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

Interação entre cana-de-açúcar e bactérias associadas

Priscilla de Barros Rossetto

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

**Piracicaba
2008**

Priscilla de Barros Rossetto
Engenheiro Agrônomo

Interação entre cana-de-açúcar e bactérias associadas

Orientadora:
Prof^a. Dra. **ALINE APARECIDA PIZZIRANI-KLEINER**

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

**Piracicaba
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Rossetto, Priscilla de Barros
Interação entre cana-de-açúcar e bactérias associadas / Priscilla de Barros
Rossetto. - - Piracicaba, 2008.
148 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Bactérias 2. Biodiversidade 3. Cana-de-açúcar 4. Microrganismos
endofíticos 5. Plantas transgênicas 6. Rizosfera I. Título

CDD 633.61

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

À MINHA FAMÍLIA, PAI, DANICA E FEFÊ,
POR SUA EXISTÊNCIA, QUE MOTIVA E JUSTIFICA TODA MINHA VIDA.
AO MEU AMOR SANDRO,
POR ME ACOMPANHAR NESSA JORNADA, TORNANDO-A MAIS FELIZ.

DEDICO

À MINHA QUERIDA MÃE, POR TODO O AMOR QUE ME DEU,
PELO EXEMPLO DE VIDA, PELA FORÇA E ALEGRIA
E PELOS ENSINAMENTOS QUE ESTARÃO SEMPRE A GUIAR OS MEUS PASSOS.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner, pela oportunidade dada, pela confiança depositada em meu trabalho e pela compreensão e carinho dispensados a mim em momentos difíceis;

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

Ao amigo e mestre Welington Luiz de Araújo, sem o qual esse trabalho não teria sido possível, pois ele sempre me incentivou a enfrentar os meus medos e a buscar o melhor em mim;

Ao Dr. Paulo Teixeira Lacava, pelo incentivo e amizade durante a finalização desse trabalho;

À minha família, à Siomara, ao Vitinho, aos meus cunhados, aos meus primos e aos meus tios, pelo amor, pelo apoio de sempre e pelos momentos de descontração;

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo", com os quais convivi durante toda a última década. E por ser tanto tempo, seria impossível listar aqui todos os personagens dessa longa história. Saibam que, mesmo com o eventual esquecimento do nome nesta lista, vocês todos formam a minha família piracicabana que eu sempre guardarei em minhas lembranças e em meu coração: Adalgisa, Ágata Giancoli, Aldo Procópio, Alessandro Riffel, Aline Romão, Anderson Ferreira, André Lima, Andréa Bogas, Armando Dias, Bia, Carlos Eduardo Ceroni, Carlos Ivan Aguilar, Carolina Almeida, Claudia Gai, Cláudio, Cristina Almeida, Cristina Maki, Danice Luvizotto, Denise, Fernanda Bernardes, Fernanda Bueno, Fernanda Sebastianes, Fernando Andreote, Fernando Barcellos, Francisco Andreote, Guilherme Tenório, Heloíze Milano, Joelma Marcon, José Antônio Silva, Júlia Kuklinsky-Sobral, Laura Assumpção, Léia Fávaro, Leo, Luciana Cursino, Manu, Marcelo, Maria Carolina Quecine, Marise Suzuki, Mayra Martins, Michele Silva, Paula, Renata Assis, Ricardo Yara, Rodrigo Mendes, Rodrigo Stuart, Rose, Rudi Procópio, Sérgio, Sônia, Taís Lana, Uirá Belmonte, Vanessa Santos, Vivian Pietrobon e Walter Maccheroni Jr.;

Aos agregados, claro, que completam e alegram o grupo de trabalho, Marcus Venicius de Mello Lourenço, Raphael Carneiro e Vanderlei Varisi;

Aos meus amigos de sempre e aos meus amigos da faculdade, por todas as lembranças agradáveis que trago comigo e por fazerem parte do que sou, em especial a Tatiana Monteiro Malta e toda à sua família, à Cláudia, à Vanessa, ao Odair Machado, à Mel e ao Marcelo Stábile;

Aos meus professores de dança, colegas de aula e ao meu parceiro Fernando, pelos momentos maravilhosos de descontração;

Às amigas de república (Cris, Sandra, Li, Léia e Marise), pela convivência alegre e companhia nessa saudade constante que é viver longe da família;

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Genética e do curso de pós-graduação em Genética e Melhoramento de plantas;

Aos colegas de sofrimento e diversão em todas as coletas e isolamentos, pelas noites e madrugadas de pizza e muito trabalho;

A Carol e ao Fernando, pelas análises de dados que foram fundamentais para a discussão desse trabalho;

Ao laboratório do prof. Marcílio, pela ajuda no processamento do material para a análise de microscopia e pelo carinho;

Ao Mateus Mondin, pelo grande auxílio nas análises em microscopia de fluorescência;

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (NAP/MEPA) e ao Prof. Kitajima, por possibilitarem as análises em microscopia eletrônica de varredura;

Ao centro de Tecnologia Canavieira (CTC), por fornecerem a área experimental, em especial a Dra. Sabrina Moutinho Chabregas;

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP), pelo apoio financeiro.

*"Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve...
A vida é muita para ser insignificante".
(Charles Chaplin)*

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	20
1.1 Revisão Bibliográfica.....	20
1.1.1 Importância das bactérias associadas às plantas.....	20
1.1.1.1 Bactérias rizosféricas.....	20
1.1.1.2 Bactérias endofíticas.....	21
1.1.2 O gênero <i>Methylobacterium</i> e sua importância como endófito.....	23
1.1.3 Estudo da diversidade microbiana.....	26
1.1.3.1 Técnica dependente de cultivo – ARDRA.....	28
1.1.3.2 Técnica independente de cultivo – DGGE.....	29
1.1.4 Cana-de-açúcar e resistência ao herbicida Imazapyr.....	31
1.1.5 Efeitos de plantas geneticamente modificadas (PGM) sobre os microrganismos.....	33
1.2 Hipóteses.....	36
1.3 Objetivos.....	37
Referências.....	37
2 EFEITO DA CANA-DE-AÇÚCAR TRANSGÊNICA SOBRE A COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA.....	52
Resumo.....	52
Abstract.....	53
2.1 Introdução.....	54
2.2 Materiais e métodos.....	55
2.2.1 Material vegetal e área de cultivo.....	55
2.2.2 Delineamento experimental.....	56
2.2.3 Isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar.....	57
2.2.3.1 Isolamento de bactérias epifíticas de folha e do rizoplane.....	57
2.2.3.2 Isolamento de bactérias endofíticas de colmo e raiz.....	58

2.2.4 Avaliação da diversidade bacteriana associada à cana-de-açúcar.....	59
2.2.4.1 Extração de DNA genômico total bacteriano.....	59
2.2.4.2 Amplificação do 16S rDNA.....	59
2.2.4.3 Caracterização de isolados por ARDRA (<i>Amplified rDNA Restriction Analysis</i>).....	59
2.2.4.4 Análise de similaridade e construção de dendrogramas.....	60
2.2.4.5 Seqüenciamento e identificação do 16S rDNA.....	61
2.3 Resultados e discussão.....	61
2.3.1 Avaliação da densidade bacteriana associada à cana-de-açúcar transgênica.....	61
2.3.2 Avaliação da diversidade bacteriana associada à cana-de-açúcar transgênica.....	66
Referências.....	79
3 EFEITO DA CANA-DE-AÇÚCAR RESISTENTE AO HERBICIDA IMAZAPYR (GENE <i>AHAS</i>) E A COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA.....	84
Resumo.....	84
Abstract.....	85
3.1 Introdução.....	86
3.2 Materiais e métodos.....	87
3.2.1 Material vegetal e área de cultivo.....	87
3.2.2 Delineamento experimental.....	88
3.2.3 Isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar.....	90
3.2.3.1 Isolamento de bactérias endofíticas da raiz.....	90
3.2.3.2 Isolamento de bactérias da rizosfera e do solo.....	90
3.2.4 Análise da diversidade genética bacteriana por ARDRA.....	90
3.2.4.1 Extração de DNA.....	90
3.2.4.2 Amplificação do 16S rDNA.....	91
3.2.4.3 Caracterização de isolados por ARDRA (<i>Amplified rDNA Restriction Analysis</i>).....	91
3.2.5 Análise de similaridade e construção de dendrogramas.....	92
3.2.6 Análise da diversidade de <i>Methylobacterium</i> spp. por DGGE.....	92

3.2.6.1 Extração de DNA da rizosfera.....	92
3.2.6.2 Amplificação do 16S rDNA.....	92
3.2.6.3 Análise por DGGE.....	93
3.2.6.4 Análise dos géis de DGGE – análise multivariada.....	94
3.3 Resultados e discussão.....	94
3.3.1 Avaliação da densidade bacteriana associada à cana-de-açúcar IMI1.....	94
3.3.2 Avaliação da diversidade dos isolados associados à cana-de-açúcar IMI1	102
3.3.2.1 Análise da comunidade bacteriana cultivada.....	102
3.3.2.2 Análise da comunidade bacteriana por meio de DGGE.....	108
Referências.....	110
4 AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR <i>Methylobacterium extorquens</i> e <i>M. mesophilicum</i>	116
Resumo.....	116
Abstract.....	117
4.1 Introdução.....	118
4.2 Materiais e métodos.....	119
4.2.1 Linhagens utilizadas.....	119
4.2.2 Material vegetal.....	120
4.2.3 Delineamento experimental.....	120
4.2.3.1 Experimento 1 – visualização da colonização de <i>Methylobacterium</i> em plantas de cana-de-açúcar <i>in vitro</i> por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	120
4.2.3.2 Experimento 2 – quantificação por isolamento em meio de cultura da colonização de <i>Methylobacterium</i> em cana-de-açúcar <i>in vitro</i> e sua visualização por microscopia óptica de fluorescência (MOF).....	121
4.2.3.3 Experimento 3 – visualização da colonização de <i>Methylobacterium</i> por MOF em palitos de madeira.....	121
4.2.3.4 Experimento 4 - quantificação da colonização de <i>Methylobacterium</i> em cana-de-açúcar em casa de vegetação e visualização por MOF.....	122
4.2.4 Quantificação por reisolamento das linhagens em meio de cultura.....	122
4.2.4.1 Reisolamento de plantas <i>in vitro</i>	122

4.2.4.2 Reisolamento das plantas na casa de vegetação.....	123
4.2.5 Observações em microscopia óptica de fluorescência (MOF).....	123
4.2.6 Observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	124
4.3 Resultados e discussão.....	124
4.3.1 Análise da ocorrência de interação entre as linhagens em estudo de <i>Methylobacterium</i> e cana-de-açúcar <i>in vitro</i> por MEV.....	124
4.3.2 Análise da colonização de <i>Methylobacterium</i> em cana-de-açúcar <i>in vitro</i> por meio de isolamento e microscopia óptica de fluorescência (MOF).....	127
4.3.2.1 Análise da densidade de <i>Methylobacterium</i> em plantas <i>in vitro</i>	127
4.3.2.2 Avaliação da colonização por microscopia óptica de fluorescência (MOF).....	131
4.3.3 Análise da colonização de <i>Methylobacterium</i> em palitos de madeira.....	136
4.3.4 Análise da colonização de <i>Methylobacterium</i> em cana-de-açúcar em casa de vegetação.....	140
4.3.4.1 Análise da densidade de <i>Methylobacterium</i> em plantas em casa de vegetação.....	140
4.3.4.2 Análise da colonização por microscopia óptica de fluorescência (MOF)	142
Referências.....	143
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	148

RESUMO

Interação entre cana-de-açúcar e bactérias associadas

Muitos fatores, como variações sazonais, tipos de tecido vegetal, cultivares e espécies de hospedeiro, tipo de solo, interação com microrganismos benéficos ou patógenos entre outros, afetam a estrutura e a composição da comunidade bacteriana das plantas. A introdução de plantas geneticamente modificadas (PGM) foi somada ao conjunto desses fatores, podendo acarretar efeitos diretos e indiretos sobre a comunidade bacteriana. Cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância no Brasil; a área de cultivo está em expansão devido aos incentivos para a produção de álcool. Uma bactéria potencialmente importante para a cultura de cana-de-açúcar é a *Methylobacterium*, um importante endófito de diversas culturas de interesse econômico e que, em cana-de-açúcar, pode melhorar a germinação de sementes, promover um aumento do peso da planta e da área foliar, além do número de internódios. Dessa forma, o trabalho teve como objetivos: i) avaliar os efeitos da cana-de-açúcar transgênica resistente a insetos e a herbicida sobre a comunidade bacteriana associada; ii) avaliar se o suposto efeito causado pela cana-de-açúcar transgênica resistente a herbicida deriva diretamente do transgene ou dos tratos culturais diferenciados aos quais a planta transgênica é submetida; iii) avaliar a interação entre *Methylobacterium* spp. e cana-de-açúcar. Analisando a densidade bacteriana das plantas de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas não foi possível constatar diferenças relacionadas à introdução dessas plantas. Analisando somente quanto ao manejo de ambos os experimentos, foi possível observar que diferenças em trato cultural ou manejo de plantas, decorrentes ou não da transgenia, podem influenciar a comunidade bacteriana. Por meio de ARDRA, foi possível observar distribuição diferenciada dos ribotipos com a introdução das PGMs. No experimento realizado somente com plantas transgênicas para resistência a Imazapyr, foi possível notar que, em 17 meses, a presença da planta transgênica e a aplicação do herbicida Imazapyr podem ter resultado na redução da densidade bacteriana associada à rizosfera de cana-de-açúcar. Por meio de DGGE, foi visto que o estado fisiológico da planta foi a maior fonte de variação. Novamente por meio de ARDRA, foram observados ribotipos cuja presença foi afetada pelo cultivo da planta transgênica. Esses ribotipos diferentemente distribuídos poderiam resultar em alterações na atividade bacteriana dessas plantas, uma vez que esses ribotipos podem representar grupos funcionais importantes. A colonização de *Methylobacterium* spp. em cana-de-açúcar foi analisada por meio de microscopia eletrônica de varredura, reisolamento e microscopia óptica de fluorescência. Foi visto que as linhagens utilizadas colonizam cana-de-açúcar, sendo que os pontos de maior colonização são os flanges cuticulares e as regiões pilosas da raiz. Outros estudos são necessários para o melhor aproveitamento dessa bactéria na cultura de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar transgênica; Diversidade bacteriana; *Methylobacterium*; ARDRA; DGGE

ABSTRACT

Interaction between sugarcane and associated bacteria

Many factors, such as seasonal variations, kinds of vegetal tissue, cultivares and host species, kind of soil, interaction with beneficial or pathogen microorganisms, among others, affect the structure and composition of plants bacterial community. The introduction of genetically modified plants (GMP) was added to the set of these factors, making it possible to cause direct and indirect effects on the bacterial community. Sugarcane is a very important crop in Brazil; the cultivation area is expanding due to incentives to alcohol production. A potentially important bacterium for sugar cane cultivation is the *Methylobacterium*, which is an important endophyte for several cultures of economic interest and which can improve seed germination in sugar cane, promote an increase of plant weight and foliar area, and also the internodes. Thus, the work had as objectives: *i)* to assess the effects of transgenic sugarcane resistant to insects and herbicide on the associated bacterial community; *ii)* to assess if the presumed effect caused by transgenic sugarcane resistant to herbicides derives directly from the transgene or differentiated cultural handlings to which the genetically modified plant is undertaken; *iii)* to assess the interaction between *Methylobacterium* ssp. and sugarcane. Analyzing the bacterial density of conventional and transgenic sugarcane plants it was not possible to see differences related to the introduction of these plants. Analyzing only in relation to the handling of both experiments, it was possible to see that differences in cultural wielding or handling of plants derived or not from transgenia can influence the bacterial community. By means of ARDRA, it was possible to see a differentiated distribution of ribotypes with the introduction of GMPs. In the experiment made only with transgenic plants for Imazapyr resistance, it was possible to see that in 17 months, the presence of the transgenic plant and the application of Imazapyr herbicide can bring result regarding the bacterial density reduction associated to sugarcane rizosphere. By means of DGGE, it was seen that the physiological status of the plant was the greatest variation source. Again, by means of ARDRA, ribotypes whose presence was affected by transgenic plant cultivation were observed. If distributed differently, these ribotypes can represent important functional groups. The *Methylobacterium* ssp. Colonization in sugarcane was analyzed and by means of scanning electronic microscopy, re-isolation, and fluorescence optical microscopy. It was observed that the utilized lineages colonize sugarcane being cuticle flange and perilous regions of root the highest colonization points. Other studies are needed to a better good use of this bacterium in sugarcane culture.

Keywords: Transgenic sugarcane; Bacterial diversity; *Methylobacterium*; ARDRA; DGGE

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Densidade bacteriana de epifíticos de folha (A), de endofíticos de raiz (B), de rizoplano (C) e de solo de cana-de-açúcar convencional (CONV) e transgênica para resistência a pragas (SPT 7 e SPT 99). Os dados foram transformados para Log (UFC+2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância, o qual foi realizado separadamente para cada comunidade amostrada (epifíticos de folha, endofíticos de raiz, rizoplano e solo)..... 62
- Figura 2.2 - Densidade bacteriana de epifíticos de folha (A), de endofíticos de raiz (B), de rizoplano (C) e de solo de cana-de-açúcar convencional (CONV*) e transgênica para resistência a herbicida (IMI 1 e IMI 4). Os dados foram transformados para Log (UFC+2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância, o qual foi realizado separadamente para cada comunidade amostrada (epifíticos de folha, endofíticos de raiz, rizoplano e solo)..... 63
- Figura 2.3 - Densidade bacteriana de diferentes comunidades associadas a plantas de cana-de-açúcar convencionais sem corte (CONV) e com cortes anuais (CONV*). Os dados foram transformados para Log (UFC+2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância realizado separadamente para cada comunidade amostrada (epifíticos de folha, endofíticos de raiz, rizoplano e solo)..... 64
- Figura 2.4 - Distribuição dos 17 ribotipos nos tratamentos do experimento 1 – resistência a insetos (A) e no experimento 2 – resistência a herbicida (B). O número de isolados pertencentes a cada ribotipo foi convertido para porcentagem considerando como total o número de isolados analisados para cada tratamento..... 69
- Figura 2.5 - Dendrograma de similaridade entre os tratamentos baseado na presença e ausência dos 17 ribotipos nos diferentes tratamentos do experimento 2 – resistência a herbicida (A) e experimento 1 -resistência insetos (B) . Agrupamento obtido por UPGMA utilizando-se o software NTSYSpc versão 2.1 (12). *Bootstreap* foi calculado pelo *Winboot*..... 70

Figura 2.6 - Dendrograma de similaridade genética entre os ribotipos de bactérias associadas à plantas de cana-de-açúcar, gerado por UPGMA utilizando-se o <i>software</i> NTSYSpc versão 2.1.....	71
Figura 2.7 - Distribuição dos 17 ribotipos nos tratamentos controles do experimento 1 – resistência a insetos (CONV - sem cortes) e no experimento 2 – resistência a herbicida (CONV* - cortes anuais). O número de isolados pertencentes a cada ribotipo foi convertido para porcentagem considerando-se como total o número de isolados analisados para cada tratamento.....	72
Figura 2.8 - Distribuição dos 17 ribotipos nos tratamentos do experimento 1 – resistência a insetos para as comunidades de bactérias epifíticas de folha (A), endofíticas de raiz (B), rizoplano (C) e de solo. O número de isolados pertencentes a cada ribotipo foi convertido para porcentagem considerando-se como total o número de isolados analisados para cada tratamento.....	74
Figura 2.9 - Distribuição dos 17 ribotipos nos tratamentos do experimento 2 – resistência a herbicida para as comunidades de bactérias epifíticas de folha (A), endofíticas de raiz (B), rizoplano (C) e de solo. O número de isolados pertencentes a cada ribotipo foi convertido para porcentagem considerando-se como total o número de isolados analisados para cada tratamento.....	75
Figura 3.1 - Croqui experimental do experimento realizado no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, SP, com três tratamentos: plantas convencionais (SP80 1842) e plantas transgênicas (IMI 1) manejadas com capina manual ou aplicação de herbicida.....	89
Figura 3.2 - Cronologia do experimento realizado com cana-de-açúcar no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC). Foi realizada uma aplicação do Imazapyr nas parcelas desse tratamento logo após o plantio. Nas outras parcelas, a capina foi realizada periodicamente até o pleno estabelecimento da cana-de-açúcar. As coletas de plantas para os isolamentos foram realizadas 3, 10 e 17 meses após o plantio.....	89

- Figura 3.3 - Densidade média bacteriana de diferentes isolamentos de plantas de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas para resistência a herbicida. Os dados foram transformados para Log (UFC +2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância (CV1xCV2xCV3; TC1xTC2xTC3 e TH1xTH2xTH3)..... 95
- Figura 3.4 - Densidade média bacteriana de diferentes isolamentos de endófitos de raiz (1 – A; 2 – B; 3 – C) de plantas de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas para resistência a herbicida. Os dados foram transformados para Log (UFC +2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância (CVxTC e TCxTH para cada isolamento)..... 96
- Figura 3.5 - Densidade média bacteriana de diferentes isolamentos de rizosfera (1 – A; 2 – B; 3 – C) de plantas de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas para resistência a herbicida. Os dados foram transformados para Log (UFC +2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância (CVxTC e TCxTH para cada isolamento)..... 97
- Figura 3.6 - Densidade média bacteriana de diferentes isolamentos de solo (1 – A; 2 – B; 3 – C) de plantas de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas para resistência a herbicida. Os dados foram transformados para Log (UFC+2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância (CVxTC e TCxTH para cada isolamento)..... 99
- Figura 3.7 - Densidade média bacteriana de diferentes comunidades (endófitos de raiz – A; rizosfera – B; solo – C) de plantas de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas para resistência a herbicida. Os dados foram transformados para Log (UFC+2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância (CV1xCV2xCV3; TC1xTC2xTC3 e TH1xTH2xTH3 para cada comunidade)..... 100

- Figura 3.8 - Distribuição dos 12 ribotipos nos tratamentos CV, TC e TH para os três isolamentos realizados (isolamento 1 - A; isolamento 2 - B e isolamento 3 - C) de bactérias endofíticas de colmo. O número de isolados pertencentes a cada ribotipo foi convertido para porcentagem considerando-se como total o número de isolados analisados para cada tratamento..... 104
- Figura 3.9 - Distribuição dos 12 ribotipos nos tratamentos CV, TC e TH para os três isolamentos realizados (isolamento 1 - A; isolamento 2 - B e isolamento 3 - C) de bactérias do solo. O número de isolados pertencentes a cada ribotipo foi convertido para porcentagem considerando-se como total o número de isolados analisados para cada tratamento..... 105
- Figura 3.10 - Dendrograma de similaridade entre os tratamentos para as comunidades de colmo (A-C) e solo (D-F). A similaridade entre os tratamentos para os isolamentos 1 (A e D), 2 (B e E) e 3 (C e F) foi baseada na presença e ausência dos 12 ribotipos. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o software NTSYSpc versão 2.1..... 107
- Figura 3.11 - Análise de PCR-DGGE em amostras de rizosfera de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas. Os perfis obtidos geraram uma análise de CCA qualitativa comparando os diferentes fatores que determinam a composição da comunidade bacteriana em todos os isolamentos realizados. Todas as variáveis ambientais utilizadas são apresentadas, porém as indicadas com * foram significantes ($p < 0.05$) utilizando o teste de permutação de MonteCarlo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos..... 108
- Figura 3.12 - Análise de PCR-DGGE em amostras de rizosfera de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas. Os perfis obtidos geraram uma análise de PCA qualitativa comparando os diferentes fatores que determinam a composição da comunidade bacteriana no primeiro (A), no segundo (B) e no terceiro isolamento (C). Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos..... 109

- Figura 4.1 - Colonização de *Methylobacterium* sobre superfície de raiz de cana-de-açúcar 2 dias após a inoculação. Observam-se as linhagens AR1.6/2 (A – 7320x), ARGFP (B – 11500x), SR1.6/6 (C - 7610x) e SRGFP (D – 22200x)..... 125
- Figura 4.2 - Colonização de *Methylobacterium* sobre superfície de raiz de cana-de-açúcar 6 dias após a inoculação. Observam-se as linhagens AR1.6/2 (A – 2980x), ARGFP (B – 4440x), SR1.6/6 (C - 4580x) e SRGFP (D – 8520x)..... 126
- Figura 4.3 - Densidade de *Methylobacterium extorquens* (AR1.6/2 e ARGFP) e *M. mesophilicum* (SR1.6/6 e SRGFP) após re-isolamento de plantas de cana-de-açúcar inoculadas. Os isolamentos foram realizados aos 2 dias (A), 10 dias (B) e 17 dias (C) após a inoculação. Foram amostradas as comunidades do rizoplane (em preto), endofíticas de raiz (em cinza escuro) e endofíticas da parte aérea (em cinza claro). Os dados foram transformados para Log (UFC+2)..... 130
- Figura 4.4 - Observação da colonização de *Methylobacterium extorquens* (A-C) e *M. mesophilicum* (D-F) em cana-de-açúcar após 2 dias da inoculação das linhagens no meio de cultivo *in vitro* da planta. A linhagem AR1.6/2 bem como a transformante ARGFP foram capazes de colonizar o rizoplane formando biofilmes (A e B). No entanto, foi observada ausência ou baixa fluorescência da linhagem transformada ARGFP (C). A linhagem SR1.6/6 também foi observada colonizando o rizoplane (D), mas o crescimento de SRGFP sobre a raiz não pode ser observado (E e F). Captura de imagem à luz visível (A,B,D e E) e captura de imagem sobre luz ultravioleta (C e F). Aumento de 400x..... 133

- Figura 4.5 - Observação da colonização de *Methylobacterium extorquens* (A-C) e *M. mesophilicum* (D-F) em cana-de-açúcar após 10 dias da inoculação das linhagens no meio de cultivo *in vitro* da planta. A linhagem AR1.6/2 crescendo sobre a superfície da parte aérea da planta (A). A transformante ARGFP colonizou o rizoplane (B), mas com baixa fluorescência (C). SR1.6/6 também foi observada colonizando o rizoplane (D) e o crescimento de SRGFP sobre a raiz foi em colônias pequenas (E) e com fluorescência restrita a algumas células (F). Captura de imagem à luz visível (A, B, D e E) e captura de imagem sobre luz ultravioleta (C e F). Aumento de 400x..... 134
- Figura 4.6 - Observação da colonização de *Methylobacterium extorquens* (A-C) e *M. mesophilicum* (D) em cana-de-açúcar após 17 dias da inoculação dos isolados bacterianos no meio de cultivo *in vitro* da planta. O isolado AR1.6/2 colonizou internamente a raiz de cana-de-açúcar (A). O transformante ARGFP colonizou o rizoplane (B) e apresentou baixa fluorescência (C). O isolado SR1.6/6 também foi observado colonizando tecidos internos da raiz (D). Captura de imagem à luz visível (A, B e D) e captura de imagem sobre luz ultravioleta (C). Aumento de 400x..... 135
- Figura 4.7 - Observação da colonização de *Methylobacterium extorquens* (A-C) e *Methylobacterium mesophilicum* (D) sobre palitos de madeira. Foi observado um grande crescimento de *M. extorquens* sobre a madeira após 1 dia (A), 3 dias (B) e 10 dias (C) da inoculação do isolado bacteriano no meio de cultivo *in vitro*. Já *M. mesophilicum* não cresceu sobre a madeira (D). Captura de imagem à luz visível. Aumento de 630x..... 137
- Figura 4.8 - Observação do crescimento e da manutenção da fluorescência de *Methylobacterium extorquens* sobre madeira após 1 dia (A e B), 3 dias (C e D) e 10 dias (E e F) de inoculação. Captura de imagem à luz visível (A, C e E) e captura de imagem sobre luz ultravioleta (B, D e F). Aumento de 400x..... 138
- Figura 4.9 - Observação do crescimento e da manutenção da fluorescência por *M. mesophilicum* após 10 dias do inóculo sobre madeira. Captura de imagem sobre luz ultravioleta. Aumento de 400(A) e 1000x (B)..... 139

- Figura 4.10 - Densidade de *Methylobacterium extorquens* (AR1.6/2 e ARGFP) e *M. mesophilicum* (SR1.6/6 e SRGFP) após re-isolamento de plantas de cana-de-açúcar inoculadas. Os isolamentos foram realizados aos 4 dias (A) e 10 dias após a inoculação. Foram amostradas as comunidades do rizoplane (em preto), endofíticas de raiz (em cinza escuro) e endofíticas da parte aérea (em cinza claro). Os dados foram transformados para Log (UFC+2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância..... 141
- Figura 4.11 - Observação da colonização de *Methylobacterium extorquens* (A-B) e *M. mesophilicum* (B-C) em cana-de-açúcar após 40 dias da inoculação dos isolados bacterianos em plantas de cana-de-açúcar. Pode se observar a manutenção da colonização. Captura de imagem à luz visível (A e C) e captura de imagem sobre luz ultravioleta (B e D). Aumento de 400x..... 142

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Importância das bactérias associadas às plantas

1.1.1.1 Bactérias rizosféricas

Os microrganismos presentes na rizosfera são de suma importância no desenvolvimento de processos de decomposição, mineralização, fixação de nitrogênio, desnitrificação, armazenamento e mobilização de nutrientes. Além disso, muitos desses microrganismos possuem a habilidade de solubilização de fosfato, convertendo o fosfato insolúvel em formas solúveis nos solos, tornando-o disponível para as plantas (KANG et al., 2002; PRADHAN; SUKLA, 2006; KHAN; ZAIDI; WANI, 2007).

A composição dos exsudatos das raízes das plantas é diferente quanto ao tipo de planta ou quanto ao estado fisiológico de uma mesma espécie e até mesmo entre cultivares (WHIPPS, 2001; RENGEL, 2002; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004). Uma vez que as bactérias da rizosfera utilizam-se desses exsudatos como nutrientes para seu desenvolvimento, essas diferenças em substratos das raízes podem explicar as diferenças que existem na composição da comunidade bacteriana que é específica para diferentes espécies de plantas cultivadas sob condições semelhantes (MARSCHNER; CROWLEY; LIEBEREI, 2001; KOWALCHUK; DE SOUZA; VAN VEEN, 2002; SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004).

Além disso, as características do solo também são determinantes da comunidade rizosférica, como pH, disponibilidade de nutrientes e retenção de umidade (YANG; CROWLEY, 2000; HERTENBERGER; ZAMPACH; BACHMANN, 2002). Dessa forma, tipos de solos diferentes possuem diferentes comunidades bacterianas independentemente da espécie de planta cultivada (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004; COSTA et al., 2006).

A rizosfera tem sido alvo de muitos estudos sobre a diversidade microbiana porque é um ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos que interagem diretamente com o solo e com as raízes das plantas. Conhecer a

composição de comunidade bacteriana da rizosfera é importante uma vez que as interações estabelecidas podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais (BUCHENAUER, 1998; ATKINSON; WATSON, 2000; SYLVIA; CHELLEMI, 2001).

Em relação à funcionalidade das bactérias da rizosfera, a promoção do crescimento vegetal é amplamente estudada (VESSEY, 2003). Esse grupo de bactérias é chamado de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal – PGPR (“plant growth promoting rhizobacteria”) (KLOEPPER; SCHROTH, 1978). A promoção do crescimento vegetal ocorre devido à produção de fitorreguladores como as auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno e pela disponibilização de nutrientes, como por exemplo, a fixação biológica do nitrogênio ou a solubilização de fosfatos, tornando esses nutrientes disponíveis para as plantas. A solubilização de fosfato insolúvel na rizosfera é o modo mais comum de ação envolvendo os microrganismos que promovem crescimento das plantas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999; RICHARDSON, 2001).

1.1.1.2 Bactérias endofíticas

Apesar da interação entre plantas e microrganismos ser relatada há muito tempo, com exceção da associação entre plantas e fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, acreditava-se que as interações levassem a formação de lesões nos tecidos vegetais. No entanto, muitos relatos demonstraram a presença de microrganismos no interior de tecidos vegetais assintomáticos, abrindo, desta forma, novas perspectivas para o estudo das interações plantas/microrganismos (AZEVEDO et al., 2000).

Endófitos são aqueles microrganismos que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais como folhas, ramos e raízes sem produzir estruturas externas visíveis (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Dessa forma, são excluídos desse grupo, por definição, os fungos micorrízicos, bactérias simbióticas nodulantes, microrganismos epifíticos e fitopatógenos. Esta comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias e, ao contrário dos microrganismos patogênicos, não causam prejuízos à planta hospedeira (NETO; AZEVEDO; ARAUJO, 2003).

Assim como a presença de bactérias na rizosfera, a presença e a permanência de bactérias endofíticas também são influenciadas por fatores bióticos e abióticos (SEGHERS et al., 2004). De maneira geral, a densidade de bactérias endofíticas é menor que aquela observada para bactérias de rizosfera e bactérias patogênicas (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2004). A presença de endófitos já foi constatada em inúmeras espécies vegetais de interesse econômico, entre elas citros (CHILDS; KOPP; JOHNSON, 1965; GLIENKE, 1995; ARAÚJO et al., 2001), beterraba açucareira (BUGBEE; COLE; NIELSEN, 1975; JACOBS; BUGBEE; GABRIELSON, 1985), algodão (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990), cana-de-açúcar (BODDEY et al., 1991; ROSENBLUETH et al., 2004), estilosantes (PEREIRA; AZEVEDO; PETRINI, 1993), banana (PEREIRA; VIEIRA; AZEVEDO, 1999), milho (ARAÚJO; SILVA; AZEVEDO, 2000), soja (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004), eucalipto (PROCÓPIO, 2004), trigo (PIRTTILA et al., 2005), arroz (SANDHIYA et al., 2005) e cacau (RUBINI et al., 2005).

Os poucos exemplos de plantas, aparentemente, livres de comunidades microbianas internas podem ser devido a dificuldades de isolamento e cultivo desses microrganismos (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006). O isolamento do microrganismo de tecidos com superfície previamente esterilizada e a visualização da bactéria nos tecidos internos do hospedeiro por microscopia são requerimentos para determinar se uma espécie é endofítica. Entretanto, esta visualização nem sempre é possível, visto que em alguns casos a densidade microbiana está abaixo do limite de observação. Por isso, o uso do termo “possível endófito” está sendo recomendado, bem como a avaliação da capacidade dessa bactéria de re-infectar plantas ou plântulas limpas (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006).

Com a finalidade de se verificar a localização e a forma de infecção destes microrganismos endofíticos em plantas hospedeiras, trabalhos foram desenvolvidos utilizando métodos citoquímicos e microscopia eletrônica, possibilitando melhor compreensão destes processos de colonização (RUPPEL et al., 1992). As bactérias endofíticas possuem, da mesma forma que fitopatógenos, a capacidade de penetrar na planta e colonizar sistemicamente o hospedeiro, podendo habitar o apoplasto (MAHAFFEE et al., 1997; QUADTHALLMANN; BENHAMOU; KLOEPFER, 1997),

vasos condutores (MAHAFFEE et al., 1997; HALLMANN et al., 1997) e ocasionalmente o meio intracelular (QUADTHALLMANN; KLOPPER, 1996; QUADTHALLMANN; HALLMANN; KLOPPER, 1997).

Com esta colonização sistêmica da planta, estas bactérias podem alterar as condições fisiológicas e morfológicas do hospedeiro, além de atuar sobre as populações de outros microrganismos presentes no interior da planta (ANDREOTE et al., 2004; ANDREOTE et al., 2006). De acordo com Misaghi e Donndelinger (1990), a íntima relação entre bactérias endofíticas e seus hospedeiros envolveu processos coevolutivos podendo, inclusive, influenciar mecanismos fisiológicos da planta. Genes da planta expressos na presença de endófitos fornecem pistas sobre os efeitos dos endófitos nas plantas. Análises moleculares sobre as respostas de defesa da planta na presença das bactérias podem elucidar como esse mecanismo limita o crescimento das populações bacterianas em tecidos internos (ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006).

Há vários efeitos positivos atribuídos às bactérias endofíticas, como a promoção do crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997; BENT; CHANWAY, 1998; SESSITSCH et al., 2002; INIGUEZ; DONG; TRIPLETT, 2004; TSAVKELOVA et al., 2007), fixação de N_2 e controle biológico de pragas e doenças (DÖBEREINER; BODDEY, 1981; HALLMANN et al., 1997; MPIGA et al., 1997; DOWNING; LESLIE; THOMSON, 2000; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001), indução de resistência sistêmica (HALLMANN et al., 1997; MADHAIYAN et al., 2004), produção de sideróforos (BURD; DIXON; GLICK, 1998), produção de antibióticos (STROBEL; DAISY, 2003) e ainda no uso dessas bactérias em plantas como fitoremediadores de áreas poluídas (BARAC et al., 2004; NEWMAN; REYNOLDS, 2005; BARZANTI et al., 2007).

No controle biológico, os microrganismos endofíticos são amplamente utilizados como antagonistas aos agentes causadores das doenças em plantas (AZEVEDO et al., 2000). O antagonismo pode se dar por competição por nutrientes, produção de substâncias nocivas aos patógenos ou indução de resistência sistêmica da planta hospedeira e tem o potencial de reduzir o consumo de agroquímicos. Em tomate, a aplicação da bactéria *Pseudomonas* sp. (linhagem PsJN) induziu resistência sistêmica

a *Verticillium dahliae*, mostrando que a colonização do endófito é capaz de ativar o sistema de defesa da planta, resultando na resistência ao patógeno (SHARMA; NOWAK, 1998; KAVINO et al., 2007).

1.1.2 O gênero *Methylobacterium* e sua importância como endófito

O gênero *Methylobacterium* é composto de uma variedade de bactérias de coloração rósea devido à síntese de carotenóides, sendo denominadas de PPFMs - *Pink-Pigmented Facultative Methylophiles* (VAN DIEN et al., 2003). A primeira linhagem descrita foi isolada por Bassalik em 1913 e foi denominada *Bacillus extorquens*. Este gênero pertence à subclasse α -2 de Proteobacteria e possui mais de 28 espécies descritas. Recentemente, *M. oryzae* foi descrita como uma nova espécie de *Methylobacterium* endofítica de arroz (MADHAIYAN et al., 2007). Os membros do gênero *Methylobacterium* ocupam os mais diferentes habitats, incluindo solo, água, superfícies de folha, nódulos, grãos de arroz, ar, sedimentos e ambientes tipicamente urbanos (VAN AKEN et al., 2004).

Essas bactérias podem crescer utilizando compostos de apenas um carbono (C1) como metanol e metilamina (TOYAMA; ANTHONY; LIDSTROM, 1998). Foi descrito que *M. pupulum* sp. nov isolado BJ001 é um endófito que está envolvido na degradação de compostos energéticos tais como 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), hexaidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (HMX) e hexaidro-1,3,5-triazina (RDX) (VAN AKEN; YOON; SCHNOOR, 2004).

As bactérias deste gênero interagem de forma simbiótica com diferentes espécies de plantas e estudos têm mostrado *Methylobacterium* como importante endófito, colonizando citros (ARAUJO et al., 2001; ARAUJO et al., 2002); pinus (PIRTTILA et al., 2000); soja (KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004); crotalária (SY et al., 2001), algodão (MADHAIYAN et al., 2006) entre outras plantas (CHANPRAME; TODD; WIDHOLM, 1996). Crescem ativamente em tecidos meristemáticos, formando populações entre 10^4 e 10^6 UFCs (DORONINA; IVANOVA; TROTSSENKO, 2002). Andreote et al. (2006) utilizaram *Catharanthus roseus* e *Nicotiana glauca* como plantas modelo para um estudo de interação entre *M. mesophilicum* e *X. fastidiosa*.

Nesse estudo, a maior densidade de *M. mesophilicum* foi observada em ramos ($6,5 \cdot 10^2$ UFC g⁻¹).

A presença do gene da nitrogenase (*NifH*) já foi descrita em espécies deste gênero (SY et al., 2001), sugerindo a possibilidade destes organismos fixarem N₂, suprimindo a planta hospedeira com fontes orgânicas de nitrogênio. Esta interação foi reforçada também pela presença de genes envolvidos com a nodulação de plantas (gene *nodA*) em linhagens de *Methylobacterium* (SY et al., 2001) e pela produção do fitohormônio citocina, sugerindo que este gênero pode apresentar uma importante função no crescimento vegetal.

No entanto, um maior número de estudos em *Methylobacterium* spp. é necessário para melhor aproveitá-las como promotoras de crescimento vegetal (MADHAIYAN et al., 2006). Um isolado de *M. extorquens* chamado ME4 foi testado e mostrou habilidade de promover crescimento em *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum*, *Sinapis alba* e *Fragaria vesca*, mas não apresentou ganho aparente quando em avaliação com outras 6 espécies vegetais (ABANDA-NKPWATT et al., 2006). Em outro estudo, *Methylobacterium* aumentou a germinação de sementes de cana-de-açúcar em 19,5% comparado com o controle e quando a inoculação foi feita combinada com *Rhizobium* sp., foi notado aumento do crescimento da planta e da nodulação comparado com as inoculações isoladas de *Methylobacterium* e *Rhizobium* (MADHAIYAN et al., 2005).

Lee et al. (2006) observaram que as citocininas sintetizadas por *Methylobacterium* sp. atuavam como um sinal molecular, estimulando as células do tecido vegetal a se dividirem. Desta forma, por meio da orientação química, há a desmetilação da pectina presente na parede celular das células vegetais e, conseqüentemente, ocorre a liberação do metanol. *Methylobacterium* spp. também é capaz de sintetizar pectinase e celulase, sugerindo que estas bactérias podem apresentar indução de resistência sistêmica na planta hospedeira (FERREIRA FILHO; ARAUJO; KUKLINSKY-SOBRA, 2001), fato este confirmado em estudos posteriores (MADHAIYAN ET AL., 2006).

A espécie *M. extorquens* também já foi estudada por meio da técnica de proteômica (GOURION; ROSSIGNOL; VORHOLT, 2006). Os autores identificaram

proteínas exclusivamente expressas por esta espécie quando colonizando a filosfera de plantas; foram encontradas 45 proteínas mais abundantes em células bacterianas em contato com as folhas do que naquelas crescendo em meio de cultivo. Essas proteínas estão relacionadas à resposta ao stress.

Araujo et al. (2002) verificaram que plantas de citros com sintomas de CVC apresentavam uma maior população de *Methylobacterium* em relação às plantas não infectadas com *Xylella fastidiosa*, sugerindo uma possível interação entre os microrganismos. Posteriormente, Lacava et al., (2004) confirmaram essa relação, devido ao favorecimento do crescimento de *X. fastidiosa in vitro* quando na presença do sobrenadante de *M. extorquens* no meio de cultura. Entretanto, o mesmo não foi observado quando se utilizou *M. mesophilicum*. Araújo et al. (2002) sugerem que *Methylobacterium* spp. seja um importante endófito de citros frente à ocorrência da CVC, contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos químicos, fisiológicos e ecológicos envolvidos nessas associações.

1.1.3 Estudo da diversidade microbiana

Os microrganismos compõem uma das maiores fontes de diversidade genética disponível entre os seres vivos, no entanto, esta diversidade ainda é pouco descrita e explorada (PROSSER et al., 2007). O número de grupos microbianos conhecidos e descritos representa uma pequena fração da diversidade encontrada na natureza (AZEVEDO, 1998). Por meio de estudos comparativos, foi estimado que apenas 0,1 a 1,0 % dos microrganismos são cultivados por meio do emprego de métodos microbiológicos convencionais (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

O desenvolvimento das técnicas de cultivo deve ser alvo de estudos, buscando uma melhor representatividade das comunidades bacterianas na forma de isolados e permitindo a exploração de funções ainda desconhecidas (HAMAKI et al., 2005). Modificações das condições de cultivo, como alteração da atmosfera, da disponibilidade de nutrientes e da suplementação de moléculas sinalizadoras pode resultar numa melhor acessibilidade da comunidade bacteriana do solo (STEVENSON et al., 2004).

A evolução da biologia molecular aplicada ao estudo do meio ambiente tem contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana. Foram desenvolvidas técnicas independentes de cultivo, baseadas no acesso e na análise dos ácidos nucléicos diretamente obtidos das amostras ambientais sem a necessidade de cultivo. Esses estudos independentes de isolamento, baseados em amplificação e seqüenciamento de fragmentos de genes demonstraram uma enorme diversidade de microrganismos em amostras ambientais (HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998). Esses métodos tendem a complementar os métodos dependentes de isolamento e cultivo na realização de levantamentos e comparações da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000).

O gene que codifica o RNA ribossômico é o mais utilizado para estudos taxonômicos e de variabilidade genética em bactérias por possuir múltiplas cópias que não codificam proteínas, por ser muito conservado e por estar presente em todos os organismos (GUARRO; GENE; STCHIGEL, 1999). A exploração das variações nas seqüências do gene 16S rRNA de diferentes espécies bacterianas em conjunto com a adoção de técnicas independentes de cultivo trouxe uma revolução para a ecologia de bactérias, aumentando consideravelmente o entendimento sobre a diversidade e a função das bactérias em um grande número de ambientes (ANDERSON; CAIRNEY, 2004). O seqüenciamento desse gene pode permitir a identificação de microrganismos ao nível de gênero e, possivelmente, ao nível de espécie, como também pode permitir correlações entre o genótipo e o ambiente estudado (CHENEY et al., 2000).

Utilizando técnicas independentes de cultivo, baseadas em seqüências do gene 16S rRNA, foram descritas as comunidades bacterianas de folhas de árvores da mata Atlântica, encontrando 400 filotipos bacterianos em cada espécie de árvore (LAMBAIS et al., 2006). Em outro estudo sobre a comunidade bacteriana do oceano, estimou-se entre 7 e 21 mil seqüências diferentes pertencentes a espécies ainda não exploradas (SOGIN et al., 2006).

As técnicas mais utilizadas são mapas de restrição, hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA, seqüências de subunidades do rRNA, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), RISA

(*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) e DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000).

1.1.3.1 Técnica dependente de cultivo - ARDRA

O ARDRA consiste na amplificação e posterior digestão de uma região do gene do rRNA com enzimas de restrição. Este método é baseado no princípio de que os sítios de restrição no rDNA são conservados de acordo com padrões filogenéticos. Desta forma, pode ser utilizado o 16S rRNA para o estudo de grupos heterogêneos ou a região espaçadora entre o 16S e o 23S rDNA para o estudo de grupos muito similares (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). A metodologia de ARDRA tem sido aplicada para o estudo da diversidade microbiana associada a vegetais ou a diferentes solos (OVREAS; TORSVIK, 1998; CHELIUS; TRIPLETT, 2001; LAGACE et al., 2004), análise da diversidade genética de bactérias degradadoras de pesticidas (DESAINT et al., 2000) e caracterização de bactérias diazotróficas (CRUZ et al., 2001), entre outras.

Tsukamoto et al. (2006) utilizaram com sucesso a técnica de ARDRA para identificar rapidamente bactérias marinhas bioluminescentes. Por meio da utilização de cinco enzimas de restrição (*EcoRI*, *DdeI*, *HhaI*, *HinfI*, *RsaI*) foram distinguidas 14 espécies pertencentes aos gêneros *Vibrio*, *Photobacterium* e *Shewanella*. Essa técnica foi avaliada como um meio simples e bastante seguro para identificação rápida de isolados e o posterior estudo da diversidade dos mesmos. De maneira similar, Wu et al. (2006) desenvolveram um método baseado em PCR-ARDRA para identificar importantes espécies do gênero *Bacillus*. Primeiramente, um par de primer grupo-específico foi desenhado para amplificar o gene 16S rRNA de *Bacillus* mesófilos, aeróbios e formadores de esporo. O PCR gerou um fragmento de 1114 pb e, posteriormente, digerindo esses fragmentos com a enzima de restrição *AluI* ou *TaqI*, foi possível diferenciar espécies de *Bacillus* de interesse.

Oliveira e Costa (2002) estudando a variabilidade genética de *Fusarium solani* conseguiram por meio de ARDRA, diferenciar *formae specialis* em soja e feijoeiro. Martins (2005) trabalhando com isolados de *Fusarium* observou uma grande variabilidade genética com a presença de 19 ribotipos em 83 isolados estudados.

Entretanto, nesse trabalho não foi possível diferenciar os isolados patogênicos dos endofíticos.

Com o objetivo de monitorar os efeitos causados por inundações com águas contaminadas por atividades humanas em terras cultiváveis da Itália, Gelsomino et al. (2006) utilizaram uma combinação de técnicas para a avaliação fisiológica (Biolog) e genética (ARDRA e DGGE) da microbiota do solo. Foi constatado que as terras sujeitas a inundações apresentavam uma comunidade bacteriana funcionalmente mais homogênea do que a comunidade da área controle. Esses dados gerados por Biolog foram confirmados por ARDRA. Por meio dos perfis genéticos, foi visto que a diversidade genética da comunidade de bactérias oxidadoras de amônio foi reduzida nas terras inundadas.

Os estudos de bactérias endofíticas têm sido concentrados em métodos baseados em isolamento em meio de cultura. No entanto, métodos para estudos desses microrganismos independentemente de cultivo vêm sendo realizados e são baseados nas análises de seqüências de DNA bacteriano obtido de tecidos vegetais (MIYAMOTO; KAWAHARA; MINAMISAWA, 2004). Conn e Franco (2004) estudaram endófitos de trigo e verificaram uma maior diversidade de actinobactérias quando utilizaram técnicas independentes de cultivo. Em outro trabalho sobre o gênero *Pseudomonas* e *Rahnella* em sementes, não foram observadas diferenças nos dados obtidos por métodos dependentes e independentes de cultivo (CANKAR et al., 2005).

1.1.3.2 Técnica independente de cultivo - DGGE

O DGGE é utilizado no estudo de populações microbianas complexas; identifica diferenças baseadas no comportamento desnaturante da dupla fita de DNA. O ambiente desnaturante é criado pela combinação uniforme da temperatura de corrida, variando de 50 a 65°C, e um gradiente linear de uréia e formamida (HEUER; SMALLA, 1997). Essa técnica tem recebido atenção por ter sido utilizado com sucesso em diferentes habitats naturais (MUYZER; DEWAAL; UITTERLINDEN, 1993; BRIM et al., 1999; EL FANTROUSSI et al., 1999; YANG; CROWLEY, 2000; TZENEVA et al., 2004); em comunidades complexas de bioreatores industriais (DAR; KUENEN; MUYZER, 2005), no estudo da comunidade microbiana associada a plantas

transgênicas (HEUER; SMALLA, 1999) e bactérias endofíticas (GARBEVA et al., 2001; ARAUJO et al., 2002; ANDREOTE et al., 2006).

A técnica de DGGE foi utilizada em um estudo sobre a comunidade de *Pseudomonas* spp. em milho orgânico (COSTA et al., 2006). Nesse trabalho, os autores concluíram que a combinação de técnicas dependentes de cultivo com o DGGE possibilitou uma melhor compreensão da comunidade bacteriana de interesse associada à rizosfera. Por meio de DGGE, não puderam ser detectadas diferenças entre as populações de *Pseudomonas* spp. de diferentes cultivares de milho nem de diferentes épocas de crescimento da planta. Wertz et al. (2006) utilizaram a técnica do DGGE para avaliar grupos específicos de solos degradados. Estudando bactérias desnitrificantes (gene *nirK*) e beta proteobactérias oxidadoras de amônia (região específica do gene 16S rRNA), os autores concluíram que os ciclos biogeoquímicos não são afetados pela queda da diversidade do solo desde que os grupos funcionais sejam mantidos.

Mais recentemente, os perfis de DGGE começaram a ser analisados por diferentes técnicas, que se iniciaram por comparação das curvas densitométricas e, posteriormente, por utilização dos dados gerados em análise multivariada. A principal vantagem dessas análises é a avaliação conjunta de vários fatores envolvidos na determinação da composição das comunidades bacterianas. Para a aplicação da técnica de análise multivariada em dados de PCR-DGGE, as imagens dos géis são normalizadas e convertidas em matrizes de presença/ausência de bandas, que passam a ser tratadas como espécies. Da mesma maneira, as intensidades relativas das bandas são consideradas a frequência de ocorrência destas espécies nas comunidades bacterianas a serem avaliadas (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004).

Os fatores determinantes da comunidade de bactérias de solo foram os primeiros a serem estudados utilizando esta estratégia (STEENWERTH; JACKSON; CALDERON, 2002). Posteriormente, a influência do histórico do solo e do cultivo de diferentes espécies de plantas na determinação da comunidade de *Burkholderia* spp. foi determinada por meio da utilização da análise multivariada (SALLES; VAN VEEN; VAN ELSAS, 2004). A seleção de componentes da população de *Pseudomonas* spp.

em rizosfera de plantas também foi estudada por análise multivariada (COSTA et al., 2006). Neste estudo os autores determinam o efeito rizosférico como determinante da composição da população de *Pseudomonas* spp.

1.1.4 Cana-de-açúcar e resistência ao herbicida Imazapyr

O gênero da *Saccharum* engloba 30 espécies e pertence à família Poaceae (EMBRAPA, 2005). Essa cultura possui grande importância no Brasil, sendo cultivada em vários tipos de ambientes com diversidade de clima e de solo (MAULE; MAZZA; MARTHA JR, 2001). No início, o cultivo de cana-de-açúcar destinava-se somente a produção de açúcar (SZMRECSÁNYI; MOREIRA, 1991). No entanto, a partir de 1970, houve o incentivo do governo federal para que as agroindústrias canavieiras dessem auxílio na crise energética emergente, frente à potencialidade da cana-de-açúcar como fonte de energia renovável (BARELA, 2005). Atualmente, há uma tendência de aumento de área de plantio dessa cultura, que é motivada pelo interesse crescente na obtenção do álcool combustível.

Um dos principais problemas no cultivo de cana-de-açúcar são as plantas daninhas. Essas plantas invasoras competem pelos recursos do meio, principalmente água, luz e nutrientes, liberam substâncias alelopáticas e atuam como hospedeiros de pragas, doenças e nematóides comuns à cultura interferindo na colheita (PITELLI, 1985). O controle de daninhas na cultura da cana-de-açúcar é feito por meio da aplicação de herbicidas, trazendo inúmeros prejuízos ao meio ambiente. Uma alternativa em relação ao controle químico tradicional das plantas daninhas na cultura de cana-de-açúcar é o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGM) para tolerância ou resistência aos herbicidas, reduzindo os custos e os danos trazidos pelos herbicidas comuns ou, ao menos, reduzindo o número de aplicações do produto.

Os herbicidas são classificados como pré ou pós-emergentes. Os herbicidas pré-emergentes são aplicados no solo antes das plantas emergirem e afetam a germinação das sementes ou as fases iniciais do desenvolvimento das plantas invasoras. O Imazapyr é um herbicida pré-emergente derivado das imidazolinonas, que inibe a enzima acetohidroxiácido sintase (AHAS), também conhecida como acetolactato sintase (ALS), importante para a biossíntese dos aminoácidos de cadeia

ramificada isoleucina, leucina e valina (SHANER; ANDERSON; STIDHAM, 1984; TAN et al., 2005). A enzima *AHAS* é conservada e está presente em bactérias, fungos e plantas, sendo localizada nas mitocôndrias dos fungos e nos cloroplastos das plantas (PANG; DUGGLEBY, 1999). É sugerido que o sítio de ligação dos herbicidas derivados de imidazolinonas está relacionado com a subunidade catalítica (maior) da enzima *AHAS* e que mutações nesta subunidade têm gerado organismos resistentes ao mesmo (CHANG; DUGGLEBY, 1998). As mutações que conferem resistência às imidazolinonas estão relacionadas a substituições de aminoácidos nas posições Ala122, Pro197, Ala205, Trp574 e Ser653, sendo a alteração Ser653 a única que não induz tolerância cruzada a outros inibidores de *AHAS* (TAN et al., 2005).

As imidazolinonas incluem os compostos imazapyr, imazapic, imazethapyr, imazamox, imazamethabenz e imazaquin (TAN et al., 2005). Há outros quatro grupos que inibem a enzima *AHAS*: sulfonilureas, triazolepirimidinas, pirimidiniltiobenzoatos e sulfonilamino-carboniltriázolinonas (MALLORY-SMITH; RETZINGER, 2003). Em estudos sobre a mobilidade de imidazolinonas no solo e sua disponibilidade para plantas e microrganismos, Wehtje et al. (1987) constataram que a adsorção do herbicida foi menor em solo argiloso e maior em solo arenoso, sendo que diminuições no conteúdo de água e pH do solo favorecem a adsorção do herbicida. Além da rápida absorção e translocação para raízes e rizomas, o herbicida Imazapyr apresenta vantagem em relação a outros herbicidas ou métodos de controle devido a sua atividade residual no solo, o que promove o controle da emergência de plantas daninhas e de novas plantas oriundas de rizomas ou bulbos (BEARDMORE et al., 1991). A persistência de Imazapyr no solo depende da dose aplicada, das condições pluviais da região, do pH, da textura, da umidade e do tipo de argila (ISMAIL; AHMAD, 1994).

As plantas de cana-de-açúcar transgênicas para a resistência ao herbicida Imazapyr (IMI 01 e IMI 4) carregam uma construção plasmidial que possui um variante do gene *ahas* de trigo (alterado na posição 653 com a substituição de uma serina por uma asparagina) e um promotor da ubiquinona da cana-de-açúcar (Sabrina Moutinho Chabregas, informação verbal). A presença do plasmídio com o gene de resistência de trigo permite a cana-de-açúcar sobreviver na presença do herbicida Imazapyr.

1.1.5 Efeitos de plantas geneticamente modificadas (PGM) sobre os microrganismos

O ambiente associado às plantas e aos microrganismos presentes nas mesmas é dinâmico. Diversos fatores, tais como variações sazonais, tipos de tecido vegetal (MOCALI et al., 2003), cultivares e espécies de hospedeiro, tipo de solo (DALMASTRI et al., 1999; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004); interação com microrganismos benéficos ou patogênicos (ARAUJO et al., 2001; ARAUJO et al., 2002) entre outros, afetam a estrutura e a composição da comunidade bacteriana das plantas. Os estudos da interação de rizóbios com leguminosas demonstram a importância do genótipo na interação planta-microrganismos (SMITH; GOODMAN, 1999).

Mais recentemente, a introdução de espécies vegetais geneticamente modificadas foi somada ao conjunto desses fatores (DUNFIELD; GERMIDA, 2004). O avanço da engenharia genética possibilitou o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas (PGM) para diversas características de interesse como tolerância a herbicidas, resistência a insetos e doenças e tolerância a estresses abióticos (ZHANG; SONG; TAN, 2006). A área plantada comercialmente com PGMs está aumentando rapidamente, portanto é importante que se estude o impacto dessa nova tecnologia sobre o ambiente, especialmente quando se considera o impacto dessas plantas sobre a complexa comunidade microbiana do solo e associada à planta (LIU et al., 2005).

Um dos fatores que afeta a diversidade dos microrganismos da rizosfera das diferentes espécies de plantas é o exsudado da raiz (BRIMECOMBE; LEIJ; LYNCH, 2001). Dessa forma, a transgenia poderia causar alteração no equilíbrio microbiano devido à alteração química dos exsudados das raízes ou por meio de efeitos diretos dos produtos destes transgenes. Os resultados da literatura mostram que a interação entre a comunidade microbiana e PGMs pode ser influenciada pelo tipo de transgene que foi introduzido na planta, visto que a expressão deste e de outros genes associados é que deve afetar os microrganismos (DUNFIELD; GERMIDA, 2004).

Foi observado que plantas de batata geneticamente modificadas, expressando o gene responsável por um dos passos da síntese de amido (*gbss*), apresentam uma diferente população de bactérias do gênero *Pseudomonas* na rizosfera (MILLING et al., 2004). Wei et al. (2006) estudaram plantas de mamão contendo uma replicase

mutante do vírus PRSV. Foram constatadas diferenças na densidade bacteriana dos solos de cultivo de plantas transgênicas e convencionais. Além disso, foram constatadas diferenças também na funcionalidade dessas populações: maior densidade de microrganismos resistentes a canamicina e um aumento de microrganismos produtores de oxidases, lipases, celulasas entre outras enzimas.

A comunidade bacteriana da filosfera de plantas de batata alteradas geneticamente com a introdução do gene da síntese de lisozima foi avaliada (HEUER; SMALLA, 1999). Esta enzima atua sobre bactérias, tornando a PGM mais resistente a patógenos. Os autores observaram um aumento da colonização da planta por bactéria do grupo de *Erwinia* e uma redução de *Agrobacterium* e de bactérias gram-positivas. Heuer et al. (2002) avaliaram, por meio de métodos dependentes (FAME, BIOLOG) e independentes (DGGE-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) de cultivo, a comunidade bacteriana da rizosfera em diferentes períodos de desenvolvimento de plantas de batata com o gene da lisozima. Os autores observaram que fatores ambientais como ano, solo e estação, alteram mais a comunidade microbiana da rizosfera do que a expressão do gene da lisozima nas PGMs. Mais recentemente, Rasche et al. (2006) concluíram que os efeitos de local de cultivo e de estágio de desenvolvimento vegetal afetaram mais fortemente a comunidade bacteriana da parte aérea (brotos) de batata transgênica com o gene da lisozima do que a transgenia da planta.

Em contraste, foram observadas diferenças quando o gene de *Phanerochaete chrysosporium*, que codifica uma lignina peroxidase, foi introduzido em alfafa (*Medicago sativa* L.) (AUSTIN et al., 1995). Os resultados revelaram consistentes diferenças entre as bactérias da rizosfera da planta transgênica e da planta parental. Ainda outros fatores como maior densidade de bactérias cultiváveis, de aeróbios, de formadores de esporos e de bactérias degradadoras de celulose, diferenças no pH do solo e menor atividade de desidrogenase e fosfatase alcalina foram associados à alfafa transgênica (DONEGAN et al., 1999). Tatli, Gullu e Ozdemir (2004) observaram, em um estudo realizado ao longo de dois anos, que plantas de milho transgênicas (Bt) possuíam uma diversidade de espécies de fungos, associados às raízes, menor que a apresentada por plantas convencionais. Entretanto, os mesmos autores também

observaram que a taxa de infecção pelo fungo fitopatogênico *Fusarium moniliforme* (*Gibberella moniliformis*) foi maior em plantas convencionais que em plantas transgênicas, indicando uma alteração nas relações entre patógenos, hospedeiros e simbiossiontes.

Utilizando plantas de canola (*Brassica napus* cv. Quest) geneticamente modificadas com o gene de resistência ao glifosato, Siciliano et al. (1998) verificaram que o cultivar transgênico apresenta uma comunidade bacteriana endofítica e da rizosfera diferente daquelas observadas nos cultivares não transgênicos, nas mesmas condições, mas as implicações dessa alteração sobre o desenvolvimento da planta não foram avaliadas. Posteriormente, Siciliano e Germida (1999) avaliaram a comunidade bacteriana endofítica da rizosfera dos cultivares Quest (geneticamente alterado), Excel (cultivar não transgênico que deu origem ao cultivar Quest) e Parkland (não transgênico) de *Brassica rapa*. Os autores observaram uma maior similaridade entre a comunidade bacteriana associada aos cultivares Excel e Parkland do que entre os cultivares Excel e Quest, mostrando que a presença do gene de resistência ao glifosato pode alterar a interação de canola com a microbiota endofítica e da rizosfera.

Fang et al. (2005) estudaram a comunidade bacteriana da rizosfera de plantas de milho (*Zea mays*) resistente a insetos (gene Bt de *Bacillus thuringiensis*) e glifosato (*Roundup Ready*). Os autores detectaram diferenças na diversidade bacteriana somente quando foram comparadas as texturas do solo. As plantas transgênicas e não-transgênicas não acarretaram diferenças na diversidade bacteriana da rizosfera. Em trabalho mais recente, Mulder et al. (2006) demonstraram que os efeitos de milho transgênico para resistência a insetos foram transientes. Foi possível detectar a influência da planta transgênica sobre a composição da comunidade microbiana nas 72 primeiras horas. No entanto, em uma avaliação posterior (três semanas) as diferenças na comunidade bacteriana de plantas transgênicas e não transgênicas não puderam mais ser detectadas. Efeitos temporários de PGMs sobre a comunidade microbiana foram observados por outros autores (DUNFIELD; GERMIDA, 2003; HEUER et al., 2002; SMALLA et al., 2001), inclusive os efeitos sobre a comunidade microbiana do solo (WU; YE; MIN, 2004).

Os efeitos do cultivo de morangueiros transgênicos expressando um gene de quitinase de arroz sobre outras plantas e sobre a microbiota do solo foi avaliado (ASAO; ARAI; NISHIZAWA, 2003). De acordo com os resultados obtidos não houve diferença entre as plantas transgênicas e as não-transgênicas. O efeito do transgene sobre a comunidade bacteriana é muitas vezes difícil de ser isolado, o que dificulta a análise de seu impacto. Para isso a manutenção das condições ambientais de forma rigorosa auxilia o estudo do efeito do transgene sobre a comunidade bacteriana.

Dessa forma, apesar de alguns estudos sugerirem que plantas transgênicas têm um menor efeito na comunidade microbiana do que se havia previsto, que os efeitos não são duradouros ou ainda que só ocorreriam em determinada fase de desenvolvimento da planta, essa perspectiva deve aguardar verificação por novos experimentos. Devido aos conhecimentos limitados que se possui sobre a relação da estrutura da comunidade microbiana e a sua função, mais trabalhos precisam ser realizados, caso-a-caso, para avaliar os efeitos das PGMs (LIU et al., 2005).

1.2 Hipóteses

Os estudos sobre os efeitos de PGMs sobre as comunidades microbianas não são conclusivos. Dependendo da planta, do transgene inserido ou da comunidade microbiana analisada, entre outros fatores, os efeitos das PGMs podem ser mensurados ou não, muitas vezes são transientes ou ainda menores que os efeitos causados por variações do ambiente como o tipo de solo. No entanto, em outros casos, é possível detectar efeito das plantas transgênicas sobre a comunidade associada, não somente na densidade como na diversidade e funcionalidade bacteriana. Portanto, é suposto que os estudos sobre plantas transgênicas e seus efeitos sobre as comunidades microbianas devem ser analisados em cada construção em particular sem extrapolação dos dados. Dessa maneira, a cana-de-açúcar transgênica poderia induzir alterações na comunidade bacteriana associada.

A cana-de-açúcar é uma planta de extrema importância para o país devido ao fato de ser fonte de energia renovável e de sua área de plantio está crescendo. *Methylobacterium* é um importante endófito encontrado em diversas plantas de

interesse econômico. A presença do gene da nitrogenase (*NifH*), de genes envolvidos com a nodulação de plantas (gene *nodA*) e a produção do fitohormônio citocina sugerem que este gênero pode apresentar uma importante função no crescimento vegetal como fixadora de nitrogênio e promotora de crescimento vegetal. Essas características benéficas poderiam ser exploradas em associação com a cultura de cana-de-açúcar.

1.3 Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da cana-de-açúcar transgênica sobre a comunidade bacteriana associada e estudar a interação entre *Methylobacterium* em cana-de-açúcar.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- a) Avaliar os efeitos da cana-de-açúcar transgênica resistente a insetos e a herbicida sobre a comunidade bacteriana associada;
- b) Avaliar se o suposto efeito causado pela cana-de-açúcar transgênica resistente a herbicida deriva diretamente do transgene ou dos tratos culturais diferenciados aos quais a planta transgênica é submetida;
- c) Avaliar a interação entre *Methylobacterium* spp. e cana-de-açúcar.

Referências

ABANDA-NKPWATT, D.; MUSCH, M.; TSCHIERSCHE, J.; BOETTNER, M.; SCHWAB, W. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 15, p. 4025-4032, 2006.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 769-779, 2004.

ANDREOTE, F. D.; GULLO, M. J. M.; LIMA, A. O. D.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Impact of genetically modified *Enterobacter cloacae* on indigenous endophytic community of *Citrus sinensis* seedlings. **The Journal of Microbiology**, Seoul, v. 42, n. 3, p. 169-173, 2004.

ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; GAI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI, W.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D.; AZEVEDO, J. L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 52, n. 5, p. 419-426, 2006.

ARAÚJO, J. M. D.; SILVA, A. C. D.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea Mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, p. 447-451, 2000.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI, 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, n. 3, p. 229-236, 2001.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, 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**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

ASAO, H.; ARAI, S.; NISHIZAWA, Y. Environmental risk evaluation of transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. **Seibutsu-Kogaku Kaishi**, Osaka, v. 81, n. 2, p. 57-63, 2003.

ATKINSON, D.; WATSON, C. A. The beneficial rhizosphere: a dynamic entity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n. 10, p. 99-104, 2000.

AUSTIN, S.; BINGHAM, E. T.; MATHEWS, D. E.; SHAHAN, M. N.; WILL, J.; BURGESS, R. R. Production and field performance of transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L) Expressing alpha-amylase and manganese-dependent lignin peroxidase. **Euphytica**, Wageningen, v. 85, n. 1/3, p. 381-393, 1995.

AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Ed.) **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-Meio Ambiente, 1998. cap.18, p.445-461.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Ration: CRC Press, 2007. Chap. 6, p. 189-207.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.

BARAC, T.; TAGHAVI, S.; BORREMANS, B.; PROVOOST, A.; OEYEN, L.; COLPAERT, J. V.; VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 22, n. 5, p. 583-588, 2004.

BARELA, J. F. **Seletividade de herbicidas para a cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) afetada pela interação com nematicidas aplicados no plantio**. 2005. 82p.

Dissertação (Mestrado na área de Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BARZANTI, R.; OZINO, F.; BAZZICALUPO, M.; GABBRIELLI, R.; GALARDI, F.; GONNELLI, C.; MENGONI, A. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. **Microbial Ecology**, New York, v. 53, n. 2, p. 306-316, 2007.

BEARDMORE, R. A.; HART, R.; IVERSON, R.; RISLEY, M. A.; TIMMER, M. Imazapyr herbicide. In: SHANER, D. L.; ÓCONNOR, S. L. (Ed.). **The imidazolinone herbicides**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 211-227.

BENT, E.; CHANWAY, C. P. The growth-promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 10, p. 980-988, 1998.

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DOBEREINER, J. Biological nitrogen-fixation associated with sugar-cane. **Plant and Soil**, The Hague, v. 137, n. 1, p. 111-117, 1991.

BRIM, H.; HEUER, H.; KROGERRECKLENFORT, E.; MERGEAY, M.; SMALLA, K. Characterization of the bacterial community of a zinc-polluted soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, n. 4, p. 326-338, 1999.

BRIMECOMBE, M.J.; LEIJ, F. A.; LYNCH, J.M. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations, In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. (ED.). **The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**. New York: Marcel-Dekker, 2001. p. 95-140.

BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Stuttgart, v. 105, n. 4, p. 329-348, 1998.

BUGBEE, W. M.; COLE, D. F.; NIELSEN, G. Microflora and invert sugars in juice from healthy tissue of stored sugarbeets. **Applied Microbiology**, Washington, v. 29, p. 780-781, 1975.

BURD, G. I.; DIXON, D. G.; GLICK, B. R. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 10, p. 3663-3668, 1998.

CANKAR, K.; KRAIGHER, H.; RAVNIKAR, M.; RUPNIK, M. Bacterial endophytes from seeds of *Norway spruce* (*Picea abies* L. Karst). **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 244, n. 2, p. 341-345, 2005.

CHANG, A. K.; DUGGLEBY, R. G. Herbicide-resistant forms of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase: characterization of the catalytic properties and sensitivity to inhibitors of four defined mutants. **Biochemical Journal**, London, v. 333, p. 765-777, 1998.

CHANPRAME, S.; TODD, J. J.; WIDHOLM, J. M. Prevention of pink-pigmented methylotrophic bacteria (*Methylobacterium mesophilicum*) contamination of plant tissue cultures. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 16, n. 3/4, p. 222-225, 1996.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

CHENEBY, D.; PHILIPPOT, L.; HARTMANN, A.; HENAULT, C.; GERMON, J. C. 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 121-128, 2000.

CHILDS, J. F. L.; KOPP, L. E.; JOHNSON, R. E. A species of *Physoderma* present in *Citrus* and related species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 55, n. 6, p. 681-688, 1965.

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**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1787-1794, 2004.

COSTA, R.; GOMES, N. C. M.; PEIXOTO, R. S.; RUMJANEK, N.; BERG, G.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; SMALLA, K. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 38, n. 8, p. 2434-2447, 2006.

COSTA, R.; SALLES, J. F.; BERG, G.; SMALLA, K. Cultivation-independent analysis of *Pseudomonas* species in soil and in the rhizosphere of field-grown *Verticillium dahliae* host plants. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 12, p. 2136-2149, 2006.

CRUZ, L. M.; DE SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. D. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.

DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONO, S. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root-associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbial Ecology**, New York, v. 38, 273-284, 1999.

DAR, S. A.; KUENEN, J. G.; MUYZER, G. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 5, p. 2325-2330, 2005.

DESAINT, S.; HARTMANN, A.; PAREKH, N. R.; FOURNIER, J. C. Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 34, n. 2, p. 173-180, 2000.

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: Aust.Acad.Sci., 1981. p. 305-312.

DONEGAN, K. K.; SEIDLER, R. J.; DOYLE, J. D.; PORTEOUS, L. A.; DIGIOVANNI, G.; WIDMER, F.; WATRUD, L. S. A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant *Sinorhizobium meliloti*: effects on the soil ecosystem. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 920-936, 1999.

DORONINA, N. V.; IVANOVA, E. G.; TROTSSENKO, Y. A. new evidence for the ability of methylobacteria and methanotrophs to synthesize auxins. **Microbiology**, New York, v. 71, n. 1, p. 116-118, 2002.

DOWNING, K. J.; LESLIE, G.; THOMSON, J. A. 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**, Washington, v. 66, n. 7, p. 2804-2810, 2000.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7310-7318, 2003.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, n. 3, p. 806-815, 2004.

EL FANTROUSSI, S.; VERSCHUERE, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 3, p. 982-988, 1999.

EMBRAPA. **Agroecologia da cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://www.cana.cnpm.embrapa.br/agroeco.html>>. Acesso em: 02 jan. 2005.

FANG, M.; KREMER, R. J.; MOTAVALLI, P. P.; DAVIS, G. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 4132-4136, 2005.

FERREIRA FILHO, A.S.; ARAÚJO, W.L.; KULINSKY- SOBRAL, J. Bactéria endofítica *Methylobacterium* spp. e interação com a planta hospedeira. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, Piracicaba. **Resumos...** São Paulo: USP, 2001.

GARBEVA, P.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN VUURDE, J. W. L.; VAN ELSAS, J. D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 4, p. 369-383, 2001.

GELSOMINO, A.; BADALUCCO, L.; AMBROSOLI, R.; CRECCHIO, C.; PUGLISI, E.; MELI, S. M. Changes in chemical and biological soil properties as induced by anthropogenic disturbance: a case study of an agricultural soil under recurrent flooding by wastewaters. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 38, n. 8, p. 2069-2080, 2006.

GLIENKE, C. **Variabilidade genética no fungo endófito *Guignardia citricarpa* Kiely detectada por RAPD**. 1995. 115 p. Dissertação (Mestrado na área de Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

GOURION, B.; ROSSIGNOL, M.; VORHOLT, J. A. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 35, p. 13186-13191, 2006.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

HALLMANN, J.; QUADTHALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HAMAKI, T.; SUZUKI, M.; FUDOU, R.; JOJIMA, Y.; KAJIURA, T.; TABUCHI, A.; SEN, K.; SHIBAI, H. Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 99, n. 5, p. 485-492, 2005.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, n. 1, p. 1-21, 1998.

HERTENBERGER, G.; ZAMPACH, P.; BACHMANN, G. Plant species affect the concentration of free sugars and free amino acids in different types of soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Weinheim, v. 165, n. 5, p. 557-565, 2002.

HEUER, H.; KROPPESTEDT, R. M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1325-1335, 2002.

HEUER, H.; SMALLA, K. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 49-61, 1997.

HEUER, H.; SMALLA, K. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-producing transgenic variants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 357-371, 1999.

INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; TRIPLETT, E. W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 10, p. 1078-1085, 2004.

ISMAIL, B. S.; AHMAD, A. R. Attenuation of the herbicidal activities of glufosinate-ammonium and imazapyr in 2 soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 47, n. 4, p. 279-285, 1994.

JACOBS, M. J.; BUGBEE, W. M.; GABRIELSON, D. A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar-beet roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, n. 7, p. 1262-1265, 1985.

KANG, S. C.; HA, C. G.; LEE, T. G.; MAHESHWARI, D. K. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a soil-inhabiting fungus *Fomitopsis* sp PS 102. **Current Science**, Columbus, v. 82, n. 4, p. 439-442, 2002.

KAVINO, M.; HARISH, S.; KUMAR, N.; SARAVANAKUMAR, D.; DAMODARAN, T.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; SAMIYAPPAN, R. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 39, n. 5, p. 1087-1098, 2007.

- KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 27, n. 1, p. 29-43, 2007.
- KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. **Proceedings of the IVth International Conference on Plant Pathogenic Bacteria**, Angers, v. 2, p. 879-882, 1978.
- KOWALCHUK, G. A.; DE SOUZA, F. A.; VAN VEEN, J. A. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 3, p. 571-581, 2002.
- 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, n. 12, p. 1244-1251, 2004.
- LACAVA, P. T.; ARAUJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J. L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 55-59, 2004.
- LAGACE, L.; PITRE, M.; JACQUES, M.; ROY, D. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 4, p. 2052-2060, 2004.
- LAMBAIS, M. R.; CROWLEY, D. E.; CURY, J. C.; BULL, R. C.; RODRIGUES, R. R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest. **Science**, Washington, v. 312, n. 5782, p. 1917-1917, 2006.
- LEE, H. S.; MADHAIYAN, M.; KIM, C. W.; CHOI, S. J.; CHUNG, K. Y.; SA, T. M. Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N₂-fixing methylo-trophic isolates. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 42, n. 5, p. 402-408, 2006.
- LIU, B.; ZENG, Q.; YAN, F. M.; XU, H. G.; XU, C. R. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 271, n. 1-2, p. 1-13, 2005.
- MADHAIYAN, M.; KIM, B. Y.; POONGUZHALI, S.; KWON, S. W.; SONG, M. H.; RYU, J. H.; GO, S. J.; KOO, B. S.; SA, T. M. *Methylobacterium oryzae* sp nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylo-trophic, 1-aminocyclopropane-L-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 326-331, 2007.
- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, H. S.; HARI, K.; SUNDARAM, S. P.; SA, T. M. Pink-pigmented facultative methylo-trophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 41, n. 5, p. 350-358, 2005.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, M.; SESHADRI, S.; CHUNG, H. Y.; YANG, J. C.; SUNDARAM, S.; SA T. M. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 45, n. 4, p. 315-324, 2004.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S. P.; SA, T. A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Environmental and Experimental Botany**, New York, v. 57, n. 1/2, p. 168-176, 2006.

MADHAIYAN, M.; REDDY, B. V. S.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S. P.; SA, T. M. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n. 4, p. 270-276, 2006.

MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W.; VAN VUURDE, J. W. L.; VAN DER WOLF, J. M.; VAN DEN BRINK, M. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strain 89b-27 and *Enterobacter asburiae* strain JM22. In: RYDER, M.H.; STEPHENS, P.M.; BOWEN, G.D. **Improving plant productivity in rhizosphere bacteria**. Melbourne: CSIRO, Melbourne, 1997. p. 180.

MALLORY-SMITH, C. A.; RETZINGER, E. J. Revised classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies. **Weed Technology**, Champaign, v. 17, n. 3, p. 605-617, 2003.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D. E.; LIEBEREI, R. Arbuscular mycorrhizal infection changes the bacterial 16 S rDNA community composition in the rhizosphere of maize. **Mycorrhiza**, New York, v. 11, n. 6, p. 297-302, 2001.

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira**. 2005. 143p. Tese (Doutorado na área de Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA, JR G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, p. 295-301, 2001.

MILLING, A.; SMALLA, K.; MAIDL, F. X.; SCHLOTER, M.; MUNCH, J. C. Effects of transgenic potatoes with an altered starch composition on the diversity of soil and rhizosphere bacteria and fungi. **Plant and Soil**, The Hague, v. 266, n. 1/2, p. 23-39, 2004.

MISAGHI, I. J.; DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 80, n. 9, p. 808-811, 1990.

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**, Washington, v. 70, n. 11, p. 6580-6586, 2004.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, n. 2, p. 105-114, 2003.

MPIGA, P.; BELANGER, R. R.; PAULITZ, T. C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 50, n. 5, p. 301-320, 1997.

MULDER, C.; WOUTERSE, M.; RAUBUCH, M.; ROELOFS, W.; RUTGERS, M. Can transgenic maize affect soil microbial communities? **Plos Computational Biology**, San Francisco, v. 2, n. 9, p. 1165-1172, 2006.

MUYZER, G.; DEWAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16s ribosomal-RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 62-76, 2003.

NEWMAN, L. A.; REYNOLDS, C. M. Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 6-8, 2005.

OLIVEIRA, V. C. D.; COSTA, J. L. S. D. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* de *F. solani* f. sp. *glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 631-634, 2002.

OVREAS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, n. 3, p. 303-315, 1998.

PANG, S. S.; DUGGLEBY, R. G. Expression, purification, characterization, and reconstitution of the large-and small subunits of yeast acetohydroxyacid synthase. **Biochemistry**, New York, v. 38, n. 16, p. 5222-5231, 1999.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes* - a 1st Report. **Mycologia**, New York, v. 85, n. 3, p. 362-364, 1993.

PEREIRA, J. O.; VIEIRA, M. L. C.; AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 43-46, 1999.

PIRTTILA, A. M.; LAUKKANEN, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 7, p. 3073-3077, 2000.

PIRTTILA, A. M.; POSPIECH, H.; LAUKKANEN, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Seasonal variations in location and population structure of endophytes in buds of Scots pine. **Tree Physiology**, Victoria, v. 25, n. 3, p. 289-297, 2005.

PITELLI, R. A. Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 129, p. 16-127, 1985.

PRADHAN, N.; SUKLA, L. B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 5, n. 10, p. 850-854, 2006.

PROCÓPIO, R.E.L. **Diversidade bacteriana endofítica de *Eucaliptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 101 p. Tese (Doutorado na área de Biotecnologia) - Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/ Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2004.

PROSSER, J. I.; BOHANNAN, B. J. M.; CURTIS, T. P.; ELLIS, R. J.; FIRESTONE, M. K.; FRECKLETON, R. P.; GREEN, J. L.; GREEN, L. E.; KILLHAM, K.; LENNON, J. J.; OSBORN, A. M.; SOLAN, M.; VAN DER GAST, C. J.; YOUNG, J. P. Essay - The role of ecological theory in microbial ecology. **Nature Reviews Microbiology**, New York, v. 5, n. 5, p. 384-392, 2007.

QUADTHALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 6, p. 577-582, 1997.

QUADTHALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n.3, p. 254-259, 1997.

QUADTHALLMANN, A.; KLOEPPER, J. W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 42, n. 11, p. 1144-1154, 1996.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, n. 3, p. 167-177, 2000.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M. H.; VAN ELSAS, J. D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 219-235, 2006.

RENGEL, Z. Genetic control of root exudation. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, n. 1, p. 59-70, 2002.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Sidney, v. 28, n. 9, p. 897-906, 2001.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, New York, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 181, n. 5, p. 337-344, 2004.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ, L.; SILVA, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, n. 1, p. 27-35, 2004.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 1, n. 1, p. 24-33, 2005.

RUPPEL, S.; HECHTBUCHHOLZ, 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**, The Hague, v. 145, n. 2, p. 261-273, 1992.

SALLES, J. F.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Multivariate analyses of *Burkholderia species* in soil: effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 7, p. 4012-4020, 2004.

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, n. 9, p. 802-807, 2005.

SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E. M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S. D. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1475-1482, 2004.

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J. G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in *Rhizobium* research. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 21, n. 4, p. 323-378, 2002.

SHANER, D. L.; ANDERSON, P. C.; STIDHAM, M. A. Imidazolinones potent Inhibitors of acetohydroxyacid synthase. **American Society of Plants Biologists**, v. 76, n. 2, p. 545-546, 1984.

SHARMA, V. K.; NOWAK, J. Enhancement of *Verticillium* wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 6, p. 528-536, 1998.

SICILIANO, S. D.; GERMIDA, J. J. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 263-272, 1999.

SICILIANO, S. D.; THEORET, C. M.; DE FREITAS, J. R.; HUCL, P. J.; GERMIDA, J. J. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 9, p. 844-851, 1998.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 4742-4751, 2001.

SMITH, K. P.; GOODMAN, R. M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 473-491, 1999.

SOGIN, M. L.; MORRISON, H. G.; HUBER, J. A.; WELCH, D. M.; HUSE, S. M.; NEAL, P. R.; ARRIETA, J. M.; HERNDL, G. J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 103, n. 32, p. 12115-12120, 2006.

STEENWERTH, K. L.; JACKSON, L. E.; CALDERON, F. J.; STROMBERG, M. R.; SCOW, K. M. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. **Soil, Biology and Biochemistry**, New York, v. 34, n. 11, p. 1599-1611, 2002.

STEVENSON, B. S.; EICHORST, S. A.; WERTZ, J. T.; SCHMIDT, T. M.; BREZNAK, J. A. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4748-4755, 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SY, A.; GIRAUD, E.; SAMBA, R.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. Certain legumes of the genus *Crotalaria* are specifically nodulated by a new species of *Methylobacterium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 6, p. 503-508, 2001.

SYLVIA, D. M.; CHELLEMI, D. O. Interactions among root inhabiting fungi and their implications for biological control of root pathogens. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 73, p. 1-33, 2001.

SZMRECSÁNYI, T.; MOREIRA, E. P. O desenvolvimento da agroindústria canavieira do Brasil desde a Segunda Guerra Mundial. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 5, p. 57-79, 1991.

TAN, S.; EVANS, R. R.; DAHMER, M. L.; SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Imidazolinone tolerant crops: history, current status and future. **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, n. 3, p. 246-257, 2005.

TATLI, F.; GULLU, M.; OZDEMIR, F. Determination of fungi species, relationship between ear infection rates and fumonisin quantities in Bt maize. **IOBC WPRS BULLETIN**, Athens, v. 27, n. 3, p. 161-164, 2004.

TOYAMA, H.; ANTHONY, C.; LIDSTROM, M. E. Construction of insertion and deletion *mx* mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 166, n. 1, p. 1-7, 1998.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. I. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. **Microbiological Research**, Jena, v. 162, n. 1, p. 69-76, 2007.

TSUKAMOTO, K. K.; YAO, K.; KAMIYA, A.; YOSHIZAWA, S.; UCHIYAMA, N.; KOGURE, K.; WADA, M. Rapid identification of marine bioluminescent bacteria by amplified 16S ribosomal RNA gene restriction analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 256, p. 298-303, 2006.

TZENEVA, V. A.; LI, Y.; FELSKE, A. D. M.; DE VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D. L.; VAUGHAN, E. E.; SMIDT, H. Development and application of a selective PCR Denaturing Gradient Gel Electrophoresis approach to detect a recently cultivated *Bacillus* group predominant in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 10, p. 5801-5809, 2004.

VAN AKEN, B.; PERES, C. M.; DOTY, S. L.; YOON, J. M.; SCHNOOR, J. L. *Methylobacterium populi* sp nov., a novel aerobic, pink pigmented, facultatively methylotrophic, methane utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1191-1196, 2004.

VAN AKEN, B.; YOON, J. M.; SCHNOOR, J. L. Biodegradation of nitro substituted explosives 2,4,6-trinitrotoluene, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine, and octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5-tetrazocine by a phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. associated with poplar tissues (*Populus deltoides* x *nigra* DN34). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 508-517, 2004.

VAN DIEN, S. J.; MARX, C. J.; O'BRIEN, B. N.; LIDSTROM, M. E. Genetic characterization of the carotenoid biosynthetic pathway in *Methylobacterium extorquens* AM1 and isolation of a colorless mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7563-7566, 2003.

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**, v. 91, n. 2/3, p. 127-141, 2001.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

WEHTJE, G.; DICKENS, R.; WILCUT, J. W.; HAJEK, B. F. Sorption and mobility of sulfometuron and imazapyr in 5 Alabama soils. **Weed Science**, Champaign, v. 35, n. 6, p. 858-864, 1987.

WEI, X. D.; ZOU, H. L.; CHU, L. M.; LIAO, B.; YE, C. M.; LAN, C. Y. Field released transgenic papaya effect on soil microbial communities and enzyme activities. **Journal of Environmental Sciences-China**, Beijing, v. 18, n. 4, p. 734-740, 2006.

WERTZ, S.; DEGRANGE, V.; PROSSER, J. I.; POLY, F.; COMMEAUX, C.; FREITAG, T.; GUILLAUMAUD, N.; LE ROUX, X. Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 8, n. 12, p. 2162-2169, 2006.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 487-511, 2001.

WU, W. X.; YE, Q. F.; MIN, H. Effect of straws from Bt transgenic rice on selected biological activities in water-flooded soil. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 40, n. 1, p. 15-22, 2004.

WU, X. Y.; WALKER, M. J.; HORNITZKY, M.; CHIN, J. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 107-119, 2006.

YANG, C.-H.; CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 1, p. 345-351, 2000.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, London, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

EFEITO DA CANA-DE-AÇÚCAR TRANSGÊNICA SOBRE
A COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA

2 EFEITO DA CANA-DE-AÇÚCAR TRANSGÊNICA SOBRE A COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA

Resumo

Com a introdução das plantas geneticamente modificadas (PGM), pode ser aventada a hipótese de que os produtos dos genes nelas introduzidos sejam deixados no solo, afetando a comunidade microbiana do mesmo. A evolução das metodologias de biologia molecular aplicadas aos estudos do meio ambiente tem contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito das PGMs sobre a comunidade bacteriana associada a elas, isolando e caracterizando a microbiota por meio de ARDRA e seqüenciamento. Para a análise, dois experimentos independentes foram realizados. O experimento 1 foi montado para a avaliação dos efeitos da introdução de cana-de-açúcar transgênica para resistência a insetos e o experimento 2, para resistência ao herbicida Imazapyr. Por meio de isolamento de bactérias epifíticas de folha, endofíticas de raiz, de rizoplane e de solo, a densidade bacteriana média por tratamento foi analisada. Dessa maneira, não foi possível constatar diferenças relacionadas à introdução das plantas transgênicas nos dois experimentos, dado que estão de acordo com trabalhos da literatura. Analisando somente os tratamentos controles de ambos os experimentos, foi possível avaliar o efeito de diferentes tratamentos culturais a que foram submetidos os experimentos. Dessa forma, foi notada uma densidade bacteriana maior no solo do experimento que recebeu cortes anuais (experimento 2). Pode-se concluir que diferenças em trato cultural ou manejo de plantas, decorrentes ou não da transgenia, podem influenciar a comunidade bacteriana. Uma diferença significativa entre as densidades bacterianas foi observada somente entre as comunidades avaliadas. Por meio de ARDRA, foram determinados 17 ribotipos e foi possível observar distribuição diferenciada dos ribotipos com a introdução de plantas transgênicas. Esses ribotipos diferentemente distribuídos poderiam resultar em alterações na atividade bacteriana dessas plantas, uma vez que esses ribotipos podem representar grupos funcionais importantes. A diferença na distribuição dos ribotipos pode ser notada também quanto ao evento de transformação, sendo que os ribotipos 11 (*Microbacterium* sp. e *Curtobacterium* sp.) e 13 (*Methylobacterium* sp. e *Pseudomonas* sp.) apresentaram sua presença determinada pelo evento de transgenia nos dois experimentos. Uma maior diversidade de ribotipos foi observada nas plantas do experimento 2 (com cortes anuais) evidenciando como o trato cultural pode alterar a diversidade bacteriana. Dessa forma, este trabalho mostra a importância de estudos focados nos efeitos da introdução de plantas transgênicas caso-a-caso. Muitos fatores ambientais e de conduta no campo, além do tipo de planta e de transgene inserido afetam a interação microrganismos-planta.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar transgênica; Diversidade bacteriana; ARDRA

2 EFFECT OF TRANSGENIC SUGARCANE ON ASSOCIATED BACTERIAL COMMUNITY

Abstract

With the introduction of genetically-modified plants (GMP), it can be suggested the hypothesis that the gene products introduced into them are left in the soil, affecting its microbiota. The evolution of methodology of molecular biology applied to environment studies has, in a great deal, contributed to a great advance of knowledge on the microbial diversity. Thus, this work aimed to assess the GMPs effect on the microbial community associated to them, isolating and characterizing the microbiota by means of ARDRA and sequencing. Two independent experiments were made for the analysis. Experiment 1 was made for the assessment of transgenic sugarcane introduction effects regarding resistance to insects and Experiment 2, for resistance to the herbicide Imazapyr. Medium bacterial density was analyzed by means of soil, rizoplane, endophytic of root, and leaf epiphytic bacteria isolation. By doing this, it was not possible to find out differences related to transgenic plants introduction, since they are in agreement with literature work. When treatment controls were analyzed for both experiments, it was possible to assess the effect of different culture usages to which the experiments were submitted. Thus, a higher bacterial density was observed in the experiment soil which underwent to annual cuttings (experiment 2). It can be concluded that plants handling or cultural treatment decurrent or not from transgenia can influence bacteria density. A significant difference between bacteria density was observed only among the assessed communities. By means of ARDRA, 17 ribotypes were determined and it was possible to observe distinguished ribotypes distribution with the introduction of transgenic plants. Those ribotypes which were differently distributed could result in changes to the bacteria activity of these plants once these ribotypes can represent important functional groups. Ribotypes distribution differences can be also noticed in relation to the transformation event, seeing that the ribotypes 11 (*Microbacterium* sp. and *Curtobacterium* sp.) and 13 (*Methylobacterium* sp. and *Pseudomonas* sp.) presented their appearance determined by transgenic event in both experiments. A higher ribotype diversity was observed in experiment 2 (with annual cuttings) showing evidence in how cultural treatment can change the bacterial diversity. Thus, this study shows the importance of studies focused on transgenic plants introduction effects case by case. Many environmental and behavioral factors in field, besides the type of plant, and the inserted transgene affect the microorganisms-plant interaction.

Keywords: Transgenic sugarcane; Bacterial diversity; ARDRA

2.1 Introdução

Diversos fatores, tais como variações sazonais, tipos de tecido vegetal (MOCALI et al., 2003), cultivares e espécies de hospedeiro, tipo de solo (DALMASTRI et al., 1999; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004), interação com microrganismos benéficos ou patógenos (ARAUJO et al., 2001; ARAUJO et al., 2002) entre outros, afetam a estrutura e a composição da comunidade bacteriana das plantas. Mais recentemente, a introdução de espécies vegetais geneticamente modificadas foi somada ao conjunto desses fatores (DUNFIELD; GERMIDA, 2004). Dessa forma, devido ao grande número de fatores que afetam a interação planta-microrganismos, são necessários estudos focados nos efeitos da introdução de plantas transgênicas realizados caso-a-caso (LIU et al., 2005). Além dos fatores ambientais, a conduta no campo (BRIMECOMBE; LEIJ; LYNCH, 2001) e o tipo do transgene inserido (DUNFIELD; GERMIDA, 2004) podem afetar a interação da planta com sua comunidade microbiana.

Alguns estudos mostraram o efeito de plantas geneticamente modificadas (PGM) sobre a densidade de comunidades bacterianas associadas, resultando na alteração de sua função. Wei et al. (2006) estudaram plantas de mamão contendo uma replicase mutante do vírus PRSV e constataram diferenças na densidade bacteriana dos solos de cultivo de plantas transgênicas e convencionais. Além disso, foram observadas variações também na funcionalidade dessas populações, visto que verificaram uma maior densidade de microrganismos resistentes a canamicina e um aumento de microrganismos produtores de oxidases, lipases, celulasas entre outras enzimas.

Entretanto, em outros trabalhos, conclui-se que outros fatores ambientais como tipo de solo podem afetar a comunidade bacteriana mais fortemente do que a transgenia. Fang et al. (2005) estudaram a comunidade bacteriana da rizosfera de plantas de milho (*Zea mays*) resistente a insetos (gene *Bt* de *Bacillus thuringiensis*) e glifosato (*Roundup Ready*). Os autores detectaram diferenças na diversidade bacteriana somente quando compararam a textura do solo. As plantas transgênicas e não-transgênicas não induziram diferenças na diversidade bacteriana da rizosfera. Em

trabalho mais recente, Rasche et al. (2006) concluíram que os efeitos de local de cultivo e de estágio de desenvolvimento vegetal afetaram mais fortemente a comunidade bacteriana da parte aérea (brotos) de batata transgênica com o gene da lisozima do que a transgenia da planta.

Dessa forma, alguns estudos sugerem que plantas transgênicas tenham um menor efeito na comunidade microbiana do que se havia previsto ou que os efeitos são apenas transientes. Mulder et al. (2006) demonstraram que os efeitos de milho transgênico para resistência a insetos foram temporários, visto que foi possível detectar a influência da planta transgênica sobre a composição da comunidade microbiana nas 72 primeiras horas. No entanto, em uma avaliação posterior, as diferenças não puderam mais ser detectadas. Efeitos temporários também foram observados por outros autores (DUNFIELD; GERMIDA, 2003; HEUER et al., 2002), inclusive os efeitos sobre a comunidade microbiana do solo (WU; YE; MIN, 2004).

A evolução da biologia molecular aplicada ao estudo do meio ambiente tem contribuído significativamente para um grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana e podem ser eficientes na avaliação das possíveis alterações acarretadas pela introdução de plantas transgênicas sobre a comunidade microbiana cultivada e não cultivada. Esses métodos tendem a complementar os métodos baseados em isolamento e cultivo na realização de levantamentos e comparações da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da cana-de-açúcar transgênica sobre a comunidade bacteriana associada por meio de isolamento e análise da diversidade bacteriana por meio de ARDRA e seqüenciamento.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Material vegetal e área de cultivo

Nesse estudo, a variedade comercial convencional (não transgênica) de cana-de-açúcar SP80 1842 foi utilizada como controle, bem como as suas isolinhas para a avaliação dos efeitos de plantas geneticamente modificadas sobre a comunidade

bacteriana. Dois tipos de plantas transgênicas foram utilizados: plantas resistentes a pragas e plantas resistentes ao herbicida Imazapyr.

A cana-de-açúcar resistente ao ataque de pragas expressa o gene *cryIA*, o qual codifica a proteína delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis*. Estão presentes na construção, mas não expressando, o gene da beta-lactamase (resistência a ampicilina), o gene *nptII* (resistência ao antibiótico canamicina) e o gene da beta-galactosidase (*lacZ*). Esse tipo de planta foi chamado de plantas SPT e nesse estudo, foram analisados dois eventos de transformação chamados de SPT 7 e SPT 99.

A cana-de-açúcar transgênica para resistência a herbicida possui um variante do gene *ahas* de trigo. Alterações nesse gene conferem resistência da planta a herbicidas da família das imidazolinonas (imazapyr, imazapic, imazethapyr, imazamox, imazamethabenz e imazaquin) (TAN et al., 2005). No experimento utilizado para esse estudo, o herbicida aplicado pós-plantio foi o Imazapyr. Essas plantas foram chamadas de plantas IMI e nesse estudo foram analisados dois eventos de transformação chamados de IMI 1 e IMI 4.

Todas as plantas foram gentilmente cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, Piracicaba, SP), bem como a área experimental, cujo solo é do tipo médio arenoso (pH 4,5; 2,5 mmol dm⁻³ de potássio; 8 mg dm⁻³ de fósforo total).

2.2.2 Delineamento experimental

Dois experimentos foram analisados para a avaliação do efeito de cana-de-açúcar geneticamente modificada sobre a microbiota bacteriana.

Experimento 1 - com cana-de-açúcar transgênica para resistência a insetos. Foram utilizados três tratamentos: *i*) plantas convencionais SP80 1842 como controle, chamadas de CONV; *ii*) plantas transgênicas para resistência a inseto chamadas SPT 7 e *iii*) plantas transgênicas para resistência a insetos, mas de outro evento de transformação, chamadas de SPT 99. Esse experimento permaneceu no campo sem corte durante os três anos de cultivo. O efeito da introdução de plantas transgênicas foi avaliado comparando plantas SPT com CONV e o efeito dos diferentes eventos de transgenia foi avaliado na comparação entre as plantas SPT 7 com SPT 99.

Experimento 2 – com cana-de-açúcar transgênica para resistência a herbicida. Foram utilizados três tratamentos: *i*) plantas convencionais SP80 1842 como controle, chamadas de CONV*; *ii*) plantas transgênicas para resistência a herbicida chamadas IMI 1 e *iii*) plantas transgênicas para resistência a herbicida, mas de outro evento de transformação chamadas de IMI 4. As plantas desse experimento receberam cortes anuais, de forma que as plantas amostradas foram resultantes da segunda rebrota. O efeito da introdução de plantas transgênicas foi avaliado comparando plantas IMI com CONV* e o efeito dos diferentes eventos de transgenia, comparando as plantas IMI 1 com IMI 4.

Ambos os experimentos foram realizados em uma mesma área experimental da CTC, dispostos em blocos inteiramente casualizados, com 3 repetições para cada tratamento (tipo de planta). A amostragem de uma planta por parcela foi realizada três anos após o plantio. Para a análise dos dados de isolamento microbiano, a densidade foi calculada e analisada com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

2.2.3 Isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar

2.2.3.1 Isolamento de bactérias epifíticas de folha e do rizoplano

As folhas foram lavadas em água corrente, e fragmentos de 5x4 cm² foram cortados. Seis desses fragmentos foram colocados sob agitação de 150 rpm em frascos com 50 mL de tampão PBS (140mM de NaCl, 3mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄ e 2mM de KH₂PO₄, pH 7,4) e esferas de vidro (0,2 cm de diâmetro). Após a obtenção da suspensão de microrganismos epifíticos, foram feitas diluições em PBS e alíquotas de 100 µL foram semeadas sobre meio TSB 5 % (Merck) suplementado com benomyl (50µg mL⁻¹) e incubado a 28°C por 8 a 14 dias. Posteriormente, foi feita a conversão dos dados de número de colônias para unidades formadoras de colônia (UFC) cm⁻², considerando as faces superiores e inferiores dos fragmentos de folhas utilizados.

Para a obtenção de colônias do rizoplano, as raízes foram retiradas das plantas e agitadas vigorosamente para que o excesso de solo fosse retirado. Foram lavadas

em água corrente e cinco gramas desse material foram agitados por 1 hora a 150 rpm e 28°C em frasco contendo 100 mL de tampão PBS e esferas de vidro. A suspensão obtida foi diluída apropriadamente e semeada em meio TSB 5 % suplementado com benomyl ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubado a 28°C por 8 a 14 dias. Os dados de número de colônias obtidos foram convertidos a UFC por superfície de um grama de raiz.

2.2.3.2 Isolamento de bactérias endofíticas de colmo e raiz

Os colmos amostrados foram lavados e cortados em fragmentos de 5 cm e as extremidades cobertas com parafina derretida, afim de se proteger os tecidos internos durante o processo de desinfecção superficial. Para isso, os fragmentos da planta foram tratados por 1 min em etanol 70 %, 3 min em hipoclorito de sódio 2%, 30 seg em etanol 70 %, seguido de dois banhos em água destilada. Essa última água de lavagem foi semeada sobre meio TSB 5% suplementado com benomyl ($50\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubado a 28°C por 8 a 14 dias com a finalidade de se avaliar a eficácia do processo de desinfecção superficial. A casca e as pontas do colmo foram retiradas, e o cerne cortado em palitos e, então, cortado em fragmentos finos. Esses fragmentos pequenos foram pesados e triturados em 2 mL de tampão PBS. A suspensão foi diluída apropriadamente e 100 μL foram semeados em meio TSB 5% e após crescimento bacteriano, a densidade bacteriana em UFC por um grama de colmo foi determinada.

As mesmas raízes utilizadas para o isolamento de rizoplano foram utilizadas para o isolamento de bactérias endofíticas. As raízes foram desinfetadas superficialmente em uma série de etanol 70% (1 min), hipoclorito 2% (3 min) e etanol 70% (30 seg), seguido de duas lavagens em água destilada. Um grama do material foi cortado em pequenos pedaços e triturado em tampão PBS. Essa suspensão obtida foi diluída apropriadamente e semeada sobre meio TSB 5% suplementado com benomyl ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e incubado a 28°C por 8 a 14 dias. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi transformado em Log (UFC+2) e submetido ao teste de Tukey a 5% de significância.

2.2.4 Avaliação da diversidade bacteriana associada à cana-de-açúcar

2.2.4.1 Extração de DNA genômico total bacteriano

Os isolados foram crescidos em 4 mL de meio TSB a 28°C por 48 h. Ao precipitado obtido pela centrifugação dessa suspensão foram adicionados 700 µL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl, pH = 8), 30 µL de SDS 10% e 0,5 g de sílica (0,1 mm de diâmetro). Em seguida, a suspensão foi agitada no Homogeneizador de Células (Ação Científica, Piracicaba, SP) por 30 seg a 5000 bpm e centrifugada por 10 min a 9000 g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o DNA purificado pelo método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989).

2.2.4.2 Amplificação do 16S rDNA

Para a amplificação do 16S rDNA foram utilizados os primers R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'). As reações foram realizadas em um volume de 50 µL, contendo 3,75 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de cada primer, 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X e 1 µL de DNA molde (0,5 a 10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94 °C; 1 min a 62,5 °C; 1 min a 72 °C, e uma extensão final de 7 min a 72°C. O fragmento de DNA amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,0% a 3 volts cm⁻¹, juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder para a observação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg/mL) e fotodocumentado.

2.2.4.3 Caracterização de isolados por ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*)

A variabilidade genética das bactérias associadas à cana-de-açúcar foi analisada por meio da técnica do ARDRA. Para isso, 1 µg do produto amplificado foi digerido com 2U da enzima de restrição *Alu I* (Pharmacia Biotech) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de digestão foram separados em gel de agarose

a 2,5% a 5 volts cm^{-1} . O tamanho do produto amplificado foi estimado pela comparação com um marcador molecular de 100 pb (Fermentas). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1mg mL^{-1}) e fotodocumentado.

Para a discussão e apresentação dos dados, o número de isolados dentro de cada ribotipo foi dividido pelo número total de isolados analisados resultando em uma frequência relativa (dados em porcentagem), o que facilita a comparação e a observação dos dados.

2.2.4.4 Análise de similaridade e construção de dendrogramas

A similaridade entre os perfis de restrição foi analisada por meio da presença ou ausência de bandas após digestão pela enzima e a similaridade entre os tratamentos foi analisada por meio da presença ou ausência dos ribotipos dentro da população. Para as análises, foi utilizado o coeficiente de similaridade SM (*Simple Matching*), sendo a matriz de similaridade construída por meio do método de UPGMA (*Unweighted Pair-Group Arithmetic Average*). O programa utilizado foi o NTSYSpc (*Numerical Taxonomy System for personal computers*) versão 2.1 (ROHLF, 2000). Os valores de *bootstrap* foram calculados por meio do programa *Winboot bootstrapping for binary data* (YAP, 1986).

2.2.4.5 Seqüenciamento e identificação do 16S rDNA

Os fragmentos amplificados foram purificados com o Kit GFX PCR (Amersham Pharmacia Biotech) e enviados para o Instituto Biológico, São Paulo - SP, onde foram seqüenciados pelo laboratório do Dr. Ricardo Harakava. Para a identificação das seqüências, foi feita uma comparação com seqüências depositadas no GenBank por meio do BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), que utiliza o método heurístico para encontrar o melhor score de alinhamentos locais entre a seqüência submetida e o banco de dados. Dessa forma, foram consideradas as seqüências que apresentaram os mais altos valores de similaridade.

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Avaliação da densidade bacteriana associada à cana-de-açúcar transgênica

Por meio das técnicas descritas acima, foi possível o isolamento de bactérias epifíticas de folha, endofíticas de raiz, do rizoplane e de solo associadas a plantas de cana-de-açúcar nos dois experimentos analisados.

Os números obtidos por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em placas de cultivo foram transformados em Log (UFC+2) e plotados distribuídos por tratamento (dentro de cada comunidade amostrada) para cada experimento (Figura 2.1 – experimento 1; Figura 2.2 – experimento 2). Os dados foram submetidos ao teste de Tukey a 5% de significância.

Por meio da densidade bacteriana média por tratamento, não foi possível constatar diferenças relacionadas à introdução das plantas transgênicas no experimento para análise de PGMs para resistência a insetos (Figura 2.1), bem como no experimento para análise de PGMs para resistência a herbicida (Figura 2.2). A mesma conclusão foi possível analisando os diferentes eventos de transformação. Não foram observadas diferenças significativas de densidade bacteriana entre os tratamentos SPT 7 e SPT 99 (Figura 2.1) e entre IMI 1 e IMI 4 (Figura 2.2), mostrando que os diferentes eventos de transgenia não afetam diferentemente a densidade bacteriana.

Assim como no presente trabalho, outros autores também observaram que a introdução de plantas transgênicas não afeta a densidade bacteriana. Mulder et al. (2006) estudaram os efeitos de milho transgênico para resistência a insetos e verificaram que, após 3 semanas, diferenças na comunidade bacteriana de plantas transgênicas e não transgênicas não puderam mais ser detectadas. No entanto, diferenças na densidade bacteriana devido à introdução de plantas transgênicas puderam ser observadas em um estudo sobre os efeitos de alfafa geneticamente modificada com o gene que codifica lignina peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium*, no qual Donegan et al. (1999) puderam observar uma maior densidade de bactérias nas plantas transgênicas, bem como variações na densidade de grupos funcionais como bactérias degradadoras de celulose.

Figura 2.1 - Densidade bacteriana de epifíticos de folha (A), de endofíticos de raiz (B), de rizoplano (C) e de solo de cana-de-açúcar convencional (CONV) e transgênica para resistência a pragas (SPT 7 e SPT 99). Os dados foram transformados para Log (UFC+2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância, o qual foi realizado separadamente para cada comunidade amostrada (epifíticos de folha, endofíticos de raiz, rizoplano e solo)

Figura 2.2 - Densidade bacteriana de epifíticos de folha (A), de endofíticos de raiz (B), de rizoplano (C) e de solo de cana-de-açúcar convencional (CONV*) e transgênica para resistência a herbicida (IMI 1 e IMI 4). Os dados foram transformados para Log (UFC+2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância, o qual foi realizado separadamente para cada comunidade amostrada (epifíticos de folha, endofíticos de raiz, rizoplano e solo)

A análise comparativa dos tratamentos CONV (experimento 1 – sem corte) e CONV* (experimento 2 – com cortes anuais) mostrou diferença na densidade bacteriana do solo de plantas não cortadas em relação ao solo de cultivo das plantas cortadas anualmente, no qual a densidade bacteriana foi 84% maior (Figura 2.3), mostrando que a alteração desse manejo altera a quantidade de bactérias associadas à cana-de-açúcar. Para as demais comunidades amostradas (epifíticos de folha, endofíticos de raiz e rizoplano), as diferenças entre as densidades bacterianas não foram estatisticamente diferentes (Figura 2.3).

Fang et al. (2005) não observaram diferenças na comunidade bacteriana associada à rizosfera de plantas transgênicas e não-transgênicas de milho (*Zea mays*), resistentes a insetos (gene *Bt* de *Bacillus thuringiensis*) e glifosato (*Roundup Ready*). No entanto, diferenças foram detectadas quando a comunidade bacteriana da rizosfera de plantas foi comparada quanto à textura do solo. Dessa forma, foi possível concluir que diferenças no trato cultural ou manejo de plantas, decorrentes ou não da transgenia, podem influenciar a comunidade bacteriana.

Figura 2.3 - Densidade bacteriana de diferentes comunidades associadas a plantas de cana-de-açúcar convencionais sem corte (CONV) e com cortes anuais (CONV*). Os dados foram transformados para Log (UFC+2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey, a 5% de significância, realizado separadamente para cada comunidade amostrada (epifíticos de folha, endofíticos de raiz, rizoplano e solo)

Widmer et al. (2006) analisaram os efeitos a longo prazo de diferentes tipos de fertilizantes, bem como de outras práticas do manejo associadas a cada tipo de fertilização como, por exemplo, a não adição de produtos para controle químico de doenças e de pragas em plantas de sistema orgânico. Foram utilizadas diferentes técnicas pelos autores e em todas foi possível detectar o efeito das mesmas na comunidade microbiana do solo. A introdução de plantas geneticamente modificadas também pode acarretar alterações no manejo tradicional que era dado àquela cultura; essas alterações devem ser consideradas nos estudos de impacto das plantas transgênicas.

Trabalhos anteriores sobre efeito de plantas transgênicas sobre a comunidade bacteriana associada também concluíram que outros fatores podem afetar a comunidade bacteriana de forma mais intensa que a transgenia da planta. Heuer et al. (2002) avaliaram a comunidade bacteriana da rizosfera em diferentes períodos de desenvolvimento de plantas de batata com o gene da lisozima e observaram que fatores ambientais como ano, solo e estação, alteraram mais a comunidade microbiana da rizosfera do que a expressão do gene da lisozima nas PGMs.

Em outros trabalhos, diferenças entre plantas convencionais e transgênicas podem ser observadas, mas são menores quando comparadas com as alterações causadas por fatores ambientais. Devare, Jones e Thies (2004), estudando milho transgênico com o gene *cry3Bb* (proteína com atividade inseticida), não observaram diferenças nas comunidades microbianas do solo comparando plantas transgênicas e plantas convencionais. Os efeitos observados foram atribuídos pelos autores aos diferentes anos de cultivo.

Gyamfi et al. (2002), estudando plantas de canola (*Brassica napus*) transgênicas para resistência a glifosato, observaram alterações na população de *Pseudomonas* na rizosfera de plantas transgênicas, mas essas alterações foram menores do que as diferenças observadas decorrentes dos diferentes estágios de desenvolvimento. Rasche et al. (2006) concluíram que os efeitos de local de cultivo e de estágio de desenvolvimento vegetal afetaram mais a comunidade bacteriana da parte aérea (brotos) de batata transgênica com o gene da lisozima do que a transgenia da planta.

A comunidade de bactérias epifíticas de folha apresentou uma densidade média de 10^2 UFC cm^{-2} , enquanto a comunidade endofítica de raiz foi de 10^5 UFC g^{-1} . Não foi observada diferença significativa entre as comunidades de rizoplane e do solo, as quais foram de 10^6 UFC g^{-1} . Os diferentes tipos de tecido vegetal é um dos muitos fatores que podem afetar a interação plantas – microrganismos (MOCALI et al., 2003).

2.3.2 Avaliação da diversidade bacteriana associada à cana-de-açúcar transgênica

A comunidade bacteriana associada à cana-de-açúcar foi avaliada por meio de ARDRA e seqüenciamento. A caracterização dos isolados por ARDRA facilita a identificação e o estudo das populações de bactérias, pois é rápida, de baixo custo e reproduzível. Com essa técnica, é possível avaliar um grande número de bactérias (VENTURA et al., 2001).

Por meio da análise de 168 isolados (20% das bactérias amostradas), foram obtidos 17 ribotipos evidenciando grande variabilidade genética entre os isolados associados à cana-de-açúcar (Tabela 2.1).

Por meio da amplificação e do sequenciamento do gene 16S rRNA e comparação via BLASTn, a comunidade bacteriana associada à cana-de-açúcar é constituída pelos gêneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Nocardiopsis*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* (Tabela 2.2).

Tabela 2.1 - Número de ribotipos diferentes encontrados em cada tratamento para cada comunidade amostrada. Os ribotipos foram gerados por ARDRA com a utilização da enzima *AluI*

	Número de ribotipos diferentes observados				Número total de isolados analisados
	Epifíticos	Raiz	Rizoplano	Solo	
Conv	3	5	5	5	31
Spt 7	2	3	5	2	17
Spt 99	3	4	5	5	31
Conv*	3	6	2	3	33
IMI 1	4	5	5	3	32
IMI 4	4	5	5	8	24

Tabela 2.2 - Gêneros bacterianos, identificados por seqüenciamento do gene 16S rRNA, relacionados com o ribotipo a que pertencem. As seqüências foram analisadas no GenBank via Blastn e a seqüência de maior similaridade foi considerada para a identificação

Identificação	Ribotipo relacionado
<i>Bacillus, Pantoea, Rhodococcus</i>	1
<i>Methylobacterium</i>	5
<i>Rhizobium,</i>	7
<i>Burkholderia, Bacillus, Rhizobium</i>	8
<i>Bacillus</i>	9
<i>Burkholderia</i>	10
<i>Microbacterium, Curtobacterium</i>	11
<i>Agrobacterium</i>	12
<i>Methylobacterium, Pseudomonas</i>	13
<i>Streptomyces</i>	14
<i>Nocardiopsis</i>	16

No experimento 1 (Figura 2.4A), os ribotipos 6 e 7 (*Rhizobium* sp.) somente foram observados em plantas CONV enquanto que a presença dos ribotipos 2 e 10 (*Burkholderia* sp.) ficou restrita aos tratamentos SPT (cana-de-açúcar transgênica para resistência a insetos). No outro experimento analisado, com cana-de-açúcar transgênica resistente a herbicida, fato semelhante foi observado (Figura 2.4B). Os ribotipos 6 e 17 somente puderam ser observados em plantas CONV* enquanto os ribotipos 4, 8 (*Burkholderia* sp., *Bacillus* sp., *Rhizobium* sp.) e 16 (*Nocardiopsis* sp.) somente ocorreram em plantas IMI (tratamentos IMI1 ou IMI 4).

A alteração da diversidade bacteriana decorrente da introdução de PGMs também foi constatada por outros autores. Wei et al. (2006) observaram aumento de microrganismos produtores de oxidases, lipases, celulasas entre outras enzimas no solo associado a plantas de mamão transgênico com uma replicase mutante do vírus PRSV. Esses ribotipos diferentemente distribuídos em plantas controle e plantas transgênicas observados nesse trabalho, certamente poderiam resultar em alterações na atividade bacteriana dessas plantas, uma vez que esses ribotipos podem representar grupos funcionais importantes.

Quanto a diferentes eventos de transformação, o ribotipo 17 ficou restrito ao evento SPT 7 enquanto os ribotipos 4, 11 (*Microbacterium* sp., *Curtobacterium* sp.) e 13 (*Methylobacterium* sp., *Pseudomonas* sp.) só ocorreram em plantas do evento SPT 99 (Figura 2.4A). No outro experimento com plantas resistentes a herbicida, o ribotipo 11 (*Microbacterium* sp., *Curtobacterium* sp.) só ocorreu em plantas IMI 1 e os ribotipos 7 (*Rhizobium* sp.), 13 (*Methylobacterium* sp., *Pseudomonas* sp.) e 15 ficaram restritos às plantas IMI 4 (Figura 2.4B), evidenciando que a colonização da planta por esses grupos bacterianos foi afetada pelo evento de transgenia em cana-de-açúcar.

Figura 2.4 - Distribuição dos 17 ribotipos nos tratamentos do experimento 1 – resistência a insetos (A) e no experimento 2 – resistência a herbicida (B). O número de isolados pertencentes a cada ribotipo foi convertido para porcentagem considerando como total o número de isolados analisados para cada tratamento

Ainda com base na distribuição de ribotipos por tratamentos, foram construídos dendrogramas para avaliação da similaridade entre tratamentos (Figura 2.5). A frequência dos ribotipos por tratamento permitiu distinguir plantas controle (CONV*) das plantas transgênicas (IMI 1 e IMI 4) no experimento 1 (Figura 2.5A). Isto é, as plantas transgênicas apresentaram uma distribuição de ribotipos similar, a qual diferiu das plantas controle. O mesmo não ocorreu no outro experimento (Figura 2.5B), no qual o tratamento CONV foi mais similar ao tratamento SPT 99 quanto à distribuição dos ribotipos.

Por meio da presença e ausência de bandas nos perfis genéticos de cada ribotipo, foi possível observar uma grande variabilidade genética entre os ribotipos dos isolados de cana-de-açúcar (Figura 2.6). É interessante notar que os ribotipos 6 e 8 (*Burkholderia* sp., *Rhizobium* sp., *Bacillus* sp.) ficaram em um mesmo clado no dendrograma de similaridade (clado G - Figura 2.6). No entanto, o ribotipo 6 só ocorreu em plantas convencionais nos dois experimentos analisados enquanto o ribotipo 8 somente foi observado em plantas transgênicas, mostrando que grupos bacterianos relacionados podem ser selecionados de maneira diferente pelas plantas transgênicas.

Figura 2.5 - Dendrograma de similaridade entre os tratamentos baseado na presença e ausência dos 17 ribotipos nos diferentes tratamentos do experimento 2 – resistência a herbicida (A) e experimento 1 -resistência insetos (B) . Agrupamento obtido por UPGMA utilizando-se o software NTSYSpc versão 2.1 (12). *Bootstreap* foi calculado pelo *Winboot*

Figura 2.6 - Dendrograma de similaridade genética entre os ribotipos de bactérias associadas à plantas de cana-de-açúcar, gerado por UPGMA utilizando-se o *software* NTSYSpc versão 2.1 (12)

Já foi visto que a condução diferenciada afetou a densidade bacteriana do solo. Com os resultados obtidos por meio de ARDRA, os ribotipos distintos observados nas plantas CONV e CONV* foram 10 e 12 respectivamente, podendo supor, dessa forma, que além de afetar a densidade bacteriana, a falta de corte também afeta a diversidade, reduzindo-a (Figura 2.7). Outro fato que deve ser notado é a ocorrência restrita do ribotipo 6 em plantas controle, sugerindo que inúmeros fatores como genótipo da planta, trato cultural e nicho no hospedeiro podem afetar a frequência de genótipos bacterianos associados à planta hospedeira.

Finalmente, com os dados gerados por ARDRA, foi realizada uma análise da diversidade bacteriana nas diferentes comunidades associadas à cana-de-açúcar. No experimento 1, a comunidade epifítica de folha apresentou 4 ribotipos diferentes (Figura 2.8A), enquanto que na comunidade de endófitos de raiz foram 7 (Figura 2.8B), em rizoplane 9 (o maior número) (Figura 2.8C) e no solo 8 (Figura 2.8D).

Figura 2.7 - Distribuição dos 17 ribotipos nos tratamentos controles do experimento 1 – resistência a insetos (CONV - sem cortes) e no experimento 2 – resistência a herbicida (CONV* - cortes anuais). O número de isolados pertencentes a cada ribotipo foi convertido para porcentagem considerando-se como total o número de isolados analisados para cada tratamento

No experimento 2, as comunidades epifíticas de folha (6 ribotipos diferentes encontrados – Figura 2.9A), endófitos de raiz (9 ribotipos – Figura 2.9B) e de solo (10 ribotipos – Figura 2.9D), apresentaram maior diversidade, como a análise de trato cultural havia indicado quando CONV e CONV* foram comparados. Portanto, além de aumentar a densidade bacteriana do solo, os cortes anuais das plantas do experimento 2, também resultaram em uma maior diversidade bacteriana no solo.

Alguns ribotipos só foram encontrados em determinados nichos como o ribotipo 16 (*Nocardiopsis* sp.) e 17, que somente foram observados no rizoplane (Figuras 2.8C e 2.9C). O ribotipo 10 (*Burkholderia* sp.), apesar de estar presente em solo do experimento 2 (Figura 2.9D), foi isolado da comunidade de endófitos de raiz de todos os tipos de plantas amostrados nos dois experimentos (Figuras 2.8B e 2.9B).

Dessa forma, foi observado que fatores ambientais e de conduta no campo, além do tipo de planta e do transgene inserido afetam a interação microrganismo-planta. Grupos bacterianos de importância para a manutenção do ecossistema devem ser preservados e, portanto, são necessários muitos estudos sobre a densidade e a diversidade bacteriana frente às diversas alterações ambientais e de cultivo a que a agricultura está sendo submetida. Labbe et al. (2007) estudaram a comunidade microbiana de solos contaminados com hidrocarbonetos e verificaram que as densidades de *Actinobacteria* e *Proteobacteria* não foram diferentes entre o solo contaminado e o solo controle, no entanto, Alphaproteobacteria foi encontrada em maior quantidade em solos controle (46%) que nos contaminados (24%). Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria foram detectados somente em solos contaminados. Além disso, *Rhodococcus* e *Mycobacterium* não foram encontrados em solos contaminados. Portanto, a contaminação altera profundamente a estrutura da comunidade microbiana associada.

Figura 2.8 - Distribuição dos 17 ribotipos nos tratamentos do experimento 1 – resistência a insetos para as comunidades de bactérias epifíticas de folha (A), endofíticas de raiz (B), rizoplano (C) e de solo. O número de isolados pertencentes a cada ribotipo foi convertido para porcentagem considerando-se como total o número de isolados analisados para cada tratamento

Figura 2.9 - Distribuição dos 17 ribotipos nos tratamentos do experimento 2 – resistência a herbicida para as comunidades de bactérias epifíticas de folha (A), endofíticas de raiz (B), rizoplano (C) e de solo. O número de isolados pertencentes a cada ribotipo foi convertido para porcentagem considerando-se como total o número de isolados analisados para cada tratamento

Nos isolados pertencentes aos ribotipos 7 (*Rhizobium* sp.) e 13 (*Methylobacterium* sp. e *Pseudomonas* sp.) foram observados representantes das bactérias conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal ou PGPR (*plant growth-promoting rhizobacteria*). A manipulação da rizosfera por meio da inoculação de PGPR para o controle biológico de patógenos de plantas tem se mostrado promissor (SIDDIQUI; BAGHEL; AKHTAR, 2007). Uma das maneiras pelas quais essas bactérias promoveriam o controle biológico e estimulariam o crescimento da planta é a assimilação de ferro por meio de sideróforos, pois a forma de ferro mais abundante na natureza (FeIII) é indisponível para assimilação pelas plantas. Posteriormente, o complexo formado pelo FeIII e pelo sideróforo secretado pelas bactérias é reconhecido por receptores específicos e incorporado pela célula bacteriana. Dessa maneira, as PGPR podem crescer melhor e dificultar o crescimento de outros microrganismos pela indisponibilidade de ferro e sem competir com a planta hospedeira, uma vez que essas necessitam de uma concentração inferior de ferro no solo para seu crescimento.

Siddiqui, Baghel e Akhtar (2007) avaliaram o desempenho de algumas espécies de PGPR em lentilha sobre o patógeno *Meloidogyne javanica* na presença e ausência de *Rhizobium* e *Pseudomonas putida* foi a linhagem que mais reduziu a penetração de *M. javanica* nas raízes de plantas de lentilha. Em análise de SDS-PAGE, essa linhagem mostrou maior produção de sideróforos, o que pode ser o fator determinante do desempenho da espécie como PGPR. *Rhizobium* apresentou uma capacidade muito superior às outras linhagens quanto à promoção de crescimento vegetal em experimentos de inoculações individuais. No entanto, a inoculação conjunta de PGPRs aumenta a nodulação por *Rhizobium* e melhora significativamente o controle de *M. javanica*.

O gênero *Methylobacterium* é encontrado em associação com plantas colonizando a superfície (epífita) ou no interior (endófita), mantendo uma simbiose mutualística (SY; GIRAUD; JOURAND, 2001; KOENIG; MORRIS; POLACCO, 2002; PIRTTILA et al., 2000; IDRIS et al., 2006). Representantes desse gênero podem também promover o crescimento da planta por meio da produção de fitormônios como o ácido indolacético (AIA), citocininas ou vitaminas (BASILE et al., 1985;

TROTSSENKO; IVANOVA; DORONINA, 2001; KOENIG; MORRIS; POLACCO, 2002). Além disso, *Methylobacterium* pode estar associada ao metabolismo de nitrogênio das plantas (HOLLAND; POLACCO, 1992) e ao controle biológico (MADHAIYAN et al., 2006; ABANDA-NKPWATT et al., 2006).

Os ribotipos 8 e 10 apresentaram representantes do gênero *Burkholderia* (classe Betaproteobacteria). O ribotipo 8 também apresentou *Bacillus* (classe Bacilli). O complexo *Burkholderia cepacia* (CBC) compreende um grupo ecologicamente versátil presente em solos e águas (COENYE; VANDAMME, 2003). Essa versatilidade estaria relacionada ao fato de possuírem aparato genético para a metabolização de muitos compostos orgânicos bem como para a produção de antibióticos (LESSIE et al., 1996). As bactérias do CBC possuem potencial para processos de biorremediação (O'SULLIVAN; MAHENTHIRALINGAM, 2005), para o controle biológico (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001) e para a promoção de crescimento vegetal (PARKE; GURIAN-SHERMAN, 2001; CHIARINI et al., 2006). Muitas espécies desse grupo podem ser encontradas associadas à rizosfera de importantes culturas vegetais (RAMETTE; LIPUMA; TIEDJE, 2005). Recentemente, Mendes et al. (2007) realizaram uma análise filogenética dos genes 16S rRNA e *recA* de isolados endofíticos de *Burkholderia* obtidos no presente trabalho e foi observado que os isolados de cana-de-açúcar são próximos filogeneticamente de isolados clínicos de CBC e puderam ser agrupados com *B. cenocepacia* (gemonovar. III), a qual é isolada de pacientes com fibrose cística, evidenciando que plantas podem ser um nicho para bactérias patogênicas humanas.

As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam grande variabilidade, possuindo aplicação em várias áreas de interesse biotecnológico. No entanto, uma das áreas de maior interesse é a utilização de bactérias desse gênero como bio-inseticidas. O efeito residual e a toxicidade dos inseticidas comuns têm aumentado o interesse por alternativas ao seu uso. *Bacillus thuringiensis* (Bt) e *Bacillus sphaericus* (Bs) podem ser utilizados como agentes de controle biológico para organismos entomopatogênicos. Embora o uso de Bt e Bs seja viável, seu alto custo atual inviabiliza a aplicação em larga escala em países em desenvolvimento (EL-BENDARY, 2006).

Bactérias da classe Actinobacteria dos gêneros *Microbacterium* e *Curtobacterium* foram encontrados no ribotipo 11 e *Nocardiopsis* no ribotipo 16. Actinomicetos são bactérias filamentosas que naturalmente habitam solos, possuem grande importância nos processos biotecnológicos devido a sua capacidade de produção de um grande número de antibióticos e outros metabólitos secundários bioativos (ZITOUNI et al., 2005). A maioria dos actinomicetos crescem no pH de 5 – 9, com um pH ótimo próximo a neutralidade (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983) e diferentes fatores podem afetar a abundância de actinomicetos no solo como o tipo e a quantidade de matéria orgânica, a salinidade, temperatura e vegetação (WAKSMAN, 1967; MCCARTHY; WILLIAMS, 1990).

Além da importante produção de antibióticos, os actinomicetos podem atuar na fixação de nitrogênio. O gênero *Frankia* é conhecido como o único em actinomicetos a possuir o gene da nitrogenase. No entanto, em trabalho recente, os autores caracterizam as linhagens BMG5.6 e 7501 como relacionadas a *Frankia* e detentoras de uma enzima nitrogenase similar (GYAMFI et al., 2002). Os autores sugerem que as hipóteses de presença do gene nif no ancestral das actinobactérias e a ocorrência de transferência genética entre *Frankia* e actinobactérias relacionadas devem ser melhor estudadas.

Fica claro diante do exposto que os diferentes grupos bacterianos associados às plantas e aos solos apresentam atividades fundamentais para o bom desenvolvimento vegetal e fazem parte de um ecossistema equilibrado e de uma prática de agricultura sustentável, sendo importante analisar os possíveis efeitos da introdução de diferentes práticas agrícolas e genótipos de plantas sobre a comunidade bacteriana associada em cada caso.

Referências

- ABANDA-NKPWATT, D.; MUSCH, M.; TSCHIERSCH, J.; BOETTNER, M.; SCHWAB, W. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 15, p. 4025-4032, 2006.
- ARAUJO, W. L.; MACCHERONI, 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, n. 3, p. 229-236, 2001.
- ARAUJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, 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**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.
- BASILE, D. V.; BASILE, M. R.; LI, Q. Y.; CORPE, W. A. Vitamin-B12-Stimulated Growth and Development of *Jungermannia leiantha* Grolle and *Gymnocolea inflata* (Huds) Dum (Hepaticae). **Bryologist**, New York, v. 88, n. 2, p. 77-81, 1985.
- BRIMECOMBE, M.J., LEIJ, F. A.; LYNCH, J.M. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations, In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface**. New York: Marcel-Dekker, 2001. p. 95-140.
- CHIARINI, L.; BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S.; VISCA, P. *Burkholderia cepacia* complex species: health hazards and biotechnological potential. **Trends in Microbiology**, Amsterdam, v. 14, n. 6, p. 277-286, 2006.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 9, p. 719-729, 2003.
- DALMASTRI, C.; CHIARINI, L.; CANTALE, C.; BEVIVINO, A.; TABACCHIONO, S. Soil type and maize cultivar affect the genetic diversity of maize root- associated *Burkholderia cepacia* populations. **Microbial Ecology**, New York, v. 38, 273-284, 1999.
- DEVARE, M. H.; JONES, C. M.; THIES, J. E. Effect of Cry3Bb transgenic corn and tefluthrin on the soil microbial community: biomass, activity, and diversity. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, n. 3, p. 837-843, 2004.
- DONEGAN, K. K.; SEIDLER, R. J.; DOYLE, J. D.; PORTEOUS, L. A.; DIGIOVANNI, G.; WIDMER, F.; WATRUD, L. S. A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant *Sinorhizobium meliloti*: effects on the soil ecosystem. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 920-936, 1999.
- DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7310-7318, 2003.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Impact of genetically modified crops on soil- and plant-associated microbial communities. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, n. 3, p. 806-815, 2004.

EL-BENDARY, M. A. *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. **Journal of Basic Microbiology**, Berlim, v. 46, n. 2, p. 158-170, 2006.

FANG, M.; KREMER, R. J.; MOTAVALLI, P. P.; DAVIS, G. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 4132-4136, 2005.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 189-216, 1983.

GYAMFI, S.; PFEIFER, U.; STIERSCHNEIDER, M.; SESSITSCH, A. Effects of transgenic glufosinate tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) and the associated herbicide application on eubacterial and *Pseudomonas* communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 41, n. 3, p. 181-190, 2002.

HEUER, H.; KROPPESTEDT, R. M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1325-1335, 2002.

HOLLAND, M. A.; POLACCO, J. C. Urease-null and hydrogenase-null phenotypes of a phylloplane bacterium reveal altered nickel metabolism in 2 soybean mutants. **Plant Physiology**, Washington, v. 98, n. 3, p. 942-948, 1992.

IDRIS, R.; KUFFNER, M.; BODROSSY, L.; PUSCHENREITER, M.; MONCHY, S.; WENZEL, W. W.; SESSITSCH, A. Characterization of Ni tolerant methylobacteria associated with the hyperaccumulating plant *Thlaspi goesingense* and description of *Methylobacterium goesingense* sp nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 8, p. 634-644, 2006.

KOENIG, R. L.; MORRIS, R. O.; POLACCO, J. C. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in *Methylobacterium* spp. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 184, n. 7, p. 1832-1842, 2002.

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, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

LABBE, D.; MARGESIN, R.; SCHINNER, F.; WHYTE, L. G.; GREER, C. W. Comparative phylogenetic analysis of microbial communities in pristine and hydrocarbon-contaminated Alpine soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 59, n. 2, p. 466-475, 2007.

LESSIE, T. G.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B. D.; DEVEREUX, R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 117-128, 1996.

LIU, B.; ZENG, Q.; YAN, F. M.; XU, H. G.; XU, C. R. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 271, n. 1/2, p. 1-13, 2005.

MADHAIYAN, M.; REDDY, B. V. S.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S. P.; SA, T. M. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n. 4, p. 270-276, 2006.

MCCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Method for studying the ecology of actinomycetes. **Methods in Microbiology**, London, v. 22, p. 533-563, 1990.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAUJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 7259-7267, 2007.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, n. 2, p. 105-114, 2003.

MULDER, C.; WOUTERSE, M.; RAUBUCH, M.; ROELOFS, W.; RUTGERS, M. Can transgenic maize affect soil microbial communities? **Plos Computational Biology**, San Francisco, v. 2, n. 9, p. 1165-1172, 2006.

O'SULLIVAN, L. A.; MAHENTHIRALINGAM, E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 41, n. 1, p. 8-11, 2005.

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.

PIRTTILA, A. M.; LAUKKANEN, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 7, p. 3073-3077, 2000.

RAMETTE, A.; LIPUMA, J. J.; TIEDJE, J. M. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1193-1201, 2005.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, n. 3, p. 167-177, 2000.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M. H.; VAN ELSAS, J. D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 219-235, 2006.

ROHLF, F.J. **NTSYS.PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. Version 2.1. Exeter Publications. New York, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SIDDIQUI, Z. A.; BAGHEL, G.; AKHTAR, M. S. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Rhizobium* and plant growth-promoting rhizobacteria on lentil. **World Journal of Microbiology, Biotechnology**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 435-441, 2007.

SY, A.; GIRAUD, E.; SAMBA, R.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. Certain legumes of the genus *Crotalaria* are specifically nodulated by a new species of *Methylobacterium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 6, p. 503-508, 2001.

TAN, S.; EVANS, R. R.; DAHMER, M. L.; SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Imidazolinone tolerant crops: history, current status and future. **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, n. 3, p. 246-257, 2005.

TROTSENKO, Y. A.; IVANOVA, E. G.; DORONINA, N. V. Aerobic methylotrophic bacteria as phytosymbionts. **Mikrobiologiya**, v. 70, p. 725-736, 2001.

VENTURA, M.; ELLI, M.; RENIERO, R.; ZINK, R. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 36, n. 2-3, p. 113-121, 2001.

WAKSMAN, S.A. Distribution, isolation and methods of study. In: **The actinomycetes—a summary of current knowledge**. New York: The Ronald Press Company, 1967. p. 9–21.

WEI, X. D.; ZOU, H. L.; CHU, L. M.; LIAO, B.; YE, C. M.; LAN, C. Y. Field released transgenic papaya effect on soil microbial communities and enzyme activities. **Journal of Environmental Sciences-China**, Beijing, v. 18, n. 4, p. 734-740, 2006.

WIDMER, F.; RASCHE, F.; HARTMANN, M.; FLIESSBACH, A. Community structures and substrate utilization of bacteria in soils from organic and conventional farming systems of the DOK long-term field experiment. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 294-307, 2006.

WU, W. X.; YE, Q. F.; MIN, H. Effect of straws from Bt transgenic rice on selected biological activities in water-flooded soil. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 40, n. 1, p. 15-22, 2004.

YAP, I.V. **WinBoot UPGMA bootstrapping for binary data**. PHYLIP Copyright © 1986-1991. University of Washington and Joseph Felsenstein, 1986.

ZITOUNI, A.; BOUDJELLA, H.; LAMARI, L.; BADJI, B.; MATHIEU, F.; LEBRIHI, A.; SABAOU, N. *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 10, p. 984-993, 2005.

CANA-DE-AÇÚCAR RESISTENTE AO HERBICIDA IMAZAPYR (GENE *AHAS*)
E A COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA

3 CANA-DE-AÇÚCAR RESISTENTE AO HERBICIDA IMAZAPYR (GENE AHAS) E A COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA

Resumo

Diversos fatores, tais como variações sazonais, tipos de tecido vegetal, cultivares e espécies de hospedeiro, tipo de solo, interação com microrganismos benéficos ou patógenos entre outros, afetam a estrutura e a composição da comunidade bacteriana das plantas e a introdução de plantas geneticamente modificadas (PGM) foi somada ao conjunto desses fatores. Dessa forma, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito das PGMs sobre a microbiota bacteriana associada a elas, isolando e caracterizando a microbiota por meio de ARDRA e DGGE. Para a análise, um experimento foi montado com os tratamentos: *i*) plantas convencionais da variedade SP80 1842 conduzidas com capina manual para controle de plantas daninhas (CV); *ii*) plantas transgênicas resistentes a herbicida (IMI 1) conduzidas com capina (TC) e *iii*) plantas transgênicas resistentes a herbicida (IMI 1), mas conduzidas com a aplicação do herbicida (TH). A comunidade bacteriana foi amostrada em 3 estágios de desenvolvimento da planta. A partir da metodologia descrita, foi possível isolar bactérias associadas à cana-de-açúcar das comunidades endofítica da raiz, da rizosfera e do solo. A densidade bacteriana observada nos diferentes tratamentos avaliados foi entre 10^6 e 10^7 UFC g⁻¹. Analisando cada comunidade separadamente, foi observado que a densidade bacteriana média por tratamento para as comunidades endofítica da raiz e do solo, não apresentou diferenças relacionadas à introdução das plantas transgênicas. Para a comunidade bacteriana da rizosfera, a densidade bacteriana nas plantas TC foi significativamente menor no terceiro isolamento. Dessa maneira, foi possível notar que, em 17 meses, a presença da planta transgênica e a aplicação do herbicida Imazapyr podem ter resultado na redução da densidade bacteriana associada à rizosfera de cana-de-açúcar. Por ARDRA, foram avaliados isolados das comunidades endofítica de colmo e do solo amostrados aleatoriamente e 12 ribotipos foram determinados. Bactérias do ribotipo 7 foram isoladas somente de plantas CV, portanto, sua presença foi afetada pelo cultivo da planta transgênica. A presença dos ribotipos diferentemente distribuída entre os tratamentos analisados nesse trabalho pode resultar em alterações na atividade bacteriana dessas plantas, uma vez que esses ribotipos podem representar grupos funcionais importantes. O grupo de *Methylobacterium* foi utilizado como modelo de bactéria na interação com cana-de-açúcar e foram feitas análises dessa comunidade com a técnica independente de cultivo, DGGE. A partir dos perfis obtidos foram realizadas análises de CCA qualitativo, considerando os três isolamentos e PCA qualitativo para cada isolamento. Por meio dessa análise, foi notado que todos os fatores analisados são fontes de variação, sendo o estado fisiológico a maior fonte de variação. Além disso, a diferença entre os tratamentos foi reduzida ao longo do tempo, não sendo mais observada no terceiro isolamento, sugerindo que os efeitos da introdução de cana-de-açúcar transgênica foram transitórios.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar transgênica; Diversidade bacteriana; DGGE

3 SUGARCANE RESISTENT TO IMAZAPYR HERBICIDE (GENE *AHAS*) AND THE ASSOCIATED BACTERIAL COMMUNITY

Abstract

Several factors, such as seasonal variations, kinds of vegetal tissue, cultivares and host species, kind of soil, interaction with pathogen and beneficial microorganisms among others, affect the bacterial community composition of plants and the introduction of genetically modified plants (GMP) was added to the set of these factors. Thus, the work had as objective to assess the effect of GMPs on the bacterial microbiota associated to them, isolating and characterizing the microbiota by means of ARDRA and DGGE. For the analysis, a experiment was made with the treatments: *i*) conventional plants of SP80 1842 variety conducted with manual weeding for weed control (CV); *ii*) transgenic plants resistant to herbicide (IMI 1) conducted with weeding (TC) and *iii*) transgenic plants resistant to herbicide (IMI 1) but with application of herbicide (TH). The bacterial community was sampled in 3 levels of the plant development. From the described methodology it was possible to isolate bacteria associated to sugarcane from the endophytic of root, rizosphere and soil. The bacterial density observed in the different assessed treatments was 10^6 and 10^7 CFU g⁻¹. Analyzing each community separately it was observed that medium bacterial density for treatment to soil and endophytic of root community did not show differences related to the transgenic plants introduction. For the rizosphere bacterial community the plant bacterial density TC was significantly smaller in the third isolation. This way, It was possible to see that in 17 months the transgenic plant presence and the application of Imazapyr herbicide can bring result in reducing bacterial density associated to the sugarcane rizosphere. Isolated from stem endophytic community and from randomly sampled soil was assessed through ARDRA and 12 ribotypes were determined. Bacteria from ribotype 7 were isolated only from CV plants, so their presence was affected by the transgenic plant cultivation. The ribotypes presence differently distributed among the analyzed treatments in this work can result in changes in the bacterial activity of these plants, since these ribotypes can represent important functional groups. The *Methylobacterium* group was utilized as a model of bacterium in the interaction with independent cultivation, DGGE. From the obtained profiles, analyses of qualitative CCA were made considering the three isolations and for each qualitative PCA for each isolation. By means of this analysis it was noticed that all analyzed factors are variation sources being the physiological status the highest variation source. Besides, the difference among isolations was reduced through the time and it was not observed in the third isolation anymore, suggesting that effects of transgenic sugarcane introduction were transitory.

Keywords: transgenic sugar cane; bacterial diversity, DGGE

3.1 Introdução

É importante que se estude o impacto da introdução de plantas geneticamente modificadas (PGM) sobre o ambiente, especialmente quando se considera o impacto dessas plantas sobre a comunidade microbiana associada à planta e ao solo (LIU et al., 2005). A transgenia poderia causar alteração no equilíbrio microbiano devido à modificação química dos exsudados das raízes ou por meio de efeitos diretos dos produtos destes transgenes.

Os resultados dos trabalhos sobre o impacto de PGMs sobre a comunidade bacteriana associada não são conclusivos. Em alguns casos foi possível visualizar efeitos das plantas transgênicas (SICILIANO et al., 1998; SICILIANO; GERMIDA, 1999; TATLI; GULLU; OZDEMIR, 2004), porém, em outros, nenhuma alteração da comunidade bacteriana foi observada (FANG et al., 2005; HEUER et al., 2002; RASCHE et al., 2006). Ainda a possibilidade dos efeitos serem detectados somente em determinada amostragem (DUNFIELD; GERMIDA, 2003; HEUER et al., 2002; SMALLA et al., 2001; WU; YE; MIN, 2004; MULDER et al., 2006).

Esse histórico demonstra a importância da análise dos transgênicos para cada construção, considerando o tipo de planta, o transgene e até mesmo o evento da transformação. Além disso, há a dificuldade de se isolar o efeito da PGM nos estudos, para isso a manutenção das condições ambientais, ou seja, de outras fontes de variação, deve ser rigorosa (ASAO; ARAI; NISHIZAWA, 2003).

Os estudos relacionados aos efeitos das PGMs sobre as comunidades microbianas se justificam pois os microrganismos desempenham importantes funções na manutenção de ecossistemas (MYERS, 1996). A presença de endófitos já foi constatada em inúmeras espécies vegetais de interesse econômico (ARAUJO et al., 2001; KUKLINSKY-SOBRAI et al., 2004; PROCÓPIO, 2004; PIRTTILA et al., 2005; RUBINI et al., 2005; SANDHIYA et al., 2005), inclusive em cana-de-açúcar (ROSENBLUETH et al., 2004). Estudos têm mostrado *Methylobacterium* como um endófito importante de diferentes espécies vegetais inclusive em cana-de-açúcar, cultura na qual *Methylobacterium* aumentou a germinação de sementes em 19,5%

comparado com o controle. E quando a inoculação foi feita combinada com *Rhizobium* sp., foi notado aumento do crescimento da planta e da nodulação comparado com as inoculações isoladas de *Methylobacterium* e *Rhizobium* (MADHAIYAN et al., 2005). Em trabalhos realizados entre 2002 e 2004, foi aventada a hipótese desse endófito ter um papel importante na Clorose Variegada dos Citros (ARAUJO et al., 2002; LACAVA et al., 2004), no entanto pouco se sabe sobre os mecanismos químicos, fisiológicos e ecológicos envolvidos nessa associação.

Assim como a presença de bactérias na rizosfera, a presença e a permanência de bactérias endofíticas também são influenciadas por fatores bióticos e abióticos (SEGHERS et al., 2004). As técnicas de biologia molecular tendem a complementar os estudos de levantamentos e comparações da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000) e podem auxiliar no entendimento do efeito da introdução de PGMs sobre as comunidades bacterianas associadas a plantas. Costa et al. (2006) concluíram que a combinação de técnicas dependentes de cultivo com o DGGE possibilitou uma melhor compreensão da comunidade bacteriana associada à rizosfera.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de cana-de-açúcar transgênica para resistência a Imazapyr (gene *ahas*) sobre a comunidade bacteriana associada a elas. Para isso, bactérias de diferentes comunidades associadas à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada foram isoladas. Posteriormente a essa análise sobre a densidade bacteriana, os isolados obtidos foram caracterizados por meio das técnicas de ARDRA e de seqüenciamento para a avaliação da diversidade genética. E a técnica de DGGE foi utilizada para avaliar a comunidade de *Methylobacterium* não cultivável para complementação dos dados.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Material vegetal e área de cultivo

No presente estudo, a variedade comercial convencional (não transgênica) de cana-de-açúcar SP80 1842 foi utilizada como controle, bem como sua isolinha

geneticamente modificada IMI 1. A cana-de-açúcar transgênica IMI 1 possui um variante do gene *ahas* de trigo, o qual lhe confere resistência a herbicidas da família das imidazolinonas (imazapyr, imazapic, imazethapyr, imazamox, imazamethabenz e imazaquin) (TAN et al., 2005). No experimento utilizado para esse estudo, o herbicida aplicado pós-plantio foi o Imazapyr.

Todas as plantas foram gentilmente cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, Piracicaba, SP), bem como a área experimental, cujo solo é do tipo médio arenoso (pH 4,5; 2,5 mmol dm³ de potássio; 8 mg dm³ de fósforo total) no qual as plantas foram cultivadas durante os 17 meses de duração do experimento.

3.2.2 Delineamento experimental

Os tratamentos utilizados foram: *i*) plantas convencionais da variedade SP80 1842 conduzidas com capina manual para controle de plantas daninhas (CV); *ii*) plantas transgênicas resistentes a herbicida (IMI 1) conduzidas com capina (TC) e *iii*) plantas transgênicas resistentes a herbicida (IMI 1), mas conduzidas com a aplicação do herbicida (TH).

O experimento foi realizado em blocos inteiramente casualizados com 4 repetições para cada tratamento totalizando 12 parcelas de 5x3m² cada (Figura 3.1). Para o isolamento das bactérias em meio de cultura, foram amostradas três plantas de cada parcela, escolhidas ao acaso. Esses isolamentos da comunidade bacteriana associada à cana-de-açúcar foram realizados em 3 estágios de desenvolvimento da planta: 3 meses após o plantio (Isolamento 1), 10 meses após o plantio (Isolamento 2) e 17 meses após o plantio (Isolamento 3) (Figura 3.2). Para a análise dos dados de isolamento microbiano, a densidade foi calculada e analisada com o auxílio do programa SAS - Copyright (c) 1989-1996 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

O experimento foi montado dessa maneira na expectativa de se avaliar o efeito da transgenia (expressão do transgene - CVxTC) ou mudança no manejo (aplicação do herbicida para esse tipo de planta transgênica utilizada nesse estudo - TCxTH) sobre a comunidade microbiana. Além disso, os três isolamentos permitem avaliar cada variável em diferentes condições ambientais.

Figura 3.1 - Croqui experimental do experimento realizado no Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, SP, com três tratamentos: plantas convencionais (SP80 1842) e plantas transgênicas (IMI 1) manejadas com capina manual ou aplicação de herbicida Imazapyr

Figura 3.2 - Cronologia do experimento realizado com cana-de-açúcar no CTC. Foi realizada uma aplicação do Imazapyr nas parcelas desse tratamento logo após o plantio. Nas outras parcelas, a capina foi realizada periodicamente até o pleno estabelecimento da cana-de-açúcar. As coletas de plantas para os isolamentos foram realizadas 3, 10 e 17 meses após o plantio

3.2.3 Isolamento de bactérias associadas à cana-de-açúcar

3.2.3.1 Isolamento de bactérias endofíticas da raiz

As raízes foram desinfetadas superficialmente em uma série de etanol 70% (1 min), hipoclorito de sódio 2% (3 min) e etanol 70% (30 seg), seguido de duas lavagens em água destilada. Um grama do material foi picado e macerado em tampão PBS (140mM de NaCl, 3mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄ e 2mM de KH₂PO₄, pH 7,4) adicionado de 2% de PVP (Polivinilpirrolidona). Essa suspensão obtida foi diluída apropriadamente e semeada em meio TSB 5% (Merk) suplementado com benomyl (50µg mL⁻¹) e incubado a 28°C por 8 a 14 dias.

3.2.3.2 Isolamento de bactérias da rizosfera e do solo

Uma amostra de 5g do solo da rizosfera e de solo separadamente foram pesados e colocados em frascos com 50 mL de PBS e esferas de vidro (0,2 cm de diâmetro). Essa suspensão foi agitada por 1 hora a 150 rpm, a 28°C. A suspensão obtida foi diluída apropriadamente e semeada em meio TSB 5% suplementado com benomyl (50µg mL⁻¹) e incubado a 28°C por 8 a 14 dias. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi transformado em Log (UFC+2) e submetido ao teste de Tukey a 5% de significância.

3.2.4 Análise da diversidade genética bacteriana por ARDRA

3.2.4.1 Extração de DNA genômico bacteriano

Os isolados foram crescidos em 4 mL de meio TSB a 28°C por 48 h. Ao precipitado obtido pela centrifugação dessa suspensão, foram adicionados 700µL de tampão TE (10 mM de Tris-HCl, pH = 8), 30 µL de SDS 10% e 0,5 g de sílica (0,1 mm de diâmetro). Em seguida, a suspensão foi agitada em Homogeneizador de células (Ação Científica, Piracicaba, SP) por 30 seg a 5000 bpm e centrifugada por 10 min a 9000 g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o DNA purificado pelo método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989).

3.2.4.2 Amplificação do 16S rDNA

Para a amplificação da região do 16S rDNA foram utilizados os primers R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e PO27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3'). As reações foram realizadas em um volume de 50 μ L, contendo 3,75 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 μ M de cada primer, 2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X e 1 μ L de DNA molde (0,5 a 10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94 °C; 1 min a 62,5 °C; 1 min a 72 °C, e uma extensão final de 7 min a 72 °C.

O fragmento de DNA amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,0% a 3 volts cm^{-1} , juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder para a observação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg mL^{-1}) e fotodocumentado.

3.2.4.3 Caracterização de isolados por ARDRA (*Amplified rDNA Restriction Analysis*)

A variabilidade genética das bactérias de colmo e de solo associados a cana-de-açúcar foram analisadas por meio da técnica do ARDRA. Utiliza-se ARDRA para o agrupamento dos isolados em ribotipos distintos. Para isso, 1 μ g do produto amplificado foi digerido com 2U da enzima de restrição *Hha I* de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de digestão foram separados em gel de agarose a 2,5% a 5 volts cm^{-1} . O tamanho do produto amplificado foi estimado pela comparação com um marcador molecular de 100 pb (Invitrogen). Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg. mL^{-1}) e fotodocumentado.

O número de isolados dentro de cada ribotipo foi dividido pelo número total de isolados analisados. Dessa forma, foi obtida uma frequência relativa (dados em porcentagem), o que facilita a comparação e a observação dos dados.

3.2.5 Análise de similaridade e construção de dendrogramas

A similaridade entre os perfis de restrição foi analisada considerando-se a presença ou ausência de bandas após digestão pela enzima, e a similaridade entre os tratamentos foi analisada considerando-se a presença ou ausência dos ribotipos dentro da população. Para as análises, utilizou-se o coeficiente de similaridade SM (*Simple Matching*), sendo a matriz de similaridade construída através do método de UPGMA (*Unweighted Pair-Group Arithmetic Average*) utilizando-se o programa NTSYSpc (*Numerical Taxonomy System for personal computers*) versão 2.1 (ROHLF, 2000). Os valores de bootstrap foram calculados por meio do programa *Winboot bootstrapping* (YAP, 1986).

3.2.6 Análise da diversidade de *Methylobacterium* spp. por DGGE

3.2.6.1 Extração de DNA da rizosfera

Para a extração de DNA, as três amostras de cada parcela de rizosfera foram misturadas para a retirada de uma sub-amostra. Dessa maneira, das 36 amostras inicialmente coletadas (3 tratamentos x 4 parcelas x 3 plantas), 12 foram usadas para a análise de DGGE (para cada isolamento). A extração de DNA total da amostra ambiental foi realizada com o kit MoBIO UltraClean Soil DNA segundo as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 0,8 %, a 3 volts cm^{-1} juntamente com o marcador de peso molecular DNA λ clivado com HindIII. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio ($1,0 \text{ mg mL}^{-1}$) e fotodocumentado.

3.2.6.2 Amplificação do 16S rDNA

Para a amplificação da região do 16S rDNA foram utilizados os primers R1387 (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3') e 2F (5'- GAT CGG CCC GCG TCT GAT TAG -3'), seletivos para α -proteobacterias, contendo o grupo de interesse *Methylobacterium* (ANDREOTE, 2007). As reações foram realizadas em um volume de 50 μL , contendo 3,75 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 μM de cada primer,

2,5 U de Taq DNA polimerase, tampão 1X e 1 μ L de DNA molde (0,5 a 10 ng). A PCR foi realizada em termociclador (Peltier Thermal Cycler 200, MJ Research), programado para realizar uma desnaturação inicial de 4 min a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 94 °C; 1 min a 62,5 °C; 1 min a 72 °C, e uma extensão final de 7 min a 72 °C. O fragmento de DNA amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,0% a 3 volts cm^{-1} , juntamente com o marcador de peso molecular DNA Ladder para a observação de um fragmento de aproximadamente 1400 pb. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1,0 mg/mL) e fotodocumentado.

3.2.6.3 Análise por DGGE

Para a preparação e corrida do gel de DGGE, foram feitas duas soluções estoque: A (6% acrilamida 37:1 / 0% uréia formamida) e B (6% acrilamida 37:1 / 80% uréia formamida). Essas soluções foram misturadas em proporções de tal forma a compor um gel de 45 a 65% de desnaturação. A solução de alta concentração (H) foi feita com 4,7 mL de A e 20,3 mL de B e a solução de baixa concentração (L) com 11 mL de A e 14 mL de B. Para a polimerização foram adicionados 150 μ L de persulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ 10% e 12 μ L de TEMED ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$) em cada uma das soluções H e L. O gel empilhador, preparado para as canaletas, foi constituído de 5mL da solução S (8% acrilamida 37:1 / 0% uréia formamida) com adição de 25 μ L de persulfato de amônio 10% e 7 μ L de TEMED. Os produtos de amplificação obtidos a partir dos primers R 1387 e 2F foram re-amplificados com os primers R 1387 e U968GC (5'-CGCCCGGGGAGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACG CGAAGAACCTTAC-3'). Esses produtos foram aplicados no gel juntamente com tampão de corrida 6x [0,05% azul de bromofenol, 40% de sucrose, 0,1M EDTA (pH 8,0) e 0,5% SDS]. A corrida foi no aparelho PhorU2 system (Ingeny), por 15h a 100 volts. Após a corrida, o gel foi corado com *SYBR Green I* (Invitrogen).

3.2.6.4 Análise dos géis de DGGE – análise multivariada

A normalização, conversão e comparação das imagens foram feitas no programa GelCompar II (Applied Maths, Bélgica) por meio de matrizes de presença/ausência e intensidade de bandas. A normalização e a seleção de bandas feitas pelo programa foram cuidadosamente avaliadas e correções manuais foram feitas quando necessário. Com o auxílio do software Canoco (Canoco 4.5, Biometris, Wageningen, Holanda) (TER BRAAK, 2002) foram realizadas as análises de CCA qualitativo, para os três isolamentos e PCA qualitativo para cada isolamento. As bandas observadas nos géis de DGGE foram consideradas como espécies e o teste estatístico de permutação de Monte Carlo foi aplicado considerando 499 permutações aleatórias, permitindo avaliar a significância (valor p) dos fatores ambientais na distribuição de espécies das amostras. Como fatores ambientais foram considerados as variáveis: planta (convencional e transgênica), trato cultural (capina manual ou herbicida) e estado fisiológico da planta (3, 10 e 17 meses).

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Avaliação da densidade bacteriana associada à cana-de-açúcar IMI 1

A partir da metodologia descrita, foi possível isolar bactérias associadas à cana-de-açúcar das comunidades endofítica da raiz, da rizosfera e do solo. Foram realizadas três amostragens ao longo do experimento: 3 meses (isolamento 1), 10 meses (isolamento 2) e 17 meses (isolamento 3). Como é conhecido que fatores ambientais podem afetar a comunidade microbiana associada às plantas (FANG et al., 2005) é de fundamental importância a coleta de amostras em diferentes épocas do ano.

Nessa análise geral, com a média entre as comunidades amostradas, não foi observado efeito das variáveis analisadas sobre a densidade bacteriana (Figura 3.3). Alterações ao longo do tempo dentro do mesmo tratamento (CV1xCV2xCv3; TC1xTC2xTC3; TH1xTH2xTH3) não foram detectadas nessa análise geral (Figura

3.3). A densidade bacteriana observada nos diferentes tratamentos avaliados foi entre 10^6 e 10^7 UFC g⁻¹.

Analisando cada comunidade separadamente, foi observado que a densidade bacteriana média por tratamento para a comunidade de endófitos de raiz, não apresentou diferenças relacionadas à introdução das plantas transgênicas (Figura 3.4).

Para a comunidade bacteriana da rizosfera, nos isolamentos 1 e 2, não foram observados efeitos da introdução de cana-de-açúcar IMI 1 ou do trato cultural. No entanto, no terceiro isolamento, a densidade bacteriana da rizosfera das plantas TC foi significativamente menor quando comparada com CV e também quando comparada com TH (Figura 3.5). Dessa maneira, foi possível notar que, em 17 meses (isolamento 3 – Figura 3.5C), o cultivo da planta transgênica, bem como o trato cultural diferenciado (a aplicação do herbicida Imazapyr) podem ter resultado na redução da densidade bacteriana associada a rizosfera de cana-de-açúcar.

Figura 3.3 - Densidade média bacteriana de diferentes isolamentos de plantas de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas para resistência a herbicida. Os dados foram transformados para Log (UFC+2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância (CV1xCV2xCV3; TC1xTC2xTC3 e TH1xTH2xTH3)

Figura 3.4 - Densidade média bacteriana de diferentes isolamentos de endófitos de raiz (isolamento 1 – A; isolamento 2 – B; isolamento 3 – C) de plantas de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas para resistência a herbicida. Os dados foram transformados para Log (UFC +2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância (CVxTC e TCxTH para cada isolamento)

Figura 3.5 - Densidade média bacteriana de diferentes isolamentos de rizosfera (isolamento 1 – A; isolamento 2 – B; isolamento 3 – C) de plantas de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas para resistência a herbicida. Os dados foram transformados para Log (UFC +2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância (CVxTC e TCxTH para cada isolamento)

Os efeitos da introdução da planta transgênica podem ter sido observados sobre a comunidade bacteriana associada a rizosfera devido ao produto do transgene estar sendo exsudado pela raiz da planta. Não há relatos especificamente sobre o gene *ahas*, mas em outros genes já foi constatada a exsudação pela raiz do produto do transgene como, por exemplo, para o gene *Dm-AMP1*. Turrini et al. (2004) avaliaram *Solanum melongena* transformado o gene *Dm-AMP1* (proteína de atividade antifúngica) e observaram que o produto desse transgene no exsudado da raiz de plantas transgênicas ainda apresentando atividade.

Quanto ao trato cultural diferenciado, esse fator depende do tipo de planta transgênica analisada. Para plantas resistentes a herbicida, pode haver uma maior aplicação do mesmo sobre o cultivo. Por isso, é importante o estudo da estrutura, da dinâmica e das funções das populações microbianas frente às alterações de manejo de plantas transgênicas.

Para a comunidade bacteriana de solo, os resultados foram semelhantes aos observados para a comunidade endofítica da raiz, ou seja, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada (Figura 3.6).

Para as comunidades bacterianas endofíticas de raiz e do solo, não foram constatadas diferenças ao longo do tempo para cada tratamento (Figuras 3.7A e 3.7C). No entanto, foi possível notar que o tempo foi um fator que influenciou a densidade bacteriana associada a rizosfera (Figura 3.7). Para os tratamentos CV e TC, a densidade bacteriana apresentou uma redução após 17 meses de cultivo. Enquanto que as plantas TH apresentaram uma diminuição persistente da densidade bacteriana ao longo das épocas amostradas (Figura 3.7B).

Figura 3.6 - Densidade média bacteriana de diferentes isolamentos de solo (isolamento 1 – A; isolamento 2 – B; isolamento 3 – C) de plantas de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas para resistência a herbicida. Os dados foram transformados para Log (UFC +2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância (CVxTC e TCxTH para cada isolamento)

Figura 3.7 - Densidade média bacteriana de diferentes comunidades (endófitos de raiz – A; rizosfera – B; solo – C) de plantas de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas para resistência a herbicida. Os dados foram transformados para Log (UFC +2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância (CV1xCV2xCV3; TC1xTC2xTC3 e TH1xTH2xTH3 para cada comunidade)

Interessante notar que efeitos transientes de PGMs relacionados a tempo foram observados por outros autores (DUNFIELD; GERMIDA, 2003; HEUER et al., 2002; SMALLA et al., 2001), mas no presente trabalho foi observado um efeito contínuo que foi maior na última avaliação. Mulder et al. (2006) detectaram a influência da planta transgênica sobre a composição da comunidade microbiana nas primeiras 72 horas, porém, em uma avaliação posterior (três semanas), as diferenças na comunidade bacteriana de plantas transgênicas e não transgênicas não puderam mais ser detectadas.

Foi constatada uma diferença de densidade entre as comunidades amostradas, pois o tecido vegetal ou o nicho associado da planta são um dos muitos fatores que podem afetar a interação planta – microrganismos (MOCALI et al., 2003). A densidade de endófitos de raiz é menor (em torno de 10^5 UFC g⁻¹ de raiz) em relação às comunidades de rizosfera e de solo (10^7 UFC g⁻¹ de raiz e de solo respectivamente).

Em um estudo sobre os efeitos de alfafa geneticamente modificada com o gene que codifica lignina peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium*, Donegan et al. (1999) observaram diferenças na densidade e diversidade bacteriana. Uma maior densidade de bactérias foi associada às plantas transgênicas, bem como variações na densidade de grupos funcionais como bactérias degradadoras de celulose. Devido à complexidade da interação microrganismo-planta, é necessário um estudo sobre a diversidade bacteriana associada a plantas geneticamente modificadas.

3.3.2 Avaliação da Diversidade dos Isolados Associados à Cana-de-Açúcar IMI 1

3.3.2.1 Análise da comunidade bacteriana cultivada

Os isolados bacterianos obtidos de cana-de-açúcar foram caracterizados pela técnica de ARDRA, a qual facilita a identificação e o estudo das populações de bactérias, pois é rápida, de baixo custo e reproduzível (VENTURA et al., 2001).

Foram feitos três isolamentos de um experimento com três tratamentos (plantas CV – convencionais tratadas com capina; TC - transgênicas com capina e TH - transgênicas com aplicação de herbicida). Foram analisados 268 isolados endofíticos de colmo e de solo, os quais representam 47% das bactérias amostradas e foram determinados 12 ribotipos. O número de ribotipos distintos por tratamento encontrado dentro de cada comunidade está disposto na Tabela 3.1.

O efeito da introdução das plantas transgênicas (CVxTC) ou o efeito do trato cultural (TCxTH) para os endófitos de colmo foi observado (Figura 3.8), mas em nenhum dos casos o efeito foi mantido ao longo das três amostragens. Os ribotipos 1 e 10 não puderam ser observados em plantas TH no primeiro isolamento (Figura 3.8A), sugerindo que o efeito do trato cultural diferenciado foi maior que o efeito da introdução da cana-de-açúcar transgênica para esses ribotipos. Nos isolamentos 2 e 3, esse efeito não pode mais ser notado (Figura 3.8B e C). Bactérias do ribotipo 7 somente foram isoladas de plantas CV, portanto, sua presença foi afetada pelo cultivo de cana-de-açúcar transgênica (Figura 3.8).

Tabela 3.1 - Número de ribotipos encontrados nos diferentes tratamentos para cada comunidade (dados médios dos três isolamentos realizados)

	Número de ribotipos diferentes observados		Número total de isolados analisados	
	Colmo	Solo	Colmo	Solo
CV	11	10	55	33
TC	11	9	63	40
TH	8	8	40	37

Quanto aos isolamentos, isto é, épocas de amostragens ou estados fisiológicos da planta, alguns ribotipos foram afetados. O ribotipo 4 somente foi observado nos isolamentos 2 e 3, enquanto que o ribotipo 9 só foi observado no isolamento 2.

Em solo, o efeito da introdução das plantas transgênicas (CVxTC) e/ou o efeito do trato cultural (TCxTH) pode ser notado em alguns ribotipos (Figura 3.9). O ribotipo 3 não foi isolado de plantas TC nos dois primeiros isolamentos (Figura 3.9A e B). O ribotipo 5 estava presente nos três tratamentos no primeiro isolamento, no entanto, nos isolamentos 2 e 3, não pôde ser isolado de plantas CV, evidenciando um possível efeito da expressão do transgene sobre a colonização desse ribotipo (Figura 3.9B e C). O mesmo pôde ser observado para o ribotipo 8 nos isolamentos 1 e 2 e para o ribotipo 10 no isolamento 1, sendo que esses ribotipos somente foram isolados de plantas transgênicas.

Quanto aos diferentes estados fisiológicos da planta amostrados, os ribotipos 1, 2, 6, 9 10, 11 e 12 foram ausentes em todos os tratamentos para algum isolamento. Ou seja, um número grande de ribotipos responde às alterações decorrentes do tempo no solo independente do tipo de tratamento (Figura 3.9).

Figura 3.8 - Distribuição dos 12 ribotipos nos tratamentos CV, TC e TH para os três isolamentos realizados (isolamento 1 - A; isolamento 2 - B e isolamento 3 - C) de bactérias endofíticas de colmo. O número de isolados pertencentes a cada ribotipo foi convertido para porcentagem considerando-se como total o número de isolados analisados para cada tratamento

Figura 3.9 - Distribuição dos 12 ribotipos nos tratamentos CV, TC e TH para os três isolamentos realizados (isolamento 1 - A; isolamento 2 - B e isolamento 3 - C) de bactérias do solo. O número de isolados pertencentes a cada ribotipo foi convertido para porcentagem considerando-se como total o número de isolados analisados para cada tratamento

Na comunidade bacteriana do colmo, os efeitos de introdução de plantas transgênicas bem como o efeito do trato cultural diferenciado foram observados nos isolamentos 1 e 3 (Figura 3.10A e C) já que o tratamento TC ficou separado do grupo formado pelos tratamentos CV e de TH. Aos 10 meses, isto é, no segundo isolamento, o tratamento CV foi diferente do tratamento TC, o qual foi similar a TH (Figura 3.10B), mostrando que neste caso o fator de variação mais importante foi o evento da transgenia.

Para solo os resultados foram semelhantes a colmo nos isolamentos 2 e 3 (Figura 2.10E e F). No entanto, no isolamento 1, o tratamento TH foi diferente de TC e CV evidenciando o efeito do trato cultural. O primeiro isolamento foi realizado poucos meses após a aplicação do herbicida Imazapyr. Dessa maneira, foi possível notar o efeito da aplicação do herbicida sobre a diversidade bacteriana associada ao solo de cana-de-açúcar transgênica (Figura 2.10D).

Outros autores constataram a alteração da diversidade bacteriana como consequência da introdução de PGMs. Foi observado um aumento de microrganismos produtores de oxidases, lipases, celulasas entre outras enzimas no solo associado a plantas de mamão transgênica com uma replicase mutante do vírus PRSV (WEI et al., 2006). A presença dos ribotipos diferentemente distribuída entre os tratamentos analisados nesse trabalho pode resultar em alterações na atividade bacteriana dessas plantas, uma vez que esses ribotipos podem representar grupos funcionais importantes. Os microrganismos estão envolvidos na ciclagem de nutrientes, nos processos de transformação e na formação de agregados nos solos, na patologia e na promoção de crescimento de planta (BUCKLEY; SCHMIDT, 2003). Neste contexto, é importante o estudo da estrutura, da dinâmica e das funções das populações microbianas, pois essas são chaves da preservação e da melhoria de qualidade e produtividade agrícolas (BUCKLEY; SCHMIDT, 2001).

Figura 3.10 - Dendrograma de similaridade entre os tratamentos para as comunidades de colmo (A-C) e solo (D-F). A similaridade entre os tratamentos para os isolamentos 1 (A e D), 2 (B e E) e 3 (C e F) foi baseada na presença e ausência dos 12 ribotipos. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o software NTSYSpc versão 2.1

3.3.2.2 Análise da comunidade bacteriana por meio de DGGE

Focando o grupo de *Methylobacterium* como modelo de bactéria na interação com cana-de-açúcar, foram feitas análises dessa comunidade com a técnica independente de cultivo, DGGE. A partir dos perfis obtidos foram realizadas análises de CCA qualitativo, considerando os três isolamentos (Figura 3.11), e PCA qualitativo para cada isolamento (Figura 3.12).

A análise multivariada em estudos de comunidades bacterianas tem como principal vantagem a avaliação conjunta de vários fatores envolvidos na determinação da composição das comunidades bacterianas. Os fatores determinantes da comunidade de bactérias de solo foram os primeiros a serem estudados utilizando esta estratégia (STEENWERTH et al., 2002). A influência do histórico do solo e do cultivo de diferentes espécies de plantas na determinação da comunidade de *Burkholderia* spp. também foi estudada por meio da utilização da análise multivariada (SALLES et al., 2004). Em um estudo de avaliação dos principais componentes da população de *Pseudomonas* spp. na rizosfera de plantas os autores determinaram, por análise multivariada, o efeito rizosférico como determinante da composição da população de *Pseudomonas* spp. ao invés dos locais de cultivo (COSTA et al., 2006).

Figura 3.11 - Análise de PCR-DGGE em amostras de rizosfera de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas. Os perfis obtidos geraram uma análise de CCA qualitativa comparando os diferentes fatores que determinam a composição da comunidade bacteriana em todos os isolamentos realizados. Todas as variáveis ambientais utilizadas são apresentadas, porém as indicadas com * foram significantes ($p < 0.05$) utilizando o teste de permutação de MonteCarlo. Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos

Figura 3.12 - Análise de PCR-DGGE em amostras de rizosfera de cana-de-açúcar convencionais e transgênicas. Os perfis obtidos geraram uma análise de PCA qualitativa comparando os diferentes fatores que determinam a composição da comunidade bacteriana no primeiro (A), no segundo (B) e no terceiro isolamento (C). Os valores nos eixos indicam a porcentagem da variância dos dados explicada pela distribuição das amostras nos respectivos eixos

A análise de CCA mostrou que todos os fatores avaliados são fonte de variação. Isto é, época de amostragem (Isolamento1, 2 e 3) e tratamentos (CV, TC e TH) são significativamente diferentes (Figura 3.11). Na análise de cada isolamento, fica nítida a redução da diversidade entre os tratamentos. No primeiro isolamento, é possível distinguir os tratamentos em campos diferentes do gráfico (Figura 3.12A), no segundo isolamento, a visualização da separação dos tratamentos fica menor (Figura 3.12B) e no terceiro, é impossível distinguir os diferentes tratamentos (Figura 3.13C). Esses são distribuídos nas mesmas áreas do gráfico evidenciando a homogeneidade entre eles de acordo com os perfis de DGGE.

Dados diferentes foram discutidos em trabalho com a comunidade endofítica de soja (KUKLINSKY-SOBRALE et al., 2005). Os autores observaram um aumento da diversidade ao longo do tempo, ou seja, com a permanência da cultura no campo, mostrando que a época de amostragem pode ser um fator importante para a avaliação da diversidade de bactérias associadas à planta hospedeira e é dependente do tipo de planta em estudo.

Por meio de DGGE e utilizando a comunidade de *Methylobacterium* como modelo não foi possível identificar efeito da transgênese sobre a comunidade microbiana.

Referências

- ARAUJO, W. L.; MACCHERONI, 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, n. 3, p. 229-236, 2001.
- ANDREOTE, F. D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas**. 2007. 203p. Tese (Doutorado na área de Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2007.
- ARAUJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, 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**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

ASAO, H.; ARAI, S.; NISHIZAWA, Y. Environmental risk evaluation of transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. **Seibutsu-Kogaku Kaishi**, Osaka, v. 81, n. 2, p. 57-63, 2003.

BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. **Microbial Ecology**, Oxford, v. 42, n. 6, p. 11-21, 2001.

BUCKLEY, D. H.; SCHMIDT, T. M. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. **Environmental Microbiology**, New York, v. 5, n. 1, p. 441-452, 2003.

CERVANTES-MARTINEZ, J.; LOPEZ-DIAZ, S.; RODRIGUEZ-GARAY, B. Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence. **Plant Science**, Limerick, v. 166, p. 889-892, 2004.

COSTA, R.; GOMES, N. C. M.; PEIXOTO, R. S.; RUMJANEK, N.; BERG, G.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S.; SMALLA, K. Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. **Soil Biology and Biochemistry**, New York, v. 38, n. 8, p. 2434-2447, 2006.

DONEGAN, K. K.; SEIDLER, R. J.; DOYLE, J. D.; PORTEOUS, L. A.; DIGIOVANNI, G.; WIDMER, F.; WATRUD, L. S. A field study with genetically engineered alfalfa inoculated with recombinant *Sinorhizobium meliloti*: effects on the soil ecosystem. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 920-936, 1999.

DUNFIELD, K. E.; GERMIDA, J. J. Seasonal changes in the rhizosphere microbial communities associated with field-grown genetically modified canola (*Brassica napus*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7310-7318, 2003.

FANG, M.; KREMER, R. J.; MOTAVALLI, P. P.; DAVIS, G. Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 7, p. 4132-4136, 2005.

HALLMANN, J.; QUADTHALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HEUER, H.; KROPPESTEDT, R. M.; LOTTMANN, J.; BERG, G.; SMALLA, K. Effects of T4 lysozyme release from transgenic potato roots on bacterial rhizosphere relative to communities are negligible natural factors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1325-1335, 2002.

KUKLINSKY-SOBRAI, H. L.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, The Hague, v. 273, n. 1-2, p. 91-99, 2005.

KUKLINSKY-SOBRAI, 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, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

LACAVA, P. T.; ARAUJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, W.; AZEVEDO, J. L. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 55-59, 2004.

LIU, B.; ZENG, Q.; YAN, F. M.; XU, H. G.; XU, C. R. Effects of transgenic plants on soil microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 271, n. 1/2, p. 1-13, 2005.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, H. S.; HARI, K.; SUNDARAM, S. P.; SA, T. M. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 41, n. 5, p. 350-358, 2005.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, n. 2, p. 105-114, 2003.

MULDER, C.; WOUTERSE, M.; RAUBUCH, M.; ROELOFS, W.; RUTGERS, M. Can transgenic maize affect soil microbial communities? **Plos Computational Biology**, San Francisco, v. 2, n. 9, p. 1165-1172, 2006.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 7, p. 2764-2769, 1996.

PIRTTILA, A. M.; POSPIECH, H.; LAUKKANEN, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Seasonal variations in location and population structure of endophytes in buds of Scots pine. **Tree Physiology**, Victoria, v. 25, n. 3, p. 289-297, 2005.

PROCÓPIO, R.E.L. **Diversidade bacteriana endofítica de *Eucaliptus* spp. e avaliação do seu potencial biotecnológico**. 2004. 101 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo/Instituto Butantan/ Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2004.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, n. 3, p. 167-177, 2000.

RASCHE, F.; HODL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABEK, M. H.; VAN ELSAS, J. D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 219-235, 2006.

ROSENBLUETH, M.; MARTINEZ, L.; SILVA, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 27, n. 1, p. 27-35, 2004.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 1, n. 1, p. 24-33, 2005.

SALLES, J. F.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Multivariate analyses of *Burkholderia* species in soil: effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 7, p. 4012-4020, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDHIYA, G. S.; SUGITHA, T. C. K.; BALACHANDAR, D.; KUMAR, K. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 43, n. 9, p. 802-807, 2005.

SEGHERS, D.; WITTEBOLLE, L.; TOP, E. M.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S. D. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1475-1482, 2004.

SICILIANO, S. D.; GERMIDA, J. J. Taxonomic diversity of bacteria associated with the roots of field-grown transgenic *Brassica napus* cv. Quest, compared to the non-transgenic *B. napus* cv. Excel and *B. rapa* cv. Parkland. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 263-272, 1999.

SICILIANO, S. D.; THEORET, C. M.; DE FREITAS, J. R.; HUCL, P. J.; GERMIDA, J. J. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 9, p. 844-851, 1998.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.; ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 4742-4751, 2001.

STEENWERTH, K. L.; JACKSON, L. E.; CALDERON, F. J.; STROMBERG, M. R.; SCOW, K. M. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California. **Soil, Biology and Biochemistry**, New York, v. 34, n. 11, p. 1599-1611, 2002.

TAN, S.; EVANS, R. R.; DAHMER, M. L.; SINGH, B. K.; SHANER, D. L. Imidazolinone tolerant crops: history, current status and future. **Pest Management Science**, Sussex, v. 61, n. 3, p. 246-257, 2005.

TATLI, F.; GULLU, M.; OZDEMIR, F. Determination of fungi species, relationship between ear infection rates and fumonisin quantities in Bt maize. **IOBC WPRS BULLETIN**, Athens, v. 27, n. 3, p. 161-164, 2004.

TER BRAAK, C. J. F., SMILAUER, P. **CANOCO Reference manual and CanoDraw for Windows user's guide**: software for canonical community ordination. Version 4.5. 2002. 500 p.

TURRINI, A.; SBRANA, C.; PITTO, L.; CASTIGLIONE, M. R.; GIORGETTI, L.; BRIGANTI, R.; BRACCI, T.; EVANGELISTA, M.; NUTI, M. P.; GIOVANNETTI, M. The antifungal Dm-AMP1 protein from *Dahlia merckii* expressed in *Solanum melongena* is released in root exudates and differentially affects pathogenic fungi and mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, Cambridge, v. 163, n. 2, p. 393-403, 2004.

VENTURA, M.; ELLI, M.; RENIERO, R.; ZINK, R. Molecular microbial analysis of *Bifidobacterium* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 36, n. 2/3, p. 113-121, 2001.

WEI, X. D.; ZOU, H. L.; CHU, L. M.; LIAO, B.; YE, C. M.; LAN, C. Y. Field released transgenic papaya effect on soil microbial communities and enzyme activities. **Journal of Environmental Sciences-China**, v. 18, n. 4, p. 734-740, 2006.

WU, W. X.; YE, Q. F.; MIN, H. Effect of straws from Bt transgenic rice on selected biological activities in water-flooded soil. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 40, n. 1, p. 15-22, 2004.

AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR
Methylobacterium extorquens e *M. mesophilicum*

4 AVALIAÇÃO DA COLONIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR *Methylobacterium extorquens* e *M. mesophilicum*

Resumo

Estudos têm mostrado que o gênero *Methylobacterium* é um importante endófito que coloniza citros, pinus; soja; crotalária, algodão, arroz, tabaco, tomate, morango entre outras plantas. Em cana-de-açúcar, foi mostrado que a inoculação de *Methylobacterium* pode melhorar a germinação de sementes, promover um aumento do peso da planta e da área foliar, além do número de internódios. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi monitorar a colonização de cana-de-açúcar por *M. extorquens* e *M. mesophilicum*. Para este estudo, foram utilizadas duas linhagens endofíticas selvagens: AR1.6/2 e SR1.6/6 e dois marcados com o gene da proteína verde fluorescente GFP: ARGFP e SRGFP. Primeiramente, foram montados experimentos com plantas de cana-de-açúcar *in vitro*. Por meio da microscopia eletrônica de varredura, foi observado que os pontos de maior colonização são os espaços entre as células epidérmicas, chamados de flanges cuticulares e, de maneira geral, as linhagens colonizam as regiões pilosas da raiz. Por meio de reisolamento em meio de cultura, foi observado que as linhagens estudadas colonizam efetivamente o rizoplane e os tecidos internos de raiz e da parte aérea da planta. Na última leitura, 17 dias após o inóculo, as linhagens permaneceram em densidade maior, preferencialmente em um dos tecidos amostrados, com exceção da SRGFP que permaneceu em todos os tecidos de forma homogênea. As linhagens ARGFP e SRGFP apresentaram um padrão de colonização diferente da selvagem e perderam a fluorescência após introdução na planta hospedeira. Foram analisados mais dois ambientes de crescimento: superfície de madeira e plantas em casa de vegetação. As linhagens ARGFP e SRGFP mostraram uma alta fluorescência em fragmentos de madeira. Em mudas de 4 meses em casa de vegetação, os resultados foram semelhantes aos obtidos nas plantas *in vitro* quanto a análise de isolamento em meio de cultivo, mas as linhagens transformadas apresentaram colonização diferenciada e a manutenção da fluorescência em até 40 dias após o inóculo. O monitoramento da colonização de *Methylobacterium* em plantas de cana-de-açúcar por meio do gene repórter *gfp* foi prejudicada devido à baixa fluorescência detectada quando as linhagens foram inoculadas em cana-de-açúcar *in vitro* e à apresentação de variações frente às diferentes condições analisadas nesse trabalho. É possível que a heterogeneidade das células bacterianas nas populações trabalhadas tenha respondido diferentemente frente às perturbações do ambiente.

Palavras – chave: *Methylobacterium*; Cana-de-açúcar; GFP

4 ASSESMENT OF SUGARCANE COLONIZATION BY *Methylobacterium extorquens* AND *M. mesophilicum*

Abstract

Studies have shown that the *Methylobacterium* gender is an important endophyte that colonizes citrus, pinus, soy, crotalaria, cotton, rice, tobacco, tomato, strawberry among other plants. In sugar cane it was shown that the inoculation of *Methylobacterium* can improve the germination of seeds, promote the growth of the plant weigh and the foliar area besides the number of internodes. Thus, the objective of this work was to monitor the colonization of sugarcane by *M. extorquens* and *M. mesophilicum*. For this study two wild endophytic lineages were utilized: AR1.6/2 and SR1.6/6 and two markers with the gene of green fluorescent protein GFP. Firstly, experiments with sugarcane plants *in vitro* were made. By means of scanning electronic microscopy it was observed that the higher colonization spots are the ones between epidermis cells, which are called cuticle flange, and in general, the lineages colonize the pilous regions of the root. By means of re-isolation in culture environment it was observed that the lineages studied colonize effectively the rizoplane and internal tissues of the root and the aerial part of the plant. In the last reading 17 days after inoculation, the lineages continued in higher density preferably in one of the sampled tissues with exception to SRGFP that kept itself in an homogeneous way in all tissues. The ARGFP and SRGFP lineages presented a different standard of colonization of the wild and lost the fluorescence after the host plant introduction. Two more growth environments were analyzed: wood surface and plants in vegetation house. The ARGFP and SRGFP lineages showed a high fluorescence in wood fragment. In 4-month seedlings in vegetation house the results were similar to the ones obtained with plants *in vitro* in relation to the analysis of isolation in cultivation environment, but the transformed lineages showed differentiated colonization and the fluorescence maintenance up to 40 days after inoculation. The monitoring of *Methylobacterium* colonization with sugar cane plants by means of reporter gene *gfp* was damaged due to the low fluorescence detected when the lineages were inoculated in sugarcane *in vitro* and to the presentation of variations in the different conditions analyzed in this work. It is possible that the heterogeneity of the bacterial cells in the population of the work have responded differently to environment disturbances.

Keywords: *Methylobacterium*; Sugarcane, GFP

4.1 Introdução

A cana-de-açúcar possui grande importância no Brasil, sendo cultivada no país em vários tipos de ambientes com diversidade de clima e de solo (MAULE; MAZZA; MARTHA JR, 2001). Essa cultura tem seu lugar de destaque na economia brasileira devido à produção açucareira, primeiramente (SZMRECSÁNYI; MOREIRA, 1991), e a produção de álcool; a partir de 1970 houve o incentivo do governo federal para que as agroindústrias canavieiras auxiliassem na tentativa de solucionar a crise energética emergente, frente à potencialidade da cana-de-açúcar como fonte de energia renovável (BARELA, 2005). Tem sido observado atualmente uma tendência de aumento da área para as futuras safras de cana-de-açúcar, motivada pelo interesse crescente na obtenção do álcool combustível.

Os endófitos são microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro ou formar estruturas externas visíveis (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Em relação aos seus benefícios na agricultura, durante a evolução das plantas, associações mutualísticas com microrganismos endofíticos ocorreram e, atualmente, esses microrganismos promovem adaptações relacionadas à capacidade de defesa da planta contra o ataque de insetos, microrganismos e animais herbívoros (LIU et al., 2001). Assim, os microrganismos endofíticos podem ser usados no controle biológico de patógenos ou para a promoção de crescimento de plantas, sendo por esse motivo, bastante estudada a interação entre a comunidade endofítica e a planta hospedeira (HALLMANN et al., 1997; LODIEWYCKX et al., 2002; RUBINI et al., 2005).

Methylobacterium é um gênero importante de endófitos que interagem com citros (ARAUJO et al., 2002); pinus (PIRTTILA et al., 2000); soja (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004); crotalária (SY et al., 2001), algodão (MADHAIYAN et al., 2006), arroz (MADHAIYAN et al., 2007), tabaco, morango, tomate (ABANDA-NKPWATT et al., 2006) entre outras plantas. Em cana-de-açúcar, Cervantes-Martinez, Lopez-Diaz e Rodriguez-Garay (2004) atribuíram à *Methylobacterium* sp. o aumento na atividade fotossintética devido ao aumento no número de estômatos, concentração de clorofila e conteúdo de ácido málico. Um isolado de *M. extorquens* chamado ME4 foi testado e

mostrou habilidade de promover crescimento em *Nicotiana tabacum*, *Lycopersicon esculentum*, *Sinapis alba*, e *Fragaria vesca*, mas não apresentou ganho aparente quando em avaliação com outras 6 espécies vegetais (ABANDA-NKPWATT et al., 2006), no entanto um maior número de estudos em *Methylobacterium* spp. são necessários para melhor aproveitá-las como promotoras de crescimento vegetal (MADHAIYAN et al., 2006).

Recentemente, o estudo das bactérias tem assumido outro foco, da célula para os agregados. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) tem sido o método utilizado para o estudo de pequenos aglomerados de células bacterianas (FUJISHIGE; KAPADIA; HIRSCH, 2006). Não somente o desenvolvimento de métodos microscópicos, mas também a utilização de sondas fluorescentes, hibridização fluorescente *in situ* e a utilização de genes repórter, como o gene da *Green Fluorescent Protein* (GFP) têm auxiliado no avanço desses estudos (WAGNER; HORN; DAIMS, 2003). Os biofilmes bacterianos são encontrados em muitas plantas como estratégia de colonização da filosfera e da rizosfera (KNEE et al., 2001). A maioria dos estudos sobre biofilmes rizosféricos tem abordado *Pseudomonas fluorescens*, utilizada como agente de controle biológico e *Azospirillum brasilense*, bactéria promotora de crescimento vegetal (FUJISHIGE; KAPADIA; HIRSCH, 2006).

Dessa forma, considerando a grande importância da cultura da cana-de-açúcar e o potencial benéfico de *Methylobacterium* spp., o objetivo desse trabalho foi estudar a colonização de cana-de-açúcar por *Methylobacterium extorquens* e *Methylobacterium mesophilicum* por meio de isolamento e microscopia de fluorescência e eletrônica de varredura.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Linhagens utilizadas

Foram utilizadas *Methylobacterium extorquens* (AR1.6/2) e *M. mesophilicum* (SR1.6/6) selvagens (ARAUJO et al., 2002) e geneticamente modificadas, ARGFP e SRGFP respectivamente, expressando o gene da GFP. Na transformação, foi utilizado o plasmídeo pCM88 gentilmente cedido por Mary E. Lidstrom (Departments of

Microbiology-University of Washington, Seattle – USA). Este plasmídeo expressa o gene da GFP sob controle do promotor LacZ, possui resistência a tetraciclina e origem de replicação para bactérias metanogênicas (Marx & Lidstrom, 2001). As linhagens selvagens e as transformadas pertencem à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos “Prof. João Lúcio de Azevedo”, Departamento de Genética, ESALQ/USP.

Para o inóculo dessas quatro linhagens durante a execução dos experimentos, as mesmas foram cultivadas em 5 mL de meio CHOI 3 (TOYAMA; ANTHONY; LIDSTROM, 1998) por até 96 horas sob agitação (150 rpm) a 28°C.

4.2.2 *Material vegetal*

As plantas *in vitro* e as mudas em tubetes foram gentilmente cedidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, SP., as plantas *in vitro* utilizadas eram da variedade de cana-de-açúcar convencional SP80 3280 e estavam em F3 na cultura *in vitro* enquanto as mudas eram da variedade SP80 1842 e tinham quatro meses quando foram utilizadas.

4.2.3 *Delineamento experimental*

4.2.3.1 Experimento 1 – visualização da colonização de *Methylobacterium* em plantas de cana-de-açúcar *in vitro* por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com o objetivo de visualizar se as linhagens de *Methylobacterium* utilizadas nesse trabalho estabeleciam interação com as plantas de cana-de-açúcar, foi montado um experimento com plantas *in vitro*. As plantas recebidas da CTC foram colocadas em tubos contendo 7 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Esse meio foi inoculado com uma suspensão bacteriana para uma concentração final de 10^3 UFC mL⁻¹ e 2 e 6 dias após esse procedimento, fragmentos das raízes das plantas foram coletados e preparados para visualização em MEV. Esse experimento foi montado com cinco tratamentos (controle, AR1.6/2, ARGFP, SR1.6/6 e SRGFP), inteiramente casualizado com três repetições para cada tratamento.

4.2.3.2 Experimento 2 – quantificação por isolamento em meio de cultura da colonização de *Methylobacterium* em cana-de-açúcar *in vitro* e sua visualização por microscopia óptica de fluorescência (MOF)

A colonização de AR1.6/2, ARGFP, SR1.6/6 e SRGFP em plantas de cana-de-açúcar foi avaliada *in vitro*, para isso, as plantas recebidas da CTC foram colocadas em tubos Falcon de 50 mL contendo 7 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Esse meio foi inoculado com uma suspensão bacteriana para uma concentração final de 10^5 UFC mL⁻¹ e os tubos foram mantidos a 28° C em estufa com fotoperíodo de 16 horas de luz. Portanto, esse experimento foi montado com 5 tratamentos (controle, AR1.6/2, ARGFP, SR1.6/6 e SRGFP) e três leituras: 2, 10 e 17 dias após a inoculação. O experimento foi inteiramente casualizado, nas datas de leitura, foram coletados materiais para o isolamento e para a visualização em MOF (3 plantas de cada tratamento para cada análise).

4.2.3.3 Experimento 3 – visualização da colonização de *Methylobacterium* por MOF em palitos de madeira

Para a confirmação dos dados obtidos, foi montado um experimento para visualização da colonização de *Methylobacterium* sobre madeira. Palitos comerciais de madeira foram colocados em tubos Falcon de 50 mL contendo 7 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Esse meio foi inoculado com uma suspensão bacteriana para uma concentração final de 10^5 UFC mL⁻¹ e os tubos foram mantidos a 28° C em estufa com fotoperíodo de 16 horas de luz. Portanto, esse experimento foi montado com 5 tratamentos (controle, AR1.6/2, ARGFP, SR1.6/6 e SRGFP) e três leituras: 1, 3 e 10 dias após a inoculação. Nas datas de leitura, foram coletados materiais para a visualização em MOF. O experimento foi inteiramente casualizado com 3 palitos de cada tratamento para cada leitura.

4.2.3.4 Experimento 4 - quantificação da colonização de *Methylobacterium* em cana-de-açúcar em casa de vegetação e visualização por MOF

Para a comparação dos dados obtidos em plantas *in vitro*, foi montado um experimento na casa de vegetação. As mudas tiveram parte de suas raízes cortadas e, em seguida, as plantas tiveram sua parte radicular mergulhada em uma suspensão bacteriana de 10^7 UFC mL⁻¹ e foram mantidas desse modo por 3 horas. Após esse período, as mudas foram transferidas para vasos contendo 1 kg de substrato Plant Max (Eucatex). Portanto, esse experimento foi montado com 5 tratamentos (controle, AR1.6/2, ARGFP, SR1.6/6 e SRGFP) e foram realizadas 3 leituras: 4, 10 e 40 dias após a inoculação. Nas duas primeiras datas de leitura, foram coletados materiais para o isolamento das linhagens em meio de cultura e para a visualização em MOF. Na última leitura, só foi realizada a visualização em MOF. O experimento foi inteiramente casualizado com 3 plantas de cada tratamento para cada leitura.

4.2.4 Quantificação por reisolamento das linhagens em meio de cultura

4.2.4.1 Reisolamento de plantas *in vitro*

Primeiramente, as plantas amostradas foram colocadas em novo tubo Falcon de 50 mL com 2 mL de tampão PBS (140mM de NaCl, 3mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄ e 2mM de KH₂PO₄, pH 7,4) e foram mantidas sob agitação a 120 rpm por 1 hora afim de reisolar as bactérias que se mantiveram aderidas à superfície da raiz (rizoplano). Esse tampão foi diluído e semeado para a quantificação de bactérias. Posteriormente, foi feita a assepsia superficial dessas mesmas plantas e fragmentos da parte aérea e da raiz foram cortados, pesados e triturados. A suspensão resultante foi diluída e semeada sobre meio CHOI 3 suplementado com benomyl (50µg mL⁻¹) e incubado a 28°C.

4.2.4.2 Reisolamento das plantas na casa de vegetação

Para a obtenção de colônias do rizoplasma, as raízes foram retiradas das plantas e agitadas vigorosamente para que o excesso de substrato fosse retirado. Foram pesados quatro gramas desse material e foram agitados por 1 hora em frasco *erlenmeyer* contendo 50 mL de tampão PBS e esferas de vidro (0,2 cm de diâmetro). A suspensão obtida foi diluída apropriadamente, semeada em meio CHOI suplementado com benomyl ($50\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubada a 28°C .

As mesmas raízes utilizadas para o isolamento de rizoplasma foram utilizadas para o isolamento de bactérias endofíticas. As raízes foram desinfetadas superficialmente em uma série de etanol 70% (1 min), hipoclorito de sódio 2% (3 min) e etanol 70% (30 seg), seguido de duas lavagens em água destilada. Dois gramas do material foram cortados em pequenos fragmentos e triturados em tampão PBS. Essa suspensão obtida foi diluída apropriadamente e semeada em meio CHOI 3 suplementado com benomyl ($50\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubado a 28°C .

Para isolamento da parte aérea, a base do colmo foi retirada das plantas e a desinfecção superficial foi realizada por meio da seguinte série: 1 min em etanol 70 %, 2 min em hipoclorito, 30 seg em etanol 70 %, seguido de dois banhos em água destilada. As extremidades do fragmento do colmo foram retiradas e o pedaço central resultante foi pesado, cortado em pequenos fragmentos e triturados em 2 mL de tampão PBS. A suspensão foi diluída apropriadamente e 100 μL foram semeados em meio CHOI 3 suplementado com benomyl ($50\mu\text{g mL}^{-1}$) e incubado a 28°C .

4.2.5 Observações em microscópio óptico de fluorescência (MOF)

Os materiais analisados por MOF foram simplesmente dispostos em lâmina com água e visualizados imediatamente. Quando a análise requereu cortes, os mesmos foram feitos manualmente à fresco. A captura da imagem foi realizada pela câmera CCD acoplada ao Microscópio de Fluorescência Axiophot, utilizando-se filtro de 365nm para excitação em luz ultravioleta.

4.2.6 Observações em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras vegetais coletadas para a MEV foram colocadas em fixador glutaraldeído. Posteriormente, foi feita a desidratação em série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) e a secagem em ponto crítico (aparelho de secagem CPD 050 - Balzers). Após a cobertura com o ouro (metalizador MED 010 - Balzers), as amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO-Zeiss) no NAP/MEA (ESALQ/USP).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Análise da ocorrência de interação entre as linhagens em estudo de *Methylobacterium* e cana-de-açúcar *in vitro* por MEV

A formação de biofilme é um evento importante para o estabelecimento da interação entre bactérias e a planta hospedeira, permitindo a sua proteção contra variações físico-químicas do ambiente, bem como uma maior interação com outros microrganismos. A configuração do biofilme varia desde biofilmes planos, relativamente sem traços característicos, a agregados agrupados, em arranjos celulares heterogêneos e complexos.

A colonização e possível formação de biofilme de AR1.6/2, ARGFP, SR1.6/6 e SRGFP sobre as raízes de cana-de-açúcar foi avaliada. Foram feitas observações ao MEV dois e seis dias após a inoculação das plantas (Figuras 4.1 e 4.2 respectivamente). Por meio dessa análise foi possível observar o estabelecimento das linhagens de *Methylobacterium* em estudo sobre a raiz de plantas de cana-de-açúcar. Apenas 2 dias após o inóculo já pôde ser observada a colonização de *Methylobacterium*, inclusive com a visualização de uma matriz que caracteriza o biofilme (Figura 24). Na observação feita aos 6 dias (Figura 4.2), o padrão de colonização não foi alterado, sendo possível observar de forma mais evidente os locais de maior colonização, os espaços entre as células epidérmicas chamados de flanges cuticulares (Figura 4.2A) e as regiões pilosas da raiz, instalando-se na base dos pêlos radiculares (Figura 4.2D).

Por meio dessa análise, não foram observadas diferenças significativas na colonização de cana-de-açúcar pelas diferentes linhagens analisadas. Além disso, aparentemente, o transgene adicionado em ambas as linhagens geneticamente modificadas (ARGFP e SRGFP) não afeta a capacidade das mesmas de colonizar as plantas de cana-de-açúcar.

Figura 4.1 - Colonização de *Methylobacterium* sobre superfície de raiz de cana-de-açúcar 2 dias após a inoculação. Observam-se as linhagens AR1.6/2 (A – 7320x), ARGFP (B – 11500x), SR1.6/6 (C – 7610x) e SRGFP (D – 22200x)

Os nichos bacterianos observados nesse trabalho são os mais comuns citados na literatura (MICHELI, 2001; MONIER; LINDOW, 2003). Sy et al. (2005) realizaram um trabalho com mutantes de *Methylobacterium extorquens* para a utilização de fontes de carbono, analisando se esse fato afetava o padrão da colonização dessas linhagens em *Medicago truncatula*, planta modelo para as leguminosas. Os autores observaram o estabelecimento de células de *M. extorquens* entre as células epidérmicas e na base de tricomas; esses locais fornecem proteção além do fato da base do tricoma possuir uma exsudação diferente do restante da superfície.

Figura 4.2 - Colonização de *Methylobacterium* sobre superfície de raiz de cana-de-açúcar 6 dias após a inoculação. Observam-se as linhagens AR1.6/2 (A – 2980x), ARGFP (B – 4440x), SR1.6/6 (C - 4580x) e SRGFP (D – 8520x)

4.3.2 Análise da colonização de *Methylobacterium* em cana-de-açúcar *in vitro* por meio de isolamento e microscópio óptica de fluorescência (MOF)

No experimento *in vitro*, linhagens de *Methylobacterium* foram inoculadas em plantas cultivadas em tubos Falcon em estufa com fotoperíodo de 16h de luz e mantida a 28°C. Essas plantas foram avaliadas por meio de reisolamento e MOF em três diferentes avaliações (2, 10 e 17 dias).

4.3.2.1 Análise da densidade de *Methylobacterium* em plantas *in vitro*

Nas três avaliações realizadas no experimento, foram isoladas bactérias associadas a superfície da raiz (rizoplano), endofíticas de raiz e endofíticas da parte da aérea. Como são plantas de F3 *in vitro*, não é possível classificar esse material como colmo.

Foi visto que as linhagens inoculadas em plantas de cana-de-açúcar apresentaram comportamento diferente durante a colonização do hospedeiro. A linhagem selvagem AR1.6/2 colonizou todos os tecidos amostrados nos primeiros reisolamentos (Figura 4.3A e 4.3B), não sendo posteriormente observada como endófito de raiz ou de parte aérea (Figura 4.3C). No primeiro reisolamento, essa linhagem colonizou o interior da raiz ($9,9 \cdot 10^3$ UFC g⁻¹) permanecendo em maior densidade populacional sobre o rizoplano ($2,3 \cdot 10^5$ UFC g⁻¹) e menor no interior de parte aérea ($2,8 \cdot 10^2$ UFC g⁻¹). Após 10 dias da inoculação, a população foi de $2,3 \cdot 10^6$ UFC g⁻¹ sobre a superfície de raiz; $7,5 \cdot 10^3$ UFC g⁻¹ em endófitos de raiz e $2,9 \cdot 10^5$ UFC g⁻¹ no interior da parte aérea (Figura 4.3B). E na última amostragem, essa linhagem foi reisolada somente do rizoplano ($5,7 \cdot 10^3$ UFC g⁻¹) (Figura 4.3C).

Interessante notar que a linhagem transformada apresentou um padrão de colonização diferente da selvagem. A linhagem ARGFP, colonizou a planta de uma maneira mais lenta; no primeiro reisolamento foi observado $4,1 \cdot 10^3$ UFC g⁻¹ no rizoplano e $8,8 \cdot 10^2$ UFC g⁻¹ para endófitos de raiz, não sendo observada na parte aérea (Figura 4.3A). No segundo reisolamento, ARGFP novamente não foi observada na parte aérea, mas foi mantida no rizoplano ($1,8 \cdot 10^1$ UFC g⁻¹) e como endófito de raiz ($2,27 \cdot 10^2$ UFC g⁻¹) (Figura 4.3B). No terceiro isolamento, a linhagem ARGFP estava

estabelecida na planta ($2,5 \cdot 10^2$ UFC g⁻¹ no rizoplano e $3,1 \cdot 10^4$ UFC g⁻¹ para endófitos de raiz) e pode ser reisolada do interior de parte aérea ($2,3 \cdot 10^2$ UFC g⁻¹) (Figura 4.3C).

Quanto às linhagens selvagem (SR1.6/6) e transformada (SRGFP) de *M. mesophilicum*, também foi possível notar diferença nos padrões de colonização. No primeiro reisolamento, SR1.6/6 não colonizou toda a planta, não foi reisolada de parte aérea, enquanto que a linhagem SRGFP foi observado em $7,1 \cdot 10^2$ UFC g⁻¹ nesse nicho (Figura 4.3A). No segundo reisolamento, as duas linhagens apresentaram uma pequena colonização como endófitos de parte aérea, e a linhagem SRGFP não pode ser reisolada de rizoplano. No entanto, no terceiro isolamento, as duas linhagens foram reisoladas de todos os tecidos em altas populações. Para SR1.6/6, o reisolamento mostrou uma população de $2,9 \cdot 10^2$ UFC g⁻¹ no rizoplano, $9,85 \cdot 10^4$ UFCg⁻¹ para endófitos de raiz e $9,7 \cdot 10^3$ UFC g⁻¹ para endófitos de parte aérea (Figura 4.3C). Em relação à distribuição da linhagem selvagem, SRGFP mostrou principalmente maior colonização do rizoplano, $4,3 \cdot 10^5$ UFC g⁻¹ (Figura 4.3C).

Foi visto que as bactérias analisadas colonizam rapidamente plantas de cana-de-açúcar. Após 10 dias da inoculação, com exceção da linhagem ARGFP em endofíticos de parte aérea e SRGFP no rizoplano, as linhagens permaneceram em todas as partes analisadas da planta. E, finalmente, aos 17 dias após o inóculo, as linhagens se estabeleceram de forma mais homogênea entre os diferentes nichos amostrados, com exceção da linhagem AR1.6/2, a qual não pode ser reisolada de tecidos internos da raiz e da parte aérea. Resultados diferentes foram observados por Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado (2003) estudando o comportamento de *Gluconacetobacter diazotrophicus* inoculada em plantas micropropagadas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. A colonização diminuiu drasticamente em relação à idade da planta e tal decréscimo ocorreu independentemente do genótipo da bactéria ou variedade da planta.

Dong; Iniguez e Triplett (2003) estudaram a colonização endofítica de *Klebsiella pneumoniae* em 5 diferentes plantas e constataram que um inóculo de 10^7 UFC/planta é suficiente para a obtenção da colonização, observando 10^3 UFC g⁻¹ após 6 dias da inoculação. Nesse trabalho, a concentração final do inóculo utilizado foi 10^5 UFC/planta. Esse inóculo foi suficiente para a obtenção de uma colonização das

plantas de cana-de-açúcar, mas diferentes inóculos poderiam resultar em diferentes padrões de colonização. Njoloma et al. (2005) utilizaram 10^2 e 10^8 UFC mL⁻¹ de inóculo em cana-de-açúcar a fim de estudarem a colonização de *Herbaspirillum* sp. B501gfp1, e observaram que houve colonização da planta hospedeira, mas somente quando foi inoculada uma maior quantidade de células bacterianas, esta bactéria pode ser reisolado de folha. Nesse trabalho, os autores utilizaram plantas comerciais naturalmente colonizadas por outros microrganismos enquanto que no presente estudo, plantas micropropagadas foram utilizadas. Dessa forma, pode ser concluído que o inóculo de 10^5 UFC mL⁻¹ foi adequado para o experimento, permitindo que as linhagens utilizadas colonizassem todos os tecidos da planta.

Figura 4.3 - Densidade de *Methylobacterium extorquens* (AR1.6/2 e ARGFP) e *M. mesophilicum* (SR1.6/6 e SRGFP) após reisolamento de plantas de cana-de-açúcar inoculadas. Os reisolamentos foram realizados aos 2 dias (A), 10 dias (B) e 17 dias (C) após a inoculação. Foram amostradas as comunidades do rizoplasma (em preto), endofíticas de raiz (em cinza escuro) e endofíticas da parte aérea (em cinza claro). Os dados foram transformados para Log (UFC+2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância

Os resultados são controversos quando se estuda a colonização bacteriana em cana-de-açúcar; Muthukumarasamy, Revathi e Lakshminarasimhan (1999) verificaram que a população de *Herbaspirillum* spp. foi mais abundante em colmos e folhas que nas raízes e na rizosfera, mas Reis Junior et al. (2000) observaram tendência inversa. Portanto, pode-se concluir que a relação entre cana-de-açúcar e bactérias colonizadoras deve ser sempre estudada de acordo com a particularidade de cada bactéria e variedade utilizada, além de condições de inóculo e cultivo da planta, sendo que a bactéria *Methylobacterium* avaliada nesse estudo foi capaz de colonizar satisfatoriamente a variedade SP80-3280 de cana-de-açúcar in vitro e esta colonização foi afetada quando se utilizou a linhagem bacteriana geneticamente modificada.

E esse é um ponto bastante importante desse estudo realizado. Apesar de muitos trabalhos utilizarem linhagens modificadas com o gene da GFP e seus variantes (ZHANG et al., 2002; HU; KERPPOLA, 2003; WANG et al., 2007), poucos estudos comparam o comportamento desses organismos geneticamente modificados com seus correspondentes selvagens. Com os resultados aqui observados, fica ressaltada a necessidade de estudos comparativos entre os organismos modificados e selvagens. Na maioria dos estudos, os organismos com GFP são utilizados para localização desses organismos no interior de tecidos vegetais, ou seja, determinar o padrão de colonização. No entanto, como foi visto nesse trabalho, há a possibilidade dos padrões de colonização de uma linhagem selvagem e modificada não corresponderem.

4.3.2.2 Avaliação da colonização por microscopia óptica de fluorescência (MOF)

As plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Methylobacterium* e avaliadas por reisolamento também foram observadas por MOF. Superfícies de raízes e da parte aérea, bem como cortes transversais desses segmentos foram avaliados. Após 2 dias da inoculação da linhagem AR1.6/2, foi observada colonização do rizopiano (Figura 4.4A). O isolado ARGFP também pode ser observado colonizando o rizopiano (Figura 4.4B), no entanto, as células bacterianas não apresentaram fluorescência (Figura 4.4C). Nos outros tecidos analisados, não foram visualizadas células bacterianas de

M. extorquens, diferente de *M. mesophilicum* que colonizou a superfície da raiz (SR1.6/6) (Figura 4.4D), embora SRGFP não tenha sido observada (Figura 4.4E e F).

Na segunda observação, 10 dias após a inoculação, a linhagem AR1.6/2 colonizou o rizoplane, podendo ser observada também sobre a superfície de partes aéreas da planta (Figura 4.5A), no entanto, não foi possível observar colonização interna. A linhagem ARGFP foi observada no rizoplane (Figura 4.5B), mas a fluorescência foi muito baixa (Figura 4.5C). Os aglomerados bacterianos formados por AR1.6/2 no rizoplane após 10 dias da inoculação apresentaram uma morfologia diferenciada quando comparada com a avaliação após 2 dias, pois esses aglomerados estavam mais compactados sobre a superfície da raiz (Figura 4.5A). Essa alteração de morfologia do biofilme da linhagem AR1.6/2 entre 2 e 10 dias após o inóculo não foi observada para a linhagem SR1.6/6, que apresentou colonização de rizoplane com aglomerados semelhantes aos observados na primeira avaliação (Figura 4.5E). Pequenos aglomerados de células foram observados (Figura 4.5E) sem fluorescência (Figura 4.5F).

Após 17 dias da inoculação, foi possível observar, em alguns casos, isolados colonizando tecidos internos da planta. A linhagem AR1.6/2 colonizou tecidos internos da raiz (Figura 4.6A), além do rizoplane, enquanto a linhagem ARGFP colonizou o rizoplane (Figura 4.6B) apresentando baixa fluorescência (Figura 4.6C). A linhagem SR1.6/6 foi observada em microcolônias no rizoplane e também pode ser observado em tecidos internos (Figura 4.6D). A linhagem SRGFP somente pode ser observada em rizoplane (Figura 4.6E) com baixa fluorescência (Figura 4.6F).

Freqüentemente, 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 raiz, mas também em espaços intercelulares. 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 (HU; KERPPOLA, 2003).

Figura 4.4 - Observação da colonização de *Methylobacterium extorquens* (A-C) e *M. mesophilicum* (D-F) em cana-de-açúcar após 2 dias da inoculação dos isolados bacterianos no meio de cultivo *in vitro* da planta. O isolado AR1.6/2 bem como o transformante ARGFP foram capazes de colonizar o rizoplane formando biofilmes (A e B). No entanto, foi observada ausência ou baixa fluorescência do isolado transformado ARGFP (C). O isolado SR1.6/6 também foi observado colonizando o rizoplane (D), mas o crescimento de SRGFP sobre a raiz não pode ser observado (E e F). Captura de imagem à luz visível (A,B,D e E) e captura de imagem sobre luz ultravioleta (C e F). Aumento de 400x

Figura 4.5 - Observação da colonização de *Methylobacterium extorquens* (A-C) e *M. mesophilicum* (D-F) em cana-de-açúcar após 10 dias da inoculação dos isolados bacterianos no meio de cultivo *in vitro* da planta. O isolado AR1.6/2 crescendo sobre a superfície da parte aérea da planta (A). O transformante ARGFP colonizou o rizoplane (B), mas com baixa fluorescência ARGFP (C). O isolado SR1.6/6 também foi observado colonizando o rizoplane (D) e o crescimento de SRGFP sobre a raiz foi em colônias pequenas (E) e com fluorescência restrita a algumas células (F). Captura de imagem à luz visível (A, B, D e E) e captura de imagem sobre luz ultravioleta (C e F). Aumento de 400x

Estudos de interação entre bactérias endofíticas e cana-de-açúcar têm sido desenvolvidos com sucesso tanto em casa de vegetação quanto em plantas micropropagadas (REIS JUNIOR et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002) e vários estudos encontraram bactérias capazes de invadir e colonizar plantas saudáveis de cana-de-açúcar (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998).

Figura 4.6 - Observação da colonização de *Methylobacterium extorquens* (A-C) e *M. mesophilicum* (D) em cana-de-açúcar após 17 dias da inoculação dos isolados bacterianos no meio de cultivo *in vitro* da planta. O isolado AR1.6/2 colonizou internamente a raiz de cana-de-açúcar (A). O transformante ARGFP colonizou o rizoplane (B) e apresentou baixa fluorescência (C). O isolado SR1.6/6 também foi observado colonizando tecidos internos da raiz (D). Captura de imagem à luz visível (A, B e D) e captura de imagem sobre luz ultravioleta (C). Aumento de 400x

Genes marcadores, como a GFP, têm sido utilizados amplamente para demonstrar a colonização de isolados bacterianos endofíticos em diversas culturas como *Pseudomonas chlororaphis* em sorgo (TOMBOLINI et al., 1999), *Klebsiella pneumoniae*, colonizando o córtex e espaços intercelulares de milho (CHELIUS; TRIPLETT, 2000), *Herbaspirillum* sp. colonizando *Oryza officinalis* (ELBELTAGY et al., 2001) e *Klebsiella pneumoniae* colonizando vasos do xilema em *Catharanthus roseus* e *Citrus sinensis* (LACAVA; ARAUJO; AZEVEDO, 2007). Os isolados marcados com GFP utilizados neste estudo (ARGFP e SRGFP), embora apresentem fluorescência em crescimento em meio de cultura, perderam esta fluorescência na planta hospedeira, mostrando que de alguma forma a mudança da expressão de genes de *Methylobacterium* durante a interação com a planta hospedeira pode alterar a expressão do gene da GFP.

4.3.3 Análise da colonização de *Methylobacterium* em palitos de madeira

Foi realizado experimento *in vitro* para a avaliação por meio da MOF do crescimento das linhagens de *Methylobacterium* sobre madeira. O experimento foi montado em tubos Falcon que foram mantidos em estufa com fotoperíodo de 16h de luz e mantida a 28°C. As avaliações foram realizadas após 1, 3 e 10 dias após o inóculo.

A linhagem AR1.6/2 flocula quando em crescimento em meio líquido. Nas análises anteriores desse trabalho, isso pode ser comprovado nas plantas, visto que os agregados formados por AR1.6/2 na superfície de raízes de cana-de-açúcar foram sempre maiores e melhores estruturados que os agregados formados por SR1.6/6. Foi observado um aumento da colonização da madeira pela linhagem AR1.6/2, isto é, os agregados formados por essa linhagem foram se tornando maiores e densos ao longo dos 10 dias de crescimento (Figura 4.7A-C). A linhagem SR1.6/6 manteve sua característica de crescimento com células isoladas e sem biofilme sobre a madeira (Figura 4.7 D).

Dados anteriores desse trabalho mostram que as linhagens transformadas utilizadas não mantêm a fluorescência enquanto colonizam a planta *in vitro*. Entretanto, foi observado que células das linhagens ARGFP e SRGFP apresentaram fluorescência sobre a madeira. Em todas as avaliações, 1 dia (Figura 4.8A e 4.8B), 3 dias (Figura 4.8C e D) e mesmo aos 10 dias (Figura 4.8E e F) a linhagem ARGFP manteve a fluorescência que foi observada em testes preliminares. Mesmo para a linhagem SRGFP que não formou agregados sobre a madeira, pode-se afirmar que as células multiplicaram-se mantendo a fluorescência já que após 10 dias do inóculo foi possível visualizar células isoladas com uma fluorescência alta (Figura 4.9).

Figura 4.7 - Observação da colonização de *Methylobacterium extorquens* (A-C) e *Methylobacterium mesophilicum* (D) sobre palitos de madeira. Foi observado um grande crescimento de *M. extorquens* sobre a madeira após 1 dia (A), 3 dias (B) e 10 dias (C) da inoculação do isolado bacteriano no meio de cultivo *in vitro*. Já *M. mesophilicum* não cresceu sobre a madeira (D). Captura de imagem à luz visível. Aumento de 630x

Figura 4.8 - Observação do crescimento e da manutenção da fluorescência de *Methylobacterium extorquens* (ARGFP) sobre madeira após 1 dia (A e B), 3 dias (C e D) e 10 dias (E e F) de inoculação. Captura de imagem à luz visível (A, C e E) e captura de imagem sobre luz ultravioleta (B, D e F). Aumento de 400x

Nesse experimento de crescimento das linhagens sobre a madeira, foram mantidos todos os fatores do experimento montado com plantas de cana-de-açúcar. Ou seja, o inóculo preparado da mesma maneira foi adicionado para a mesma concentração final de 10^5 UFC ml^{-1} em 7 mL de meio MS em tubos Falcon de 50 mL. E os tubos foram mantidos em estufa com fotoperíodo de 16 h de luz. Excluindo todos os fatores, pode-se concluir que há realmente algum tipo de interação planta-microrganismo que altera a fisiologia das bactérias utilizadas nesse trabalho, visto que sobre a madeira, foi observada a manutenção da fluorescência pelas linhagens transformadas ARGFP e SRGFP. Outros estudos seriam necessários para a melhor compreensão dos fatores que influenciam a perda da fluorescência por essas bactérias quando inoculadas em plantas de cana-de-açúcar *in vitro*.

Figura 4.9 - Observação do crescimento e da manutenção da fluorescência por *M. mesophilicum* (SRGFP) após 10 dias do inóculo sobre madeira. Captura de imagem sobre luz ultravioleta. Aumento de 400(A) e 1000x (B)

4.3.4 Análise da colonização de *Methylobacterium* em cana-de-açúcar em casa de vegetação

4.3.4.1 Análise da densidade de *Methylobacterium* em plantas em casa de vegetação

Aos 4 dias após o inóculo, as comunidades bacterianas do rizoplane e endofíticas de raízes foram isoladas. Novamente, como visto em plantas de cana-de-açúcar *in vitro*, as linhagens selvagens e geneticamente modificadas apresentaram um perfil de colonização diferenciado (Figura 4.10). As linhagens selvagens distribuíram pela rizosfera e interior de raiz em uma densidade de 10^4 a 10^7 UFC g⁻¹ enquanto que as linhagens geneticamente modificadas colonizaram os mesmos tecidos em uma densidade de 10^2 a 10^5 UFC g⁻¹ (Figura 4.10). Além disso, as linhagens selvagens colonizaram endofiticamente o colmo após 10 dias da inoculação (10^1 UFC g⁻¹), as linhagens transformadas não foram observadas nesse tecido (Figura 4.10).

No experimento realizado com plantas *in vitro*, as linhagens ARGFP e SRGFP foram encontradas na parte aérea. É conhecido que quando cultivadas em meio de cultura, as linhagens ARGFP e SRGFP crescem mais devagar que as selvagens. Na inoculação da plantas em casa de vegetação, mesmo com o inóculo inicial mais denso, as bactérias inoculadas estão sujeitas a uma competição com outros microrganismos presentes na planta, no substrato e no ambiente. Pode ser suposto que esse crescimento mais lento seja um dos fatores que influenciaram a falta de habilidade dessas linhagens de colonizarem os colmos.

Figura 4.10 - Densidade de *Methylobacterium extorquens* (AR1.6/2 e ARGFP) e *M. mesophilicum* (SR1.6/6 e SRGFP) após reisolamento de plantas de cana-de-açúcar inoculadas. Os reisolamentos foram realizados aos 4 dias (A) e 10 dias após a inoculação. Foram amostradas as comunidades do rizoplasma (em preto), endofíticas de raiz (em cinza escuro) e endofíticas da parte aérea (em cinza claro). Os dados foram transformados para Log (UFC+2) e letras iguais indicam valores sem diferença significativa para o teste de Tukey a 5% de significância

4.3.4.2 Análise da colonização por microscopia óptica de fluorescência (MOF)

As plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Methylobacterium* e avaliadas por reisolamento também foram observadas ao MOF. Por meio dessa análise, foi possível observar a formação de agregados e biofilmes sobre a superfície de raízes de plantas em casa de vegetação. Não foi observada nenhuma diferença significativa da colonização dessas linhagens em plantas *in vitro*.

A fluorescência observada em plantas da casa de vegetação não foi similar àquela observada sobre a madeira, mas a fluorescência das linhagens ARGFP e SRGFP foi mantida durante o período avaliado. Após 40 dias do inóculo, ainda foi possível observar células fluorescentes (Figura 4.11).

Figura 4.11 - Observação da colonização de *Methylobacterium extorquens* (A-B) e *M. mesophilicum* (B-C) em cana-de-açúcar após 40 dias da inoculação dos isolados bacterianos em plantas de cana-de-açúcar. Pode se observar a manutenção da colonização. Captura de imagem à luz visível (A e C) e captura de imagem sobre luz ultravioleta (B e D). Aumento de 400x

É conhecido que, para alguns genes, uma expressão gênica maior deve corresponder a uma maior taxa de crescimento. (COLMAN-LERNER et al., 2005). Contudo, Strovas et al. (2007) não observou isso em um estudo com *M. extorquens* AM1, os autores observaram heterogeneidade na expressão do gene repórter *gfpuv*. A expressão desse gene não responde linearmente a taxa de crescimento; o metabolismo energético, o nível de aminoácidos entre outros fatores afeta a expressão desse gene.

O objetivo desse trabalho foi o de monitorar a colonização de *Methylobacterium* em plantas de cana-de-açúcar por meio do gene repórter *gfp*. Esse monitoramento foi prejudicado devido a não expressão ou expressão heterogênea do gene *gfp*. A fluorescência apresentou variações frente às diferentes condições analisadas nesse trabalho: inóculo em cana-de-açúcar com cultivo *in vitro*, inóculo em plantas em casa de vegetação e até mesmo o crescimento sobre madeira. É possível que a heterogeneidade das células bacterianas nas populações trabalhadas tenham respondido diferentemente frente às perturbações do ambiente (Strovas et al., 2007).

Contudo, por meio de MEV e isolamento em meio de cultura, foi observada colonização dos isolados de *M. extorquens* e *M. mesophilicum* em cana-de-açúcar. Estudos complementares devem ser realizados para aproveitar o potencial benéfico dessas linhagens na cultura de cana-de-açúcar.

Referências

- ABANDA-NKPWATT, D.; MUSCH, M.; TSCHIERSCH, J.; BOETTNER, M.; SCHWAB, W. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 15, p. 4025-4032, 2006.
- ARAUJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI, 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**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, 2002.

AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B.N.; DESHMUKH, S.K. (Ed.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Ration: CRC Press, 2007. Chap. 6, p. 189-207.

CERVANTES-MARTINEZ, J.; LOPEZ-DIAZ, S.; RODRIGUEZ-GARAY, B. Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence. **Plant Science**, Limerick, v. 166, p. 889-892, 2004.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001.

COLMAN-LERNER, A.; GORDON, A.; SERRA, E.; CHIN, T.; RESNEKOV, O.; ENDY, D.; PESCE, C. G.; BRENT, R. Regulated cell-to-cell variation in a cell-fate decision system. **Nature**, New York, v. 437, n. 7059, p. 699-706, 2005.

DONG, Y. M.; 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**, The Hague, v. 257, n. 1, p. 49-59, 2003.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and in plant nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 11, p. 5285-5293, 2001.

FUJISHIGE, N. A.; KAPADIA, N. N.; HIRSCH, A. M. A feeling for the micro-organism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 150, n. 1, p. 79-88, 2006.

HALLMANN, J.; QUADTHALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HU, C. D.; KERPPOLA, T. K. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. **Nature Biotechnology**, New York, v. 21, n. 5, p. 539-545, 2003.

KNEE, E. M.; GONG, F. C.; GAO, M. S.; TEPLITSKI, M.; JONES, A. R.; FOXWORTHY, A.; MORT, A. J.; BAUER, W. D. Root mucilage from pea and its utilization by rhizosphere bacteria as a sole carbon source. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 6, p. 775-784, 2001.

KREFT, J. U. Biofilms promote altruism. **Microbiology-Sgm**, Berks, v. 150, p. 2751-2760, 2004.

KUKLINSKY-SOBRAI, 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, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

LACAVA, P. T.; ARAUJO, 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, n. 1, p. 11-14, 2007.

LIU, C. H.; ZOU, W. X.; LU, H.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 88, n. 3, p. 277-282, 2001.

LODEWYCKX, C.; VANGRONSVELD, J.; PORTEOUS, F.; MOORE, E. R. B.; TAGHAVI, S.; MEZGEAY, M.; DER LELIE, D. Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 6, p. 583-606, 2002.

MADHAIYAN, M.; KIM, B. Y.; POONGUZHALI, S.; KWON, S. W.; SONG, M. H.; RYU, J. H.; GO, S. J.; KOO, B. S.; SA, T. M. *Methylobacterium oryzae* sp nov., an aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, 1-aminocyclopropane-L-carboxylate deaminase-producing bacterium isolated from rice. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 326-331, 2007.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S. P.; SA, T. A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Environmental and Experimental Botany**, New York, v. 57, n. 1/2, p. 168-176, 2006.

MADHAIYAN, M.; REDDY, B. V. S.; ANANDHAM, R.; SENTHILKUMAR, M.; POONGUZHALI, S.; SUNDARAM, S. P.; SA, T. M. Plant growth-promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens. **Current Microbiology**, New York, v. 53, n. 4, p. 270-276, 2006.

MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA, JR G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 295-301, 2001.

MICHELI, F. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. **Trends in Plant Science**, Amsterdam, v. 6, n. 9, p. 414-419, 2001.

MONIER, J. M.; LINDOW, S. E. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 100, n. 26, p. 15977-15982, 2003.

MUÑOZ-ROJAS, J.; CABALLERO-MELLADO, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. **Microbial Ecology**, New York, v. 46, n. 4, p. 454-464, 2003.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, Berlim, v. 29, n. 2, p. 157-164, 1999.

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

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, The Hang, v. 242, n. 2, p. 205-215, 2002.

PIRTTILA, A. M.; LAUKKANEN, H.; POSPIECH, H.; MYLLYLA, R.; HOHTOLA, A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 7, p. 3073-3077, 2000.

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**, Berlin, v. 17, n. 1, p. 29-54, 1998.

REIS JUNIOR, F. B. D. O. S.; SILVA, L. G. D.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 985-994, 2000.

RUBINI, M. R.; SILVA-RIBEIRO, R. T.; POMELLA, A. W. V.; MAKI, C. S.; ARAÚJO, W. L.; SANTOS, D. R.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v. 1, n. 1, p. 24-33, 2005.

STROVAS, T. J.; SAUTER, L. M.; GUO, X. F.; LIDSTROM, M. E. Cell-to-cell heterogeneity in growth rate and gene expression in *Methylobacterium extorquens* AM1. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 189, n. 19, p. 7127-7133, 2007.

SY, A.; GIRAUD, E.; SAMBA, R.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. Certain legumes of the genus *Crotalaria* are specifically nodulated by a new species of *Methylobacterium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 6, p. 503-508, 2001.

SY, A.; TIMMERS, A. C. J.; KNIEF, C.; VORHOLT, J. A. Methylophilic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 11, p. 7245-7252, 2005.

SZMRECSÁNYI, T.; MOREIRA, E. P. O desenvolvimento da agroindústria canavieira do Brasil desde a Segunda Guerra Mundial. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 5, p. 57-79, 1991.

TOMBOLINI, R.; VAN DER GAAG, D. J.; GERHARDSON, B.; JANSSON, J. K. Colonization pattern of the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* MA 342 on barley seeds visualized by using green fluorescent protein. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 8, p. 3674-3680, 1999.

TOYAMA, H.; ANTHONY, C.; LIDSTROM, M. E. Construction of insertion and deletion *mx* mutants of *Methylobacterium extorquens* AM1 by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 166, n. 1, p. 1-7, 1998.

WAGNER, M.; HORN, M.; DAIMS, H. Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 6, n. 3, p. 302-309, 2003.

WANG, G. H.; JIN, J.; XU, M. N.; PAN, X. W.; TANG, C. Inoculation with phosphate-solubilizing fungi diversifies the bacterial community in rhizospheres of maize and soybean. **Pedosphere**, Beijing, v. 17, n. 2, p. 191-199, 2007.

ZHANG, J.; CAMPBELL, R. E.; TING, A. Y.; TSIEN, R. Y. Creating new fluorescent probes for cell biology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, New York, v. 3, n. 12, p. 906-918, 2002.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil aumentou em 3,5 milhões de hectares a sua área plantada com transgênicos de 2006 para 2007 e na próxima safra, deve ocupar o segundo lugar na lista dos países com maior área cultivada com transgênicos. É importante o estudo do impacto que essas plantas podem ter no ambiente, inclusive sobre as comunidades microbianas associadas a elas.

No presente trabalho, os efeitos de duas plantas de cana-de-açúcar transgênicas foram avaliados. Tanto para cana-de-açúcar resistente a insetos como para a resistente ao herbicida Imazapyr, foi observado que fatores ambientais, como época de amostragem, e de conduta no campo, como aplicação diferencial de herbicidas, além do tipo de planta e do transgene inserido afetam a interação microrganismo-planta. Os dados apresentados reforçam a necessidade de estudos realizados caso-a-caso e com a necessidade de controle rígido sobre as variáveis para obter a avaliação do efeito da transgenia, pois muitos fatores afetam a interação microrganismos-planta.

O gênero *Methylobacterium* já foi descrito como endófito de várias culturas de interesse econômico e apresenta potencial como promotora de crescimento vegetal. Sendo a cana-de-açúcar uma cultura de suma importância para o Brasil, este trabalho também avaliou a interação entre cana-de-açúcar e *Methylobacterium* spp.

Foi observado que as linhagens de *Methylobacterium* avaliadas colonizam cana-de-açúcar, sendo comumente observadas nos flanges cuticulares e regiões pilosas da superfície de raiz, instalando-se na base dos pêlos radiculares. Bactérias transformadas com o gene da *gfp* utilizadas mostraram uma colonização diferente das linhagens parentais e apresentaram células com baixa fluorescência quando em contato com cana-de-açúcar. Apesar da necessidade de estudos para a melhor compreensão da interação dessas linhagens com as plantas de cana-de-açúcar, *Methylobacterium* é um gênero em potencial para a utilização nessa cultura.