagem e expressão heteróloga e constitutiva desses genes em organismos de interesse, aumentando assim, o espectro de aplicação e benefícios para

agricultura.

A variação na inibição dos fitopatógenos pelos mutantes de Pf-5 não se justifica apenas pela alteração da composição química e física do meio, sendo levantadas mais duas outras hipóteses que corroboram com os resultados obtidos. Primeiramente, os isolados de *Fusarium* spp. podem apresentar diferentes graus de sensibilidade aos metabólitos secundários produzidos por Pf-5, sendo os principais mecanismos de resistência: a degradação enzimática, o sistema de influxo e a alteração do sítio alvo de ação (SCHOUTEN et al., 2004). No presente estudo foi observado que a sensibilidade dos fitopatógenos à determinado metabólito secundário não foi estritamente espécie específica, entretanto em determinados casos, isolados da mesma espécie de *Fusarium* apresentaram sensibilidade diferente a determinado metabólito.

Entre os principais mecanismos de resistência, a degradação enzimática e o sistema de influxo são os mais aceitáveis no caso de resistência de *Fusarium* spp., Handelsman e Stabb (1996) sugeriram que a maioria dos agentes de controle de *Fusarium* spp., como no caso de Pf-5, possuem mais de um mecanismo e que a resistência a múltiplos fatores de inibição ocorreria em uma frequência extremamente baixa, além disso os microrganismos antagonistas agem em locais específicos na planta onde apenas uma fração da população de patógenos está exposta durante uma determinada etapa de seu ciclo de vida, sendo assim, a pressão de seleção seria muito pequena (SEVÉNO et al., 2002). Aliado a esses fatos, Schouten et al. (2004) ao estudarem as respostas de defesa de *F. oxysporum*, 76 isolados fitopatogênicos e 41 isolados saprofíticos, contra PHL produzido por *Pseudomonas* spp., observaram que a sensibilidade dos isolados à PHL foi totalmente isolado dependente, não existindo correlação entre origem geográfica, *forma speciales* ou grupo genético. Entretanto, a produção de AF pelo grupo de *F. oxysporum* tolerantes a PHL foi significativamente maior.

Assim, surge uma nova perspectiva a ser avaliada: na interação patógeno - bactéria antagonista existe uma complexa interação molecular na qual os patógenos podem tolerar ou combater os metabólitos tóxicos por meio da produção de metabólitos capazes de modular a expressão gênica da *Pseudomonas* antagonista diminuindo assim a capacidade de controle da mesma. Grande parte dos isolados de *Fusarium*

spp. produzem AF, sendo essa micotoxina repressora da produção de PHL por *Pseudomonas* spp (NOTZ et al., 2002; SCHNIDER-KEEL et al., 2000). Assim, a expressão diferenciada do AF pelos fitopatógenos utilizados nesse estudo poderia em parte justificar a variação na inibição dos mesmos, dado esse que poderá ser avaliado em ensaios futuros.

Duffy, Keel e Défago (2004) ao estudarem o efeito de AF na produção de PHL e consequentemente no potencial de biocontrole das linhagens de *P. fluorescens* CHA0 e Q2-87 observaram que para a linhagem Q2-87 o principal mecanismo de biocontrole de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* é antibiose por meio da produção de PHL. A linhagem CHA0 apresenta alta produção de cianeto de hidrogênio que impede o crescimento do patógeno. Assim, por possuir outro mecanismo de biocontrole, o AF apresentou alta repressão na produção de PHL por CHA0 o que, entretanto, não diminui o potencial de inibição de controle do mesmo. Já o isolado Q2-87, por possuir a produção de PHL como principal mecanismo de controle do patógeno, o AF não afetou a produção de PHL. Os autores também sugerem que a sensibilidade de *Pseudomonas* para AF explica a variação na eficiência de biocontrole das mesmas no controle *Fusarium* spp.

Duffy e Défago (1997) já haviam descrito a repressão de PHL e pioquelina pela linhagem CHA0 quando adicionado ao meio AF (0,12 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$). Entretanto, esses dados estão parcialmente em discordância com os resultados obtidos pelo presente estudo, sendo observado que a produção de sideróforos pela Pf-5 foi diferencialmente afetada pelo AF, a produção de pioverdina estimulada, e, a de pioquelina não modificada pelo AF. Landa et al. (2002) relataram a superexpressão de genes relacionados a produção de pioverdina por bactérias *Pseudomonas* spp. tolerantes a AF. Dados contraditórios obtidos por diversos autores provavelmente refletem a especificidade do AF de acordo com a linhagem avaliada, provando a importância de estudos linhagem - específica.

Os efeitos de AF também foram mensurados em nível transcricional por RT-qPCR. Confirmando os resultados anteriores, o AF reprimiu a expressão de *phlD* como observada a repressão de *phlA* por outros autores (NOTZ et al., 2002; SCHNIDER-KEEL et al., 2000). O presente estudo adicionou novas informações, uma vez que foi descrito que a repressão ocorre tanto em FLF quanto FE, sendo necessário um tempo

mínimo para o AF comece a repressão de PHL. O gene *pltA* foi superexpresso devido a presença de AF durante a FLF, talvez o aumento de, *pltA* sobre ação de AF pode ser justificada de acordo com os dados obtidos por Baehler et al. (2005), que, utilizando a proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*-GFP) como proteína repórter, monitoraram o balanço da produção de PHL, pioluteorina e pirrolnitrina em *P. fluorescens* CHA0, demonstrando que a produção de PHL e pioluteorina é auto-regulada e que a expressão de um desses metabólitos reprime a expressão do outro e vice-versa. Assim, inicialmente com a alta repressão da produção de PHL pela presença de AF, a produção de pioluteorina poderia ter sido indiretamente beneficiada pela presença de AF, mascarando o efeito desse metabólito na produção de pioluteorina, fato esse que deve ser mais bem investigado em estudos posteriores.

O AF afetou a expressão de outros antibióticos: *rxzB* foi sutilmente superexpresso na FLF mas não em FE demonstrando o efeito transiente do AF em Pf-5, esse fato também foi observado pela transcrição de *pvdA*. van Rij et al. (2005) demonstrou utilizando resultados de microarranjo, que, o AF estimula a expressão de genes relacionados a aquisição de ferro durante a FLF ($DO_{600nm} = 2,0$) da pela *P. chlororaphis* (PCL1391). Assim, o presente estudo complementou os resultados obtidos anteriormente, demonstrando que os estudos da modulação molecular envolvida na interação patógeno - bactérias antagonistas são ainda muito pontuais e simplificados, sendo necessários estudos mais abrangentes e realizados durante um período maior de tempo a fim de se elucidar o que realmente acontece em longo prazo.

Os genes *pltA*, *rxzC*, *prnC* e *hcnA* não foram reprimidos por AF. Assim, os produtos codificados por esses genes poderiam estar substituindo o PHL na inibição de *Fusarium* spp pela Pf-5. Entretanto, o presente trabalho demonstrou que na presença de AF os compostos foram sutilmente afetados e somente a repressão PHL foi significativamente importante no antagonismo dos isolados fitopatogênicos de *F. verticillioides*. Apesar da comprovação da importância da rizoxina na inibição fúngica, sutil aumento desse metabólito, bem como o da pioluteorina e pirrolnitrina não surtiram efeito no potencial de inibição de Pf-5 em meio contendo AF. Esses dados são inéditos, acenando assim para uma nova dimensão na interação microbiana, que deve ser estudada, uma vez que o efeito do AF foi composto dependente. A repressão do PHL,

assim como a superprodução de pioluteorina, rizoxina e pirrolnitrina em NYBGli + Zn, provavelmente reflete a ação diferencial de AF nos grupos gênicos avaliados da Pf-5, sugerindo que, a micotoxina não deve estar agindo no regulador *gacA*. Reflete também, um mecanismo compensatório, repressão de PHL e superprodução de outros metabólitos secundários.

Micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp, incluindo AF, tipicamente possuem um amplo espectro de ação afetando bactérias, fungos, nematóides, insetos e mamíferos (MAY; WU; BLAKE, 2000). Surpreendentemente, uma diversidade de espécies de *Fusarium* tem sido descrita como produtoras de AF e outras micotoxinas requeridas na competição com outros microrganismos (BACON et al., 1996; LUTZ et al., 2003). A importância ecológica das micotoxinas em relação ao ciclo de vida e sobrevivência de fungos produtores é tão pouco conhecida quanto o seu papel na modulação da expressão gênica em bactérias e outros microrganismos competidores. Entender a base genética dos mecanismos de controle de *Fusarium* spp por Pf-5 pode ajudar na viabilização da aplicação de sistemas de biocontrole na agricultura. Esse entendimento também colabora como o futuro desenvolvimento de microrganismos geneticamente modificados, com promotores e genes apropriados, não influenciados pela ação de AF, que poderão ser utilizados na agricultura como agentes de biocontrole desses fitopatógenos.

Referências

ALEXANDER, N. J.; MCCORMICK, S. P.; HOHN, T. M. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: Gene isolation and expression in yeast.

Molecular and General Genetics, Berlin, v. 261, p. 977-84, 1999.

BACON, C. W.; PORTER, J. K.; NORRED, W. P.; LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p. 4039–4043, 1996.

BAEHLER, E.; BOTTIGLIERI, M.; PECHY-TARR, M.; MAURHOFER, M.; KEEL, C. Use of green fluorescent protein-based reporters to monitor balanced production of antifungal compounds in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, p. 24–38, 2005.

BLUMER, C.; HAAS, D. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v. 173, p. 170–177, 2000.

BRAZELTON, J. N.; PFEUFER, E. E.; SWEAT, T. A.; MCSPADDEN-GARDENER, B. B.; COENEN, C. 2,4-Diacetylphloroglucinol alters plant root development. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 21, p. 1349–1358, 2008.

CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. **The New Phytologist**, London, v. 157, p. 503–523, 2003.

CHOI, K. H.; SCHWEIZER, H. P. An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. **BMC Microbiology**, London, v. 5, p. 30 (1–11). 2005.

COOK, R.J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.31, p. 53–80, 1993.

COOK, R. J.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; FUJIMOTO, D.; MAZZOLA, M.; BANGERA, G.; KIM, D. Molecular mechanisms of defense by rhizobacteria against root disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 4197–4201, 1995.

CORBELL, N. **A two-component regulatory system controlling antibiotic production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5**. 1999. 213p. Tese (Doutorado em Botânica e Patologia de Planta) – Oregon State University, Corvallis, 1999.

CRONIN D.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; FENTON, A.; DUNNE, C.; DOWLING, D. N.; O’GARA, F. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, 1357–1361, 1997.

DE SOUZA, J. T.; ARNOULD, C.; DEULVOT, C.; LEMANCEAU, P.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; RAAIJMAKERS, J. M. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: Cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. **Phytopathology**, Lancaster, v. 93, p. 966–975, 2003a.

DE SOUZA, J. T.; DE BOER, M.; DE WAARD, P.; VAN BEEK, T. A.; RAAIJMAKERS, J. M. Biochemical, genetic, and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.69, p.7161-7172, 2003b.

DE WAARD, M. A. Significance of ABC transporters in fungicide sensitivity and resistance. **Pesticide Science**, London, v. 51, p. 271-275, 1997.

DHINGRA, O. D.; COELHO-NETTO, R. A.; RODRIGUES-SILVA JÚNIOR., G. J.; MAIA, C. B. Selection of endemic nonpathogenic endophytic *Fusarium oxysporum* from bean roots and rhizosphere competent fluorescent *Pseudomonas* species to suppress Fusarium-yellow of beans. **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 75–86, 2006.

DUFFY, B. K.; DÉFAGO, G. Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 66, p. 3142–3150, 2000.

_____. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 2429–2438, 1999.

_____. Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. **Phytopathology**, Lancaster, v. 87, p. 1250-1257, 1997.

DUFFY, B. K.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen selfdefense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 501-538, 2003.

DUFFY, B. K.; KEEL, C.; DÉFAGO, G. Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 70, 1836–1842, 2004.

FLEISSNER, A.; SOPALLA, C.; WELTRING, K. M. An ATP-binding cassette multidrug-resistance transporter is necessary for tolerance of *Gibberella pulicaris* to phytoalexins and virulence on potato tubers. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, p. 102-108, 2002.

GUPTA, A. K.; BARAN, R.; SUMMERBELL, R. C. *Fusarium* infections of the skin. **Current Opinion in Infectious Disease**, London, v. 13, p. 121-128, 2000.

HAAS, D.; KEEL, C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 41, p. 117–153, 2003.

HAMMER, P. E.; BURD, W.; HILL, D. S.; LIGON, J. M.; VAN PEE, K. Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 180, p. 39–44, 1999.

HANDELSMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1855-1869, 1996.

HERBAR, K. P.; DAVEY, A. G.; DART, P. J. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moliniforme*, a soil-borne fungal pathogen: isolation and identification. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 24, p. 979-987, 1992a.

HERBAR, K. P.; ATKINSON, D.; TUCKER, W.; DART, P. J. Suppression of *Fusarium moliniforme* by maize root-associated *Pseudomonas cepacia*. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 24, p. 1009-1020, 1992b.

HERBAR, K. P.; DAVEY, A. G.; MERRIN, J.; DART, P. J. Rhizobacteria of maize antagonistic to *Fusarium moliniforme*, a soil-borne fungal pathogen: colonization of rhizosphere and root. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 24, p. 989-997, 1992c.

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, A.; HEYDRICH-PEREZ, M.; ACEBO-GUERRERO, Y. Antagonistic activity of Cuban native rhizobacteria against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. in maize (*Zea mays* L.). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 39, p. 180–186, 2008.

HOANG, T. T.; KARKHOFF-SCHWEIZER, R. R.; KUTCHMA, A. J.; SCHWEIZER, H. P. A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for sitespecific excision of chromosomally-located DNA sequences: Application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Gene**, Amsterdam, v. 212, p. 77-86, 1989.

HOWELL, C. R.; STIPANOVIC, R. D. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. **Phytopathology**, Lancaster, v. 69, p. 480–482, 1979.

_____. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic pyoluteorin. **Phytopathology**, Lancaster, v. 70, p. 712–715, 1980.

JOFFE, A. Z. ***Fusarium* species: their biology and toxicology**. New York: John Wiley and Sons. 1986. 599p.

JOHANSSON, L.; HÖKEBERG, M.; GERHARDSON, B. Performance of the *Pseudomonas chlororaphis* biocontrol agent MA 342 against cereal seed-borne diseases in field experiments. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, p. 701-711, 1998.

KEEL, C.; DÉFAGO, G. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: GANGE, A. C.; BROWN, V. K. (Ed.). **Multitrophic interactions in terrestrial systems**. London: Blackwell Scientific Publishers. 1997. p. 27-46.

KEEL, C.; SCHNIDER, U.; MAURHOFER, M.; VOISARD, C.; LAVILLE, J.; BURGER, U.; WIRTHNER, P.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 5, p. 4-13, 1992.

KLOPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCROTH, M. N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, London, v. 286, p. 885-886, 1980a.

_____. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. **Current Microbiology**, New York, v. 4, p. 317-320, 1980b.

LAGOPODI, A. L.; RAM, A. F. J.; LAMERS, G. E. M.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; LUGTENBERG, B. J. J.; BLOEMBERG, G. V. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.15, p. 172-179, 2002.

LANDA, B. B.; CACHINERO-DÍAZ, J. M.; LEMANCEAU, P.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; ALABOUVETTE, C. Effect of fusaric acid and phytoanticipins on growth of rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, p. 971-985, 2002.

LAVILLE, J.; BLUMER, C.; VON SCHROETTER, C.; GAIA, V.; DÉFAGO, G.; KEEL, C.; HAAS, D. Characterization of the hcnABC gene cluster encoding hydrogen cyanide synthase and anaerobic regulation by ANR in the strictly aerobic biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v.180, p. 3187-3196, 1998.

LEMANCEAU, P.; ALABOUVETTE, C. Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent *Pseudomonads*: mechanisms and applications. **Biocontrol Science and Technology**, New York, v. 3, p. 219-234, 1993.

LIGON, J. M.; HILL, D. S.; HAMMER, P. E.; TORKEWITZ, N. R.; HOFMANN, D.; KEMPF, H. J.; VAN PEE, K. H. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. **Pesticide Science**, London, v. 56, p. 688–695, 2000.

LOPER, J. E.; GROSS, H. Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 119, p. 255–264, 2007.

LOPER, J. E.; HENKELS, M. D.; SHAFFER, B. T.; VALERIOTE, F. A.; GROSS, H. Isolation and identification of rhizoxin analogs from *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 by using a genomic mining strategy. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 74, p. 3085–3093, 2008.

LOPER, J. E.; NOWAK-THOMPSON, B.; WHISTLER, C. A.; HAGEN, M. J.; CORBELL, N. A.; HENKELS, M. D.; STOCKWELL, V. O. Biological control mediated by antifungal metabolite production and resource competition: an overview. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA. 4. 1997, Sapporo. **Proceedings...** Sapporo: Nakanishi Publishers. 1997. p. 73–79.

LUTZ, M. P.; FEICHTINGER, G.; DÉFAGO, G.; DUFFY, B. K. Mycotoxigenic *Fusarium* and deoxynivalenol production repress chitinase gene expression in the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* P1. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 69, p. 3077–3084, 2003.

MAURHOFER, M.; KEEL, C.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. **Plant Pathology**, London, v. 44, p. 40–50, 1995.

MAY, H. D.; WU, Q. Z.; BLAKE, C. K. Effects of *Fusarium* spp. mycotoxins fusaric acid and deoxynivalenol on the growth of *Ruminococcus albus* and *Methanobrevibacter ruminantium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, p. 692–699, 2000.

MAZZOLA, M.; FUJIMOTO, D. K.; THOMASHOW, L. S.; COOK, R. J. Variation in sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* to antibiotics produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. and effect on biological control of take-all of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 2554–2559, 1995.

MENDES, R. **Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. 2008. 119p. Tese (Doutorado em Genética e melhoramento de Planta) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

MORRISSEY, J. P.; OSBOURN, A. E. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 63, p. 708-24, 1999.

NIELSEN, T. H.; SORESENSEN, D.; TOBIASEN, C.; ANDERSEN, J. B.; CHRISTOPHERSEN, C.; GIVSKOV, M.; SORESENSEN, J. Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar beet rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 3416-3423, 2002.

NOTZ, R.; MAURHOFER, M.; DUBACH, H.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Fusaric acid-producing strains of *Fusarium oxysporum* alter 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic gene expression in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in vitro and in the rhizosphere of wheat. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 68, p. 2229-2235, 2002.

PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; HERTWECK, C. Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. **Nature**, London, v. 437, p. 884–888, 2005.

PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; GROTH, I.; SCHMITT, I.; RICHTER, W.; ROTH, M.; HERTWECK, C. *Burkholderia rhizoxinica* sp. nov. and *Burkholderia endofungorum* sp. nov., bacterial endosymbionts of the plant-pathogenic fungus *Rhizopus microsporus*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, 2583–2590, 2007.

PAULSEN, I. T.; PRESS, C. M.; RAVEL, J.; KOBAYASHI, D. Y.; MYERS, G. S.; MAVRODI, D. V.; DEBOY, R. T.; SESHADRI, R.; REN, Q.; MADUPU, R.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; BRINKAC, L. M.; DAUGHERTY, S. C.; SULLIVAN, S. A.; ROISOVITZ, M. J.; GWINN, M. L.; ZHOU, L.; SCHNEIDER, D. J.; CARTINHOUR, S. W.; NELSON, W. C.; WEIDMAN, J.; WATKINS, K.; TRAN, K.; KHOURI, H.; PIERSON, E. A.; PIERSON, L. S.; THOMASHOW, L. S.; LOPER, J. E. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. **Nature Biotechnology**, New York, v. 23, p. 873–878, 2005.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, p. 2002-2007, 2001.

RAAIJMAKERS, J. M.; VLAMI, M.; DE SOUZA, J. T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 81, p. 537-547, 2002.

RAID, R. N. **Pokkah boeng disease of sugarcane**. Gainesville: University of Florida, 1998. 3p.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; LEKANNE DEPREZ, R. H.; MOORMAN, A. T. M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Clare, v. 339, p. 62-66, 2003.

RAMETTE, A.; FRAPOLLI, M.; DÉFAGO, G.; MOENNE-LOCCOZ, Y. Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.16, p. 525–535, 2003.

ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A. D. **Agência de informação EMBRAPA. Cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_55_711200516718.html>. Acesso em: 03 jan 2009.

SCHNIDER-KEEL, U.; SEEMATTER, A.; MAURHOFER, M.; BLUMER, C.; DUFFY, B. K.; GIGOT BONNEFOY, C.; REIMMANN, C.; NOTZ, R.; DÉFAGO, G.; HAAS, D.; KEEL, C. Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 182, p. 1215-1225, 2000.

SCHOONBEEK, H. J.; RAAIJMAKERS, J. M.; DE WAARD, M. A. Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, p. 1165-1172, 2002.

SCHOUTEN, A.; VAN DEN BERG, G.; EDEL-HERMANN, V.; STEINBERG, C.; GAUTHERON, N.; ALABOUVETTE, C.; DE VOS, C. H.; RAAIJMAKERS, J. M. Defense responses of *Fusarium oxysporum* to 2,4-diacetylphloroglucinol, a broad-spectrum antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, p. 1201–1211, 2004.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 160, p. 47–56, 1987.

SÉVENO, N. A.; KALLIFIDAS, D.; SMALLA, K.; VAN ELSAS J. D.; COLLARD, J. M.; KARAGOUNI, A. D.; WELLINGTON, E. M. H. Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment. **Reviews in Medical Microbiology**, Wageningen, v. 13, p. 15-27, 2002.

SIMON, R.; PRIEFER, U. B.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Bio/Technology**, New York, v. 1, p. 784-791, 1983.

SLININGER, P. J.; SHEA-WILBUR, M. A. Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, p. 794-800, 1995.

STEFFENS, J. J.; PELL, E. J.; TIEN, M. Mechanisms of fungicide resistance in phytopathogenic fungi. **Current Opinion in Biotechnology**, Philadelphia, v. 7, p. 348-55, 1996.

THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: STACEY, G.; KEEN, N.T. (Org.). **Plant-microbe interactions**. New York: Chapman and Hall. 1996. vol. 1. p. 187-235.

TOYODA, H.; HASHIMOTO, H.; UTSUMI, R.; KOBAYASHI, H.; OUCHI, S. Detoxification of fusaric acid by a fusaric acid-resistant mutant of *Pseudomonas solanacearum* and its application to biological control of Fusarium wilt of tomato. **Phytopathology**, Lancaster, v. 78, p. 1307-1311, 1988.

VAN RIJ, E. T.; GIRARD, G.; LUGTENBERG, B. J. J.; BLOEMBERG, G. V. Influence of fusaric acid on phenazine-1-carboxamide synthesis and gene expression of *Pseudomonas chlororaphis* strain PCL1391. **Microbiology**, Reading, v. 151, p. 2805-2814, 2005.

VANETTEN, H.; TEMPORINI, E.; WASMANN, C. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: Why is it not required by all pathogens? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 59, p. 83-93, 2001.

VIEIRA, J.; MESSING, J. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with universal primers. **Gene**, Amsterdam, v. 19, p. 259-268, 1982.

VOISARD, C.; BULL, C.; KEEL, C.; LAVILLE, J.; MAURHOFER, M.; SCHNIDER, U.; DÉFAGO, G.; HAAS, D. Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: current concepts and experimental approaches. In: O'GARA, F.; DOWLING, D.; BOESTEN, B. (Org.). **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms**. Weinheim: VCH Publishers. 1994. p. 67-89.

VOISARD, C.; KEEL, C.; HAAS, D.; DÉFAGO, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. **EMBO Journal**, Oxford, v. 8, p. 351-358, 1989.

WEERT, S.; KUIPER, I.; LAGENDIJK, E. L.; LAMERS, G. E. M.; LUGTENBERG, B. J. J. Role of chemotaxis toward fusaric Acid in colonization of hyphae of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 16, p. 1185–1191, 2003.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 487–511, 2001.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O interesse mundial em fontes renováveis e menos poluentes de energia em detrimento aos combustíveis fósseis incentiva o aumento da produção de cana-de-açúcar no Brasil. O total estimado para a safra 2009/2010 deve atingir 550 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na Região Centro-Sul, contra 505 milhões de toneladas na safra 2008/2009 e 431 milhões na safra 2007/2008. O aumento de produção poderá ser suprido pelo aumento das áreas plantadas, programas de melhoramento genético e pelo uso de microrganismos associados. Dentre esses microrganismos, as bactérias têm sido encontradas associadas a todas as espécies vegetais já estudadas. Essas bactérias podem contribuir para o desenvolvimento da planta, sendo utilizadas comercialmente como promotoras de crescimento vegetal e no controle biológico de pragas e fitopatógenos, entre outros. Dessa maneira, o estudo dos aspectos biotecnológicos envolvidos na utilização de bactérias na agricultura é de suma importância no contexto de cana-de-açúcar no Brasil, pois, apesar de bem descritos, o repertório dos efeitos benéficos das bactérias têm sido pouco estudados quando associadas a plantas de clima tropical.

Inicialmente no capítulo 2 foram avaliados os aspectos biotecnológicos da interação *Pantoea agglomerans* 33.1 - cana-de-açúcar. Essa linhagem foi isolada previamente de *Eucalyptus grandis*. No presente trabalho, foi descrita ineditamente a promoção de crescimento vegetal de outro hospedeiro, cana-de-açúcar, pela linhagem 33.1. Também foi verificada a indução da produção de proteínas de resistência pelas plantas inoculadas com 33.1 e a diminuição da produção de pectinases e celulases pelo endófito 33.1 quando associado à cana-de-açúcar. Surpreendentemente, a promoção de crescimento de cana-de-açúcar pela 33.1 deve ter sido mediada pela produção bacteriana do fitormônio ácido-indol-acético e fosfatases e não, pela fixação biológica de nitrogênio. Esses resultados indicam que outros mecanismos envolvidos na promoção de crescimento devem ser também avaliados na busca de inoculantes para cana-de-açúcar.

No capítulo 3, foi demonstrado que a bactéria 33.1 é capaz de colonização cruzada em cana-de-açúcar. No Brasil há poucos estudos avaliando a especificidade na interação bactéria-hospedeiro. Dessa forma, os resultados obtidos abrem precedentes

para estudos visando a avaliação da sinalização molecular relacionada à especificidade dessas interações. O plasmídeo integrativo desenvolvido, pNKGFP, poderá ser utilizado em outros estudos de colonização, utilizando outras espécies vegetais e bacterianas.

Os locais que a linhagem 33.1 foi capaz de colonizar (raiz e parte aérea) são também nichos de fitopatógenos e pragas. Dessa forma, a linhagem foi geneticamente modificada e apresentou controle parcial da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, inseto-praga que habita os colmos de cana-de-açúcar. Os resultados corroboram as enormes expectativas na obtenção de novas linhagens microbianas por meio da manipulação genética, visando entre outros fatores maior adaptabilidade ao ambiente ou a planta hospedeira, bem como o aumento da produção de compostos de interesse como enzimas líticas ou compostos tóxicos durante o controle de fitopatógenos e pragas. Ressalta-se que estudos devem ser realizados a fim de avaliar os riscos da aplicação desses organismos na agricultura antes da liberação dos mesmos no ambiente.

Os metabólitos secundários 2,4-diacetil-floroglucinol (PHL) e rizoxina produzidos pela bactéria modelo no controle de fitopatógenos, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, foram os principais compostos responsáveis pelo controle de *Fusarium* spp. incluindo o *Fusarium verticillioides* causador de *Pokkah boeng* em cana-de-açúcar. Os fitopatógenos apresentaram diferentes graus de sensibilidade aos metabólitos avaliados, demonstrando assim que a aplicação de um determinado agente de biocontrole deve ser estudada caso-a-caso. A adição de ácido fusárico em meio de cultura reprimiu fortemente a produção de PHL, e também a inibição dos isolados de *F. verticillioides* (T4 Ø e FV-01 CTC) pela Pf-5. O sistema de sinalização entre os microrganismos mediado pelo ácido fusárico também influenciou a produção de outros compostos pela bactéria Pf-5, sendo esses compostos envolvidos no controle biológico.

As sinalizações moleculares envolvidas na interação planta-microrganismo e microrganismo-microrganismo são pouco conhecidas e os dados apresentados poderão colaborar com o entendimento da co-evolução desses organismos. Além disso, esse entendimento também colabora com futuras aplicações de bactérias que poderão ser geneticamente modificadas, aumentando assim os possíveis benefícios em campo.