ROBERTA CRISTINA RUEDAS MARTINS

RESPOSTAS DE CALOS DE CANA-DE-AÇÚCAR NA INTERAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

ROBERTA CRISTINA RUEDAS MARTINS

RESPOSTAS DE CALOS DE CANA-DE-AÇÚCAR NA INTERAÇÃO COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Heloiza Ramos

Barbosa

Versão original

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Martins, Roberta Cristina Ruedas.
Respostas de calos de cana-de-açúcar na interação com bactérias diazotróficas endofíticas / Roberta Cristina Ruedas Martins. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Heloiza Ramos Barbosa.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Fisiologia de microganismos.

Versão do título para o inglês: Responses of sugarcane calluses in the interaction with endophytic diazotrophic bacteria.

 Cana-de-açúcar 2. Bactérias endofíticas 3. Fixação de nitrogênio 4. Calos 5. Resposta de defesa 6. Cultura de tecidos 1. Barbosa, Profa. Dra. Heloiza Ramos II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0182/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Roberta Cristina Ruedas Martins.
Título da Tese:	Respostas de calos de cana-de-açúcar na interação com bactérias diazotróficas endofíticas.
Orientador(a):	Profa. Dra. Heloiza Ramos Barbosa.
	ulgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão ca realizada a, considerou () Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil Telefone :(55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438

e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 272, referente ao projeto intitulado: "Resposta de calos de cana-de-açucar na interação com bactérias endofíticas diazotróficas" sob a responsabilidade de Roberta Cristina Ruedas Martins, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 19 de novembro de 2008.

Ch Rua.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima Coordenador da CEEA - ICB/USP PROF. DR. LUIZ VICENTE RIZZO Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus queridos avós que me vêem lá do céu:Luiz, Rosa e João.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Heloiza Ramos Barbosa pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por todo o carinho e dedicação.

À Prof^a Dr^a Eny Iochevet Segal Floh por ceder o laboratório para a realização dos experimentos e pelo apoio.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsa de doutorado.

Aos meus pais: Maria de Lourdes e Gelson Luiz por todo amor, apoio moral e financeiro.

À minha irmã Renata pelos momentos de descontração e amizade em minha vida.

Aos meus avós Izabel e João por todo apoio, amor e carinho.

Aos meus familiares por todo apoio e carinho.

Aos amigos e companheiros de laboratório!!

À Deus por me prover de vida, saúde e inteligência necessárias para a concretização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram do processo de construção deste trabalho.

RESUMO

MARTINS, R. C. R. **Respostas de calos de cana-de-açúcar na interação com bactérias diazotróficas endofíticas.** 2013. 100 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) — Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A cana-de-açúcar é um dos cultivos mais importantes no Brasil. Estima-se que uma parte do nitrogênio total de algumas variedades de cana-de-açúcar seja obtida pela interação com microrganismos endofíticos diazotróficos. Na maior parte de sua vida, os endofíticos habitam o interior de plantas sem causar nenhum sintoma aparente de doença. O estudo de interação microrganismos/plantas foi realizado utilizando-se co-culturas entre bactérias endofíticas diazotróficas e calos de cana-de-açúcar. Em presença do calo: *Enterobacter* sp. ICB113, ICB117 e ICB481 foram estimuladas e mantidas em elevadas populações; *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 tiveram seu número reduzido e mantiveram-se em números estáveis; e *Pantoea* sp. ICB409 foi totalmente eliminada, demonstrando, assim, que a planta exerce um controle sobre os microrganismos. O modelo calo de cana-de-açúcar/bactéria endofítica diazotrófica foi capaz de evidenciar diferentes interações entre vegetal e bactéria, assim como, diferentes níveis de resposta de defesa da célula vegetal.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. Bactérias endofíticas. Fixação de nitrogênio. Calos. Resposta de defesa. Cultura de tecidos.

ABSTRACT

MARTINS, R. C. R. Responses of sugarcane calluses in the interaction with endophytic diazotrophic bactéria. 2013. 100 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The sugarcane is one of the most important crops in Brazil. It is estimated that a portion of the total nitrogen of some varieties of sugarcane is obtained by interaction with diazotrophic endophytic microorganisms. In most of his life, the endophytes inhabit the interior of plants without causing any obvious signs of disease. The interaction study microorganisms/plants was performed using co-cultures among endophytic diazotrophic bacteria and sugarcane calluses. In the presence of callus: *Enterobacter* sp. ICB113, ICB117 and ICB481 were stimulated and maintained in large populations; *Klebsiella* sp. ICB375 and *Pseudomonas* sp. ICB383 had their numbers reduced and remained in stable numbers, and *Pantoea* sp. ICB409 was completely eliminated, thus demonstrating that the plant has a control over microorganisms. The model sugarcane callus/endophytic diazotrophic bacteria was able to show different interactions between plants and bacteria, as well as different levels of defense response of the plant cell.

Keywords: Sugarcane. Endophytic bacteria. Nitrogen fixation. Callus. Defense response. Tissue culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frasco de co-cultura	3
Figura 2 - Curvas de crescimento de <i>Enterobacter</i> sp. ICB113 em presença (co-cultura)	e
ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar	0
Figura 3 – Curvas de crescimento de <i>Enterobacter</i> sp. ICB117 em presença (co-cultura)	
e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar4	0
Figura 4 – Curvas de crescimento de <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 em presença (co-cultura)	e
ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar4	1
Figura 5 – Curvas de crescimento de Klebsiella sp. ICB375 em presença (co-cultura)	e
ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar4	2
Figura 6 – Curvas de crescimento de <i>Pseudomomas</i> sp. ICB383 em presença (co-cultura)	e
ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar4	3
Figura 7 - Curvas de crescimento de <i>Pantoea</i> sp. ICB409 em presença (co-cultura)	e
ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar4	4
Figura 8 - Curvas de atividade específica da nitrogenase de Enterobacter sp. ICB113 en	m
presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar4	5
Figura 9 - Curvas de atividade específica da nitrogenase de Enterobacter sp. ICB117 en	m
presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar4	5
Figura 10 - Curvas de atividade específica da nitrogenase de Enterobacter sp. ICB481 en	m
presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar4	6
Figura 11 - Curvas de atividade específica da nitrogenase de Klebsiella sp. ICB375 en	m
presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar4	7
Figura 12 - Curvas de atividade específica da nitrogenase de Pseudomonas sp. ICB383 en	m
presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar4	8
Figura 13 - Curvas de atividade específica da nitrogenase de Pantoea sp. ICB409 en	m
presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar4	9
Figura 14 - Conteúdo protéico de calo de cana-de-açúcar cultivado em meio MS e MSM en	m
presença (co-cultura) ou ausência (controle) de <i>Enterobacter</i> sp. ICB11350	0
Figura 15 - Conteúdo protéico de calo de cana-de-açúcar cultivado em meio MS e MSM en	m
presença (co-cultura) ou ausência (controle) de <i>Enterobacter</i> sp. ICB1175	0
Figura 16 – Conteúdo protéico de calo de cana-de-açúcar cultivado em meio MS e MSM en	m
presenca (co-cultura) ou ausência (controle) de <i>Enterobacter</i> sp. ICB481	51

Figura 17 – Conteúdo protéico de calo de cana-de-açúcar cultivado em meio MS e MSM em
presença (co-cultura) ou ausência (controle) de <i>Klebsiella</i> sp. ICB37551
Figura 18 - Conteúdo protéico de calo de cana-de-açúcar cultivado em meio MS e MSM em
presença (co-cultura) ou ausência (controle) de <i>Pseudomonas</i> sp. ICB38352
Figura 19 - Conteúdo protéico de calo de cana-de-açúcar cultivado em meio MS e MSM em
presença (co-cultura) ou ausência (controle) de <i>Pantoea</i> sp. ICB40952
Figura 20 - Medida de liberação de ON por calos de cana-de-açúcar em co-cultura com
Enterobacter sp. ICB113, relação ON/UFC e curva de crescimento bacteriano54
Figura 21 - Medida de liberação de ON por calos de cana-de-açúcar em co-cultura com
Enterobacter sp. ICB117, relação ON/UFC e curva de crescimento bacteriano55
Figura 22 - Medida de liberação de ON por calos de cana-de-açúcar em co-cultura com
Enterobacter sp. ICB481, relação ON/UFC e curva de crescimento bacteriano55
Figura 23 - Medida de liberação de ON por calos de cana-de-açúcar em co-cultura com
Klebsiella sp. ICB375 , relação ON/UFC e curva de crescimento bacteriano56
Figura 24 - Medida de liberação de ON por calos de cana-de-açúcar em co-cultura com
Pseudomonas sp. ICB383 , relação ON/UFC e curva de crescimento bacteriano56
Figura 25 - Medida de liberação de ON por calos de cana-de-açúcar em co-cultura com
Pantoea sp. ICB409 , relação ON/UFC e curva de crescimento bacteriano57
Figura 26 - Medida do conteúdo intracelular de ON por calos de cana-de-açúcar controle e
em co-cultura com Enterobacter sp. ICB113, Enterobacter sp. ICB117, Klebsiella sp.
ICB375, Pseudomonas sp. ICB383, Pantoea sp. ICB409 e Enterobacter sp. ICB48159
Figura 27 – Medida do conteúdo extracelular de ON por calos de cana-de-açúcar controle e
em co-cultura com Enterobacter sp. ICB113, Enterobacter sp. ICB117, Klebsiella sp.
ICB375, Pseudomonas sp. ICB383, Pantoea sp. ICB409 e Enterobacter sp. ICB48160
Figura 28 - Curva de crescimento de Enterobacter sp. ICB113 em ausência (controle) e
presença (co-cultura) de calo de cana-de-açúcar e medida de liberação de etileno pelos calos
de cana-de-açúcar em ausência e presença de <i>Enterobacter</i> sp. ICB11361
Figura 29 - Curva de crescimento de Enterobacter sp. ICB117 em ausência (controle) e
presença (co-cultura) de calo de cana-de-açúcar e medida de liberação de etileno pelos calos
de cana-de-açúcar em ausência e presença de <i>Enterobacter</i> sp. ICB11762
Figura 30 - Curva de crescimento de Enterobacter sp. ICB481 em ausência (controle) e
presença (co-cultura) de calo de cana-de-açúcar e medida de liberação de etileno pelos calos
de cana-de-açúcar em ausência e presença de <i>Enterobacter</i> sp. ICB48162

Figura 31 - Curva de crescimento de Klebsiella sp. ICB375 em ausência (controle) e
presença (co-cultura) de calo de cana-de-açúcar e medida de liberação de etileno pelos calos
de cana-de-açúcar em ausência e presença de <i>Klebsiella</i> sp. ICB37563
Figura 32 - Curva de crescimento de Pseudomonas sp. ICB383 em ausência (controle) e
presença (co-cultura) de calo de cana-de-açúcar e medida de liberação de etileno pelos calos
de cana-de-açúcar em ausência e presença de <i>Pseudomonas</i> sp. ICB38363
Figura 33 - Curva de crescimento de <i>Pantoea</i> sp. ICB409 em ausência (controle) e presença
(co-cultura) de calo de cana-de-açúcar e medida de liberação de etileno pelos calos de cana-
de-açúcar em ausência e presença de <i>Pantoea</i> sp. ICB409
Figura 34 - Conteúdo de espécies reativas de oxigênio de calos controle e de calos em co-
cultura com Enterobacter sp. ICB113, Enterobacter sp. ICB117, Klebsiella sp. ICB375,
Pseudomonas sp. ICB 383, Pantoea sp. ICB409 e Enterobacter sp. ICB48165
Figura 35 – Conteúdo de ácido salicílico livre de calos controle e de calos em co-cultura com
Enterobacter sp. ICB113, Enterobacter sp. ICB117, Klebsiella sp. ICB 375, Pseudomonas sp.
ICB383, Pantoea sp. ICB409 e Enterobacter sp. ICB48166
Figura 36 - Conteúdo de ácido salicílico conjugado de calos controle e de calos em co-
cultura com Enterobacter sp. ICB113, Enterobacter sp. ICB117, Klebsiella sp. ICB375,
Pseudomonas sp. ICB383, Pantoea sp. ICB409 e Enterobacter sp. ICB48167
Figura 37 - Conteúdo de ácido salicílico total de calos controle e de calos em co-cultura com
Enterobacter sp. (ICB 113), Enterobacter sp. (ICB 117), Klebsiella sp. (ICB 375),
Pseudomonas sp. (ICB 383), Pantoea sp. (ICB 409) e Enterobacter sp. ICB48168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens bacterianas, órgão e variedade de cana-de-açúcar da qual foram
isoladas, número de acesso no GenBank
Tabela 2 - Composição do meio de cultura MS
Tabela 3 – Composição dos meios de cultura JNFB e NFB
Tabela 4 – Conteúdo de poliaminas livres de calos controle e de calos em co-cultura70
Tabela 5 – Conteúdo de poliaminas conjugadas de calos controle e de calos em co-cultura71
Tabela 6 – Conteúdo de poliaminas totais de calos controle e de calos em co-cultura72
Tabela 1 – Valores de UFC de <i>Enterobacter</i> sp. ICB113 em cultura pura e em co-cultura com
calo de cana-de-açúcar95
Tabela 2 – Valores de UFC de <i>Enterobacter</i> sp. ICB117 em cultura pura e em co-cultura com
calo de cana-de-açúcar95
Tabela 3 – Valores de UFC de <i>Enterobacter</i> sp. ICB481 em cultura pura e em co-cultura com
calo de cana-de-açúcar96
Tabela 4 – Valores de UFC de Klebsiella sp. ICB375 em cultura pura e em co-cultura com
calo de cana-de-açúcar96
Tabela 5 - Valores de UFC de Pseudomonas sp. ICB383 em cultura pura e em co-cultura
com calo de cana-de-açúcar97
Tabela 6 – Valores de UFC de <i>Pantoea</i> sp. ICB409 em cultura pura e em co-cultura com calo
de cana-de-açúcar
Tabela 7 - Valores de atividade específica da nitrogenase de Enterobacter sp. ICB113 em
cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar
Tabela 8 - Valores de atividade específica da nitrogenase de Enterobacter sp. ICB117 em
cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar98
Tabela 9 - Valores de atividade específica da nitrogenase de Enterobacter sp. ICB481 e
cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar99
Tabela 10 - Valores de atividade específica da nitrogenase de Klebsiella sp. ICB375 em
cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar99
Tabela 11 - Valores de atividade específica da nitrogenase de <i>Pseudomonas</i> sp. ICB383 em
cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar
Tabela 12 – Valores de atividade específica da nitrogenase de <i>Pantoea</i> sp. ICB409 em cultura
pura e em co-cultura com calo de cana-de-acúcar

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D – Ácido 2,4-diclorofenoxiacético

ARA – Método da Redução de Acetileno

AS – ácido salicílico

CAD – cadaverina

DAD – Detector de Arranjo de Diodos

DAH – 1,7-diaminoheptano

DAR-4M – diaminorhodamine 4M

DAR-4M AM – diaminorhodamine 4M acetoxymethyl ester

DHBA – 3,4 ácido dihidroxibenzoico

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

H₂DCFDA – 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

MSM – Meio MS modificado

NaNO₂ – Nitrito de sódio

ON (óxido nítrico)

PCA -Ácido perclórico

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PUT – putrescina

SPD - espermidina

SPM - espermina

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 A cana-de-açúcar apresenta elevada importância para países	em
desenvolvimento	17
1.2 A Fixação biológica de nitrogênio é um instrumento importante para a agricult	ura
	17
1.3 Bactérias fixadoras de nitrogênio são capazes de interagir com plantas	18
1.4 As bactérias endofíticas são ativas na promoção do crescimento vegetal	19
1.5 As bactérias endofíticas são capazes de modular a fisiologia	do
vegetal	21
1.6 As plantas apresentam mecanismos de defesa quando invadidas por microrganismos de defesa quando de	mos
patogênicos	21
1.7 Óxido nítrico e Espécies Reativas de Oxigênio	22
1.8 Os Metabólitos secundários podem atuar tanto em infecções benéficas como cor	ıtra
patógenos	23
1.9 Poliaminas	24
1.10 Ácido jasmônico, Ácido salicílico e Etileno são ativadores de genes	de
defesa	24
1.11 Resistência Sistêmica Induzida	25
1.12 Resistência Sistêmica Adquirida	26
1.13 Co-culturas podem ser eficientes modelos para analisar interações entre bactér	ias (
plantas	26
1.14 Justificativa	27
2 OBJETIVOS	
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Material Biológico	30
3.1.1 Microrganismos	30
3.1.2 Material Vegetal	.30
3.2 Meios de Cultura	
3.2.1 Meio MS	
3.2.2 Meio MS modificado (MSM)	
3.2.3 Meios NFb e JNFb	31
3.3 Suspensão celular de cana-de-acúcar	32

3.4 Preparação do inóculo bacteriano	33
3.5 Montagem dos sistemas de co-cultura	33
3.6 Verificação do efeito dos calos sobre as bactérias	34
3.6.1 Crescimento bacteriano	34
3.6.2 Atividade da nitrogenase	34
3.7 Verificação do efeito das bactérias sobre os calos	34
3.7.1 Conteúdo protéico	34
3.7.2 Liberação de etileno	35
3.7.3 Liberação de óxido nítrico – Técnica 1	35
3.7.4 Liberação de óxido nítrico – Técnica 2	35
3.7.5 Conteúdo de espécies reativas de oxigênio	36
3.7.6 Poliaminas	36
3.7.7 Produção de ácido salicílico	37
3.8 Análise Estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Efeito dos calos sobre as bactérias – Crescimento bacteriano	39
4.1.1 Enterobacter sp. ICB113	39
4.1.2 Enterobacter sp. ICB117	39
4.1.3. Enterobacter sp. ICB481	41
4.1.4 Comparação entre as linhagens de Enterobacter	41
4.1.5 Klebsiella sp. ICB375	42
4.1.6 Pseudomonas sp. ICB383	42
4.1.7 Pantoea sp. ICB409	43
4.2 Efeito dos calos sobre as bactérias – Atividade da nitrogenase	44
4.2.1 Enterobacter sp. ICB113	44
4.2.2 Enterobacter sp. ICB117	44
4.2.3 Enterobacter sp. ICB481	45
4.2.4 Comparação entre as linhagens de Enterobacter	46
4.2.5 Klebsiella sp. ICB375	47
4.2.6 Pseudomonas sp. ICB383	47
4.2.7 Pantoea sp. ICB409	48
4.3 Efeito das bactérias sobre os calos	49
4.3.1 Conteúdo Protéico	49
4.3.2 Liberação de Óxido Nítrico	53

4.3.3 Liberação de Etileno	60
4.3.4 Conteúdo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	64
4.3.5 Conteúdo de Ácido Salicílico (AS)	65
4.3.6 Conteúdo de Poliaminas	68
5 DISCUSSÃO	73
5.1 Crescimento Bacteriano	74
5.2 Atividade Específica da Nitrogenase	76
5.3 Conteúdo Protéico dos Calos	78
5.4 Espécies Reativas de Oxigênio e Óxido Nítrico	79
5.5 Etileno e Poliaminas	81
5.6 Ácido Salicílico	83
5.7 Conclusões finais	84
6 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86
APÊNDICE - Tabelas Suplementares	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 A cana-de-açúcar apresenta elevada importância para países em desenvolvimento

A cana-de-açúcar é uma gramínea, pertencente ao gênero *Saccharum*, de elevada importância econômica e agrícola. É uma cultura com elevada eficiência fotossintética, produzindo em curto período, um alto rendimento de matéria verde, energia e fibras (COSTA et al., 2001). Atualmente o Brasil é o maior produtor mundial seguido por Índia e China (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2012). A produção prevista para a safra de 2012/13 é de 518 milhões de toneladas. Os derivados da cana-de-açúcar, etanol e sacarose, representam 35% do Produto Interno Bruto Paulista (http://www.cna.org.br/Cana-de-acucar/TextoPrincipal.htm). O grande desafio atual é aumentar sua produção sem aumentar as áreas de plantio.

O nitrogênio é um dos nutrientes mais importantes para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Após anos de cultivo com baixa quantidade de adubo nitrogenado e sem perda da produção, descobriu-se que algumas variedades de cana-de-açúcar podem obter uma porcentagem substancial de seus requerimentos de nitrogênio pela associação com bactérias fixadoras de N₂, presentes no interior de seus tecidos (BODDEY et al., 2003).

1.2 A Fixação biológica de nitrogênio é um instrumento importante para a agricultura

O nitrogênio, na forma de N_2 , apresenta-se em grandes quantidades (78%) na atmosfera. É quimicamente muito estável, sendo assimilável somente por bactérias fixadoras de nitrogênio (diazotróficas) que estão distribuidas numa grande variedade de hábitats, incluindo solos e interior de plantas. Bactérias diazotróficas podem ser de vida livre, localizando-se principalmente na rizosfera. Outras estabelecem relações simbióticas específicas com plantas superiores, e há ainda as endofíticas, que colonizam folhas, caules e raízes de diferentes famílias de plantas (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

Em todos os organismos diazotróficos, a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) ocorre pela reação de redução de N₂ a amônia (NH₃), catalisada pela ação da enzima nitrogenase (POSTGATE, 1998). Em condições ótimas ocorre seguinte reação:

$$N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16MgATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16MgADP + 16Pi$$

A nitrogenase é formada por duas proteínas: Fe-proteína e MoFe-proteína. O processo de redução de N₂ ocorre através da transferência de elétrons de um substrato reduzido para a Fe-proteína, e desta para a MoFe-proteína, sítio de ligação do N₂, com gasto de grande quantidade de ATP. Uma importante característica desta enzima é sua inibição por oxigênio. Os microrganismos aeróbios fixadores de nitrogênio apresentam diferentes estratégias para proteger a nitrogenase do oxigênio. Quando as bactérias são endofíticas, a nitrogenase é protegida pela localização adequada dos microrganismos em condições de microaerofilia (POSTGATE, 1998).

A nitrogenase, além de catalisar esta redução, pode reduzir outros substratos que possuam tripla ligação. Um deles, o acetileno, é particularmente importante porque seu produto, o etileno, pode ser detectado por cromatografia gasosa. Esta técnica permite a verificação da atividade da nitrogenase com rapidez e sensibilidade (RIVAS, 2002).

1.3 Bactérias fixadoras de nitrogênio são capazes de interagir com plantas

Uma das interações entre planta-microrganismo mais estudada é a que envolve o grupo dos rizóbios que estabelecem simbiose com plantas leguminosas, formando nódulos exclusivamente nas raízes (IVANOV et al., 2012). Nessas relações, sabe-se que os microrganismos fixam N_2 e fornecem amônia às plantas que, por sua vez, contribuem com nutrientes energéticos, gerados pelo processo fotossintético (LODWIG; POOLE, 2003).

Em interações endofíticas foi observado que linhagens selvagens de *Acetobacter diazotrophicus* beneficiaram o crescimento de plantas de cana-de-açúcar (SEVILLA et al., 2001). Oliveira et al. (2002) mostraram que a variedade SP701143 de cana-de-açúcar obteve 30% de nitrogênio proveniente da FBN por bactérias endofíticas. Njoloma et al. (2006) verificaram que a quantidade de nitrogênio total de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Herbaspirillum* spp. B501gfp1 aumentou substancialmente. Os autores sugeriram que este aumento aconteceu por uma possível passagem de nitrogênio fixado da bactéria para a planta.

No entanto, a transferência de nitrogênio fixado é dependente da planta e da bactéria envolvida, pois, Boddey e Döbereiner (1988) não evidenciaram ocorrência de FBN em resposta à inoculação de trigo com *Azospirillum* sp. Até o momento, observa-se a necessidade de mais estudos para se chegar a conclusões sobre essa cooperação bacteriana.

Outras contribuições bacterianas para os vegetais, além da fixação de nitrogênio, podem ser o estímulo ao crescimento pela síntese de fitormônios (BENT et al., 2001; THULER et al., 2003), que acarretam a maior absorção de nutrientes pelo aumento de raízes;

de aminoácidos (THULER et al., 2003); de solubilização de fosfato inorgânico (LIBA et al., 2006) e de mineralização de fosfato orgânico (KENNEDY; ISLAM, 2001; REYES; BERNIER; ANTOUN, 2002). Indiretamente, os organismos diazotróficos são capazes de minimizar os efeitos deletérios de microrganismos patogênicos através da síntese de antibióticos (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; KENNEDY; ISLAM, 2001; ROMERO et al., 2007).

1.4 As bactérias endofíticas são ativas na promoção do crescimento vegetal

Bactérias endofíticas foram isoladas de uma grande diversidade de plantas, incluindo diferentes famílias e gêneros. Esses microrganismos podem penetrar ativamente nos tecidos, devido à capacidade de secretar enzimas hidrolíticas (JAYANI et al., 2005; LYND et al., 2002), ou através de injúrias superficiais nas raízes do vegetal (SPRENT; DE FARIA, 1988) ou dos pêlos das raízes (COCKING, 2003; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Esses endofíticos produzem muitas substâncias com potencial uso na agricultura, na indústria e na medicina (STROBEL; DAISY, 2003; STROBEL et al., 2004). Existem relatos de bactérias associadas a várias culturas vegetais, como tomate, alface, batata, milho, arroz e algodão, com capacidade de promoção do crescimento vegetal (HALLMANN et al., 1997; HUREK et al., 2002).

1.5 As bactérias endofíticas são capazes de modular a fisiologia do vegetal

Bactérias endofíticas verdadeiras, quando isoladas do interior de tecidos vegetais e colocadas novamente em contato com a planta, são capazes de recolonizá-la (REINHOLD-HUREK; HUREK, 1998). Quando colonizam com êxito uma planta, entrando ativamente pelos seus tecidos, são capazes de modular a fisiologia do vegetal e de serem seletivamente favorecidos, mantendo uma associação benéfica entre planta e microrganismo (HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008).

Os tecidos internos da planta proporcionam um ambiente protegido para o desenvolvimento de bactérias endofíticas, porém, fatores ambientais como temperatura, chuva, radiação ultravioleta, etc, que afetam as plantas, podem influenciar a colonização e sobrevivência destes microrganismos no hospedeiro (HALLMANN et al., 1997).

A invasão por bactérias pode causar diferentes impactos no crescimento de plantas que pode responder a esta "possível agressão", acionando mecanismos para se adequar às

mudanças impostas pela bactéria invasora (HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008). A habilidade das plantas em distinguir entre interações parasíticas e benéficas é um exemplo da adaptação de seu genoma a condições diversas (SIKORSKI et al., 1999).

Atualmente estão em desenvolvimento os estudos dos mecanismos usados pela planta para perceber e responder à entrada e colonização por bactérias endofíticas benéficas. Na interação simbiótica entre planta e *Rhizobium*, a bactéria é reconhecida como potencial patógeno e alguns dos mecanismos de defesa da planta (proteínas relacionadas à patogênese expressas quando em presença de microorganismos) são ativados; quando se estabelece a associação benéfica, os mecanismos de defesa são suprimidos (SIKORSKI et al., 1999).

Rocha et al. (2007) e Vargas et al. (2003) verificaram que muitos genes de cana-de-açúcar com funções desconhecidas são diferencialmente expressos durante a associação entre a planta e microrganismos endofíticos diazotróficos (*Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*). Isso indica que os passos iniciais da colonização por tais bactérias são monitorados pela planta, que pode modular a expressão dos genes de acordo com o microrganismo envolvido (VARGAS et al., 2003). O gene *shr5* codifica uma proteína envolvida na transdução de sinais da cana-de-açúcar durante o estabelecimento de interações com microrganismos. Quando a bactéria endofítica é benéfica, ocorre uma regulação diminuindo o produto do gene *shr5*; porém, se a bactéria for patogênica, como *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, ocorre um acréscimo na expressão desse gene (VINAGRE et al., 2006).

Cavalcante et al. (2007) verificaram que alguns genes envolvidos na via de sinalização de etileno em cana-de-açúcar são diferencialmente expressos na presença de endofíticos benéficos. Estes genes codificam receptores e fatores de transcrição responsivos ao etileno. Observou-se que a expressão destes genes é dependente do genótipo da planta e da espécie bacteriana, indicando, portanto, que a via de sinalização do etileno pode estar envolvida no estabelecimento da interação planta-bactéria endofítica (CAVALCANTE et al., 2007).

O estudo de interação entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* e duas variedades de cana-de-açúcar pode ser feito sob enfoque proteômico. Lery et al. (2011) observaram a presença de 78 proteínas diferencialmente expressas entre plantas controle e plantas inoculadas com *G. diazotrophicus* após apenas 24h de inoculação. Duas variedades de cana-de-açúcar foram utilizadas: SP701143 (alta capacidade de assimilar o produto da fixação biológica de nitrogênio) e Chunee (baixa capacidade). Na variedade SP701143 foram expressas proteínas relacionadas com a colonização bacteriana, evidenciando a interação benéfica entre *G. diazotrophicus* e esta variedade de cana. Na variedade Chunee foram

encontradas proteínas de defesa, indicando, outro tipo de interação entre esse microorganismo e essa variedade de cana.

1.6 As plantas apresentam mecanismos de defesa quando invadidas por microrganismos patogênicos

As plantas apresentam mecanismos de defesa não específicos que proporcionam proteção contra um grande número de patógenos (CONN; WALKER, FRANCO, 2008). A resistência natural das plantas aos patógenos baseia-se numa grande variedade de barreiras químicas e físicas que são mecanismos de defesa pré-existentes, denominados de constitutivos (MYSORE; RYU, 2004).

O reconhecimento entre planta e microrganismo se dá pelas MAMPS (*microbe-associated molecular patterns*). Um destes MAMPS é o LPS (lipopolissacarídeo) presente nas bactérias gram-negativas, que é reconhecido por receptores (*patterns recognition receptors*) altamente conservados presentes nas plantas (O´BRIEN et al., 2012)

O patógeno, ao invadir uma planta, desencadeia uma série de mecanismos de defesa. As respostas mais imediatas nas células invadidas correspondem a: geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), síntese de óxido nítrico (ON), rearranjos no citoesqueleto, modificações no estado de fosforilação de proteínas, resposta hipersensível e indução gênica (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). Estas respostas do vegetal são, até o presente, descritas na literatura apenas para invasões de patógenos.

As células vegetais, ao reconhecerem danos em sua parede causados pela entrada de patógenos, ativam a produção de barreiras físicas, como caloses e lignificação (HUCKELHOVEN et al., 1999; GAYOSO et al., 2004) na tentativa de impedir a entrada de outros patógenos. Outras modificações também vão ocorrendo: alteração de vias do metabolismo secundário, interrupção do ciclo celular, estímulo da síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR), acúmulo de ácido benzóico e salicílico, produção de etileno e ácido jasmônico.

Toda esta série de eventos citados acima ocorre apenas nas células vegetais que estão em contato com o microrganismo e em pouco tempo. Logo depois, é possível observar mecanismos de resposta sistêmica dependendo do microrganismo invasor: a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) e a Resistência Sistêmica Induzida (ISR) (DURRANT; DONG, 2004). Alguns mecanismos citados acima fazem parte deste trabalho e serão explicados a seguir.

1.7 Óxido nítrico e Espécies Reativas de Oxigênio

Óxido Nitrico (NO) é uma molécula bioativa capaz de exercer uma série de sinalizações em espécies filogeneticamente distantes (BELIGNI; LAMATTINA, 2001). NO é um radical livre que pode ganhar ou perder elétron, dependendo da situação. Em função de sua estrutura química peculiar, que lhe permite estabilidade e reatividade e de suas atividades de redução/oxidação intercambiáveis, NO é reconhecido como molécula sinalizadora intra e intercelular (DURNER et al., 1998). O radical livre NO tem uma meia-vida de poucos segundos, reagindo rapidamente com O2, formando dióxido de nitrogênio (NO2) que é oxidado a nitrito e nitrato em soluções aquosas (NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2003). Todavia, este radical livre gasoso difunde rapidamente através de membranas biológicas e pode desempenhar um papel sinalizador célula-célula em breves períodos de tempo (BELIGNI; LAMATTINA, 2001) em respostas de plantas a estresses bióticos e abióticos (NEILL et al., 2008). NO também reage rapidamente com proteinas, especialmente amino ácidos reativos como cisteína e tirosina e com vários receptores e fatores de transcrição (STAMLER et al., 2001). NO pode induzir genes envolvidos na defesa e proteção da célula (FERRARINI et al., 2008). Como consequência, causa morte celular, fragmentação celular, estímulo da germinação de sementes, regulação do fechamento de estômatos induzido por ácido abscísico, amadurecimento de frutos e senescência de flores, sinalização de defesa de plantas contra patógenos. Foissner et al. (2000) demonstrou que o fungo Phytophthora cryptogea induziu células epidérmicas de tabaco a aumentarem sua produção de NO.

As EROs são moléculas tóxicas formadas durante funções metabólicas normais nos peroxissomos ou induzidas por estímulos ambientais aos quais as plantas estão constantemente expostas (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). As principais EROs produzidas incluem os seguintes radicais livres: O₂, O₂-, H₂O₂ e OH-. Um excesso de EROs é danoso para as células, pois pode causar peroxidação de lipídeos, oxidação de proteínas, danos nos ácidos nucléicos e inibição de certas enzimas (BARNA et al., 2012).

As plantas são capazes de produzir altas quantidades de peróxido de hidrogênio em resposta a estresses bióticos (BOLWELl et al., 2001). Segundo Apel e Hirt (2004) o peróxido de hidrogênio é capaz de induzir diversos outros mecanismos de defesa além de ativar a morte programada das células.

A planta, ao reconhecer um microrganismo invasor desencadeia uma resposta hipersensível, onde são liberadas EROs e NO, para delimitar a zona infectada e suprimir a

multiplicação do patógeno (FLORES et al., 2008; HONG et al., 2008). A rápida produção de EROs é capaz de inibir o crescimento do microrganismo.

Em condições normais, a célula produz EROs ao longo do tempo, mas também possui a capacidade de produzir enzimas destoxificantes que inativam estas EROs (BOLWELL et al., 2001). Sabe-se que em situações de estresse, por exemplo, quando um microrganismo invade a planta, a produção de EROs aumenta e a de enzimas destoxificantes, cai, para que as EROs não sejam combatidas e eliminem o microrganismo

A síntese de NO potencializa a ação das EROs induzindo a célula vegetal à morte (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

1.8 Os Metabólitos secundários podem atuar tanto em infecções benéficas como contra patógenos

As plantas produzem metabólitos secundários que, aparentemente, não têm função no crescimento e desenvolvimento das plantas. Entre estas substâncias estão compostos fenólicos como os flavonóides e os fenilpropanóides (TAIZ; ZEIGER, 2006). Os compostos fenólicos compreendem um grupo de metabólitos secundários que pode atuar na proteção contra raios ultravioleta, na polinização e na interação planta-microrganismo (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). A interação rizóbio-leguminosa, que prevê uma infecção bacteriana, é interessante para a planta. Para a atração das bactérias, flavonóides são liberados pela raiz induzindo a expressão de genes bacterianos requeridos para que o processo de infecção ocorra (TREUTTER, 2006). Estes compostos também podem atuar em plantas não-leguminosas. Webster et al. (1998) verificaram que o flavonóide naringenina estimula a colonização de raízes de trigo pela bactéria diazotrófica *Azorhizobium caulinodans*. A colonização de plantas de arroz pela bactéria endofítica diazotrófica *Serratia* sp. foi estimulada na presença dos flavonóides quercetina e daidzeína (BALACHANDAR et al., 2006).

Alguns compostos fenólicos podem agir como barreiras físicas dificultando a penetração dos microrganismos (TAIZ; ZEIGER, 2006). Um exemplo são as fitoalexinas, compostos de baixo peso molecular com atividade antimicrobiana, sintetizadas pela planta em resposta à infecção por bactérias ou fungos (MANDAL; CHAKRABORTY; DEY, 2010).

1.9 Poliaminas

As poliaminas são compostos alifáticos de baixo peso molecular, derivadas dos aminoácidos arginina e ornitina, encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais (BARON; STASOLLA, 2008). As mais estudadas são: putrescina, espermina e espermidina.

Estão presentes em todos os compartimentos da célula vegetal, indicando assim sua participação em diversos processos fundamentais: transcrição, processamento de RNA, mudanças de fluidez da membrana (KUZNETSOV; RADYUNKA, SHEVYANOVA, 2006). A concentração das poliaminas e as razões entre elas variam entre as espécies, órgãos e tecido vegetal, além do estágio de desenvolvimento (KUZNETSOV; RADYUNKA, SHEVYANOVA, 2006).

O metabolismo das poliaminas inicia com a biossíntese de putrescina a partir de arginina e/ou ornitina; a putrescina é convertida em espermidina e subsequentemente em espermina. Estes compostos participam de diversos processos de crescimento e desenvolvimento da planta em resposta a estresses bióticos e abióticos (KUZNETSOV; RADYUNKA, SHEVYANOVA, 2006).

A espermina é a poliamina biologicamente mais ativa que as demais, agindo na estabilização das membranas celulares, interagindo com proteínas nucleares, estimulando a síntese de pectina e de hemicelulose, além de exercer ação antioxidante (BOUCHEREAU et al., 1999)

Alguns trabalhos mostram uma relação entre poliaminas e infecção da planta por patógenos, pois, nestas circunstâncias foi observado um aumento no nível de poliaminas, particularmente de espermina e espermidina (YAMAKAWA et al., 1998; TORRIGIANI et al., 1997). Não foi encontrado nenhum artigo que relacionasse a concentração de poliaminas em associações benéficas planta/bactéria.

1.10 Ácido jasmônico, Ácido salicílico e Etileno são ativadores de genes de defesa

Outras moléculas, além das citadas acima, são sintetizadas na presença do patógeno com o intuito de restringir sua invasão na planta (LÓPEZ; BANNENBERG; CASTRESANA, 2008). Substâncias tais como ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) são as principais moléculas que sinalizam a ativação de genes de defesa (LÓPEZ; BANNENBERG; CASTRESANA, 2008).

SA está primariamente ligado à resistência de patógenos biotróficos (utilizam-se de nutrientes de tecidos de hospedeiros vivos), enquanto que o JA e o ET medeiam resistência para a maioria dos patógenos necrotróficos (utilizam-se de nutrientes de células mortas), indicando que a ativação de vias de sinalização de defesa depende do modo de vida do patógeno e do tipo de infecção (LÓPEZ; BANNENBERG; CASTRESANA, 2008). O JA desreprime genes responsáveis pela síntese de substâncias de defesa da planta: defensinas, tioninas e inibidores de proteinase (HAUSE et al., 2002). O tratamento com SA de plantas infectadas com vírus do mosaico do tabaco induziu resistência e acúmulo de proteínas vegetais relacionadas à patogênese (WHITE, 1979).

A via biossintética de ET inicia com o aminoácido metionina que é convertido a *S*-adenosil-metionina (AdoMet) pela enzima *S*-AdoMet sintase (ADS). AdoMet é o maior doador de grupos metila em plantas e está envolvido em reações de metilação de lipídios, proteinas, ou ácidos nucléicos. AdoMet é convertido pela enzima ACS a 5-metiltioadenosina (MTA), que é convertida de volta a metionina via ciclo de Yang e a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), o precursor de ET. ACC é finalmente oxidado pela ACC oxidase (ACO) para formar ET, cianeto e dióxido de carbono.

1.11 Resistência Sistêmica Induzida

A ISR pode ser desencadeada por microrganismos rizosféricos que não causam sintomas visíveis de doença no hospedeiro (VAN LOON; BAKKER, PIETERSE, 1998). Duas moléculas sinais, JA e ET, estão envolvidas na ativação deste mecanismo que aumenta a capacidade defensiva da planta contra patógenos. Uma vez induzido este mecanismo, as plantas ficariam protegidas por um tempo considerável, indicando que a ISR desencadeada é relativamente estável (VAN LOON, 2007).

Trabalhos recentes demonstram que é possível propor que o controle da população endofítica pela planta mantém a defesa do vegetal alerta, em status de vigilância permanente. Arencibia et al. (2006) verificaram que a inoculação da bactéria endofítica *G. diazotrophicus* protegeu a cana-de-açúcar contra o patógeno *Xanthomonas albilineans*. A proteção foi avaliada pela verificação de efeitos externos na planta e de transcritos (mRNA) diferencialmente expressos. Os autores também observaram que *G. diazotrophicus* induziu a expressão diferencial de transcritos homólogos àqueles da via do etileno, molécula esta importante no desencadeamento da ISR. Harish et al. (2008) mostraram que a indução de resistência sistêmica por bactérias endofíticas promotoras de crescimento foi efetiva contra o

vírus do topo em leque em plantas de banana. A expressão de enzimas e proteínas relacionadas à patogênese foi potencializada pela presença de endófítos após a infecção pelo patógeno.

Assim, conclui-se que a aplicação de bactérias endofíticas pode ser uma maneira de controlar biologicamente microorganismos que causam doenças em plantas, tendo um papel importante na agricultura sustentável.

1.12 Resistência Sistêmica Adquirida

A SAR é um mecanismo que confere proteção em longo prazo contra diversos microrganismos patogênicos. Este tipo de defesa requer uma molécula sinal, o ácido salicílico (DURRANT; DONG, 2004). Este mecanismo está sempre associado com o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese tanto no nível local, como sistêmico (VAN LOON, 2007).

As proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) acumulam-se rapidamente nos tecidos vegetais após o contato com patógenos ou ataque por insetos herbívoros ou, também, em resposta ao tratamento com determinados compostos químicos ou a outros tipos de estresse (VAN LOON et al., 1994). Atualmente as proteínas PR são classificadas em 17 famílias distintas. Cada família de possui uma propriedade específica: quitinase, inibidor de protease, endoproteinase, peroxidade, defensina, tionina, ribonuclease, e β-1,3-glicanase (EDREVA, 2005). Muitas apresentam atividade antimicrobiana comprovada (KOMBRINK; HAHLBROCK, 1986; ROULIN; BUCHALA, 1995). Quitinases e glicanases podem degradar os polissacarídeos estruturais de fungos reduzindo assim seu crescimento (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

1.13 Co-culturas podem ser eficientes modelos para analisar interações entre bactérias e plantas

A técnica de cultura de tecidos vegetais permite abordagens de aspectos bioquímicos, moleculares e estruturais para estudos de crescimento e da morfogênese de células vegetais *in vitro*. Se um fragmento vegetal de um organismo íntegro (explante) for colocado em meio de cultura contendo reguladores de crescimento, o controle ao qual estavam mantidas as células é liberado, e uma nova condição é estabelecida. Nesta situação as células podem se

desdiferenciar e tornar-se competentes para diferentes vias de crescimento e diferenciação (EVANS; COLEMAN; KEARNS, 2003).

A utilização de calos, provenientes de cultura de células vegetais, para estudos de associação com microrganismos apresenta inúmeras vantagens, destacando-se: a disponibilidade constante de matéria-prima pouco ou não diferenciada, a relativa homogeneidade celular, a sincronia da fase de desenvolvimento, a facilidade de transferência para repicagem e a ausência de microrganismos interferentes (EVANS; COLEMAN; KEARNS, 2003).

O uso de co-culturas permite avaliar contribuições recíprocas entre as células vegetais e os microrganismos. Essas associações possibilitam o estudo simultâneo da fisiologia dos microrganismos e das células vegetais, relacionando ao desenvolvimento populacional, a atividade de enzimas importantes e a produção de substâncias fundamentais para ambos os tipos de células.

Os trabalhos com co-culturas evidenciam que estímulos ou inibições do crescimento dos microrganismos e da atividade da nitrogenase bacteriana dependem da planta, da bactéria e do meio utilizado para a realização das co-culturas (DEMORANVILLE et al., 1981; HOLSTEN et al., 1971; PENCE et al., 1982; PREININGER et al., 1997). Calos de *Nicotiana tabacum*, *Pennisetum americanum* e *Eremochloa ophiuroides* não sobreviviam quando inoculados com *Azospirillum brasilense* em meio sem fonte de nitrogênio combinado, mas, calos de cana-de-açúcar puderam ser co-cultivados com esta bactéria, com sucesso (VASIL et al. (1979). O microrganismo assegurou a sobrevivência e o crescimento dos tecidos da planta em meio deficiente de nitrogênio, por mais de 18 meses (BERG; VASIL; VASIL., 1979). Child e Kurz (1978) observaram que calos de células de arroz, trigo, cenoura e tabaco, quando em co-cultura, liberaram nutrientes adequados para suprir deficiências nutricionais de microrganismos diazotróficos (*Spirillum* e *Rhizobium*).

1.14 Justificativa

Os estudos iniciais no Laboratório de Fisiologia de Microorganismos, enfocando a interação entre bactéria endofítica diazotrófica e calos de cana-de-açúcar, foram realizados por Martins (2007). Neste trabalho foram estabelecidas as condições ideais para a realização de co-culturas entre os calos e bactérias endofíticas diazotróficas isoladas de cana-de-açúcar. Foi verificada a influência dos calos sobre as bactérias e vice-versa. Foi observado que os calos influenciaram no crescimento bacteriano estimulando-o ou inibindo-o parcialmente. A

atividade específica da nitrogenase foi inibida pelos calos em alguns isolados. A presença de bactérias endofíticas diazotróficas dos gêneros *Herbaspirillum* sp., *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp. levou a um acréscimo do conteúdo protéico total de calos de cana-de-açúcar, em co-culturas em meio isento de N-combinado. Estes resultados demonstraram que a co-cultura entre calos de células vegetais com bactérias endofíticas diazotróficas seria um método apropriado para a observação de acréscimo de nitrogênio combinado, incorporado pelas células vegetais, proveniente da fixação de N₂ (Martins, 2007).

Outro trabalho enviado este ano para publicação (MARTINS et al., 2013) comparou dois sistemas: um, de co-culturas de bactérias diazotróficas com calos e outro, de plântulas de cana-de-açúcar inoculadas com as mesmas bactérias: *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. e *Pantoea* sp. As relações entre diferentes bactérias e as plântulas provocaram efeitos diferentes, pois, *Enterobacter* sp. pôde se multiplicar em todos os órgãos da plântula, *Klebsiella* sp. teve a multiplicação limitada pela plântula e se localizou apenas na raiz e *Pantoea* sp. foi totalmente eliminada pela plântula. Reações similares foram observadas nas co-culturas: *Enterobacter* sp. foi mantida em co-cultura em elevadas populações, *Klebsiella* sp. foi reduzida em 23% e *Erwinia* sp. foi eliminada. Esses resultados mostraram que, tanto as plântulas como os calos podem responder de maneira similar à presença das bactérias e que as reações podem ser diferentes conforme o gênero. Estes dados indicaram um caminho para se evidenciar que co-culturas com calos seriam modelos adequados para o estudo de interações entre plantas e bactérias.

Esse conjunto de resultados levou à proposta de pesquisa de quais mecanismos estariam envolvidos nas diferentes interações planta-microrganismo observadas. No presente trabalho aumentou-se o número de isolados estudados com a intenção de dar continuidade ao estudo da interação entre cana-de-açúcar e bactérias endofíticas, aprofundando-se em alguns mecanismos de defesa da célula vegetal em resposta à inoculação destas bactérias. Estudos da relação entre *Enterobacter* ICB481 com calos de cana-de açúcar foram inseridos no presente trabalho para efeito de comparação com os resultados obtidos com a inoculação desta mesma linhagem em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar. Os dados, em ambos os sistemas, mostraram similaridade.

MARTINS, R. C. R.; SOTO, H. H.; FERRARA, F. I. S.; MONDIN, M.; ARAÚJO, W. L.; FLOH, E. I. S.; QUECINE, M. C.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CHABREGAS, S. M.; BARBOSA, H. R. Sugarcane calluses and plantlets respond similarly to the invasion by diazotrophic *Enterobacter, Klebsiella* and *Erwinia*. Artigo submetido para publicação. 2013.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo estudar a interação entre bactéria e células vegetais indiferenciadas e se propôs a:

- Avaliar a influência do calo de cana-de-açúcar sobre:
- a) o crescimento bacteriano
- b) a atividade da nitrogenase bacteriana
- Avaliar a influência das bactérias endofíticas sobre os seguintes parâmetros do calo de canade-açúcar:
- a) o conteúdo protéico
- b) a liberação de óxido nítrico
- c) a liberação de etileno
- d) a liberação de espécies reativas de oxigênio
- e) o conteúdo de ácido salicílico
- f) o conteúdo de poliaminas

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Biológico

3.1.1 Microrganismos

Foram utilizadas seis diferentes linhagens de bactérias endofíticas fixadoras de N₂ pertencentes à coleção de culturas de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de cana-deaçúcar do Laboratório de Fisiologia de Microorganismos/ICB/USP: *Enterobacter* sp. (ICB113), *Enterobacter* sp. (ICB117), *Klebsiella* sp. (ICB375), *Pseudomonas* sp. (ICB383), *Pantoea* sp. (ICB 409) e *Enterobacter* sp. (ICB481) (Tabela 1).

Tabela 1 – Linhagens bacterianas, órgão e variedade de cana-de-açúcar da qual foram isoladas, número de acesso no GenBank.

Linhagem	Órgão da planta	Nº de acesso	Identidade	Variedade de cana-de-açúcar
ICB113	Caule	HQ413274	Enterobacter sp.	SP791011
ICB117	Caule	HQ413276	Enterobacter sp.	SP791011
ICB375	Raiz	HM055491	Klebsiella sp.	SP801816
ICB383	Raiz	HM055492	Pseudomonas sp.	SP801816
ICB409	Raiz	HM013841	Pantoea sp.	SP801816
ICB481	Raiz	HM748076	Enterobacter sp.	SP801816

3.1.2 Material Vegetal

Culturas de calos de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.), gentilmente fornecidas pelo Centro de Tecnologia Canavieira, induzidas a partir de tecidos de cana-de-açúcar das variedades SP 801816 e SP 791011.

3.2 Meios de Cultura

3.2.1 Meio MS

As culturas de calos foram mantidas a 25 °C±2, no escuro, em meio de cultura MS (Tabela 2) (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com 3 mg.L⁻¹ de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), e 7 g.L⁻¹ de ágar. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 N.

Os calos foram multiplicados por subculturas periódicas (20-30 dias) em meio de cultura MS, no Laboratório de Biologia Celular de Plantas (BIOCEL)/IB/USP.

Tabela 2 - Composição do meio de cultura MS*.

Composto	Concentração Final g.L ⁻¹	
NH_4NO_3	1,65	
KNO_3	1,90	
K_2HPO_4	0,17	
H_3BO_3	0,0062	
KI	0,00083	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,00025	
CoCL ₂ .6H ₂ O	0,000025	
CaCL ₂ .2H ₂ O	0,44	
$MgSO_4.7H_2O$	0,37	
MnSO ₄ .H ₂ O	0,0169	
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0086	
$CuSO_4.5H_2O$	0,00025	
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,0373	
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0278	
Tiamina-HCL	0,0001	
Piridoxina-HCL	0,0005	
Ácido nicotínico	0,0005	
Glicina	0,002	
Mio-inositol	0,1	
Sacarose	20	

^{*} MURASHIGE; SKOOG, 1962.

3.2.2 Meio MS modificado (MSM)

Meio MS isento de fontes de nitrogênio combinado (NH₄NO₃ e KNO₃) foi utilizado nas co-culturas para possibilitar a ocorrência da fixação de nitrogênio. Para o preparo dos meios sólido e semi-sólido foram adicionados 7 e 1,8 g.L⁻¹ de ágar, respectivamente. O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH 1 N.

3.2.3 Meios NFb e JNFb

Para o inóculo, manutenção das culturas e para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), foram utilizados os meios NFb para *Enterobacter* sp. e *Klebsiella* sp. e JNFb para *Pseudomonas* sp. e *Pantoea* sp. (Tabela 3) (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Os meios de cultura NFb e JNFb foram suplementados com 2 mL de Azul

de Bromotimol (0,5% em KOH 2N) e 4 mL de FeEDTA (solução 1,64%). Para o preparo do meio sólido foi adicionado 15 g.L⁻¹ de ágar. O pH do meio JNFb foi ajustado para 5,8 e o do meio NFb para 6,5-6,8 com NaOH 1 N.

Tabela 3 – Composição dos meios de cultura JNFB e NFB *.

Meios	NFb	JNFB
	Concentração Final	Concentração Final
Composto	g.L ⁻¹	$g.L^{-1}$
Àcido málico	5	5
K_2HPO_4	0,5	0,6
$\mathrm{KH_{2}PO_{4}}$		1,8
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02	0,02
$MgSO_4.7H_2O$	0,2	0,2
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,002	0,002
NaCl	0,1	0,1
КОН	4,5	4,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,00008	0,00008
$ZnSO_4.7H_2O$	0,0024	0,0024
H_3BO_3	0,0028	0,0028
MnSO ₄ .H ₂ O	0,00235	0,00235
Biotina	0,00001	0,00001
Piridoxol-HCl	0,00002	0,00002

^{*} DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995.

3.3 Suspensão celular de cana-de-açúcar

Quinhentos miligramas de células de cana-de-açúcar cultivadas em meio MS semisólido foram dissociadas e inoculadas em 50 mL de meio MS líquido em frascos erlenmeyer com capacidade de 250 mL. Estes frascos foram mantidos sob agitação (120 rpm) a 25 °C±2, no escuro, realizando-se subcultivos a cada 21 dias. As suspensões celulares obtidas foram filtradas em peneira de dissociação celular (Sigma[®] S-1145, malha 100 μm) e as células retidas foram utilizadas nos ensaios de medidas de ON (óxido nítrico) e EROs (Espécies Reativas de Oxigênio).

3.4 Preparação do inóculo bacteriano

O inóculo de cada linhagem bacteriana foi preparado no meio de cultura seletivo líquido, ao qual foram adicionadas 1,32 g.L⁻¹ de sulfato de amônio e foi incubado com agitação por 16 horas a 30 °C±2.

3.5 Montagem dos sistemas de co-cultura

Para o estabelecimento dos sistemas de co-cultura (Figura 1) alíquotas de 100 μL desta cultura foram inoculadas em frascos tipo penicilina de 15 mL de volume, contendo 6,0 mL de meio MSM semi-sólido. Um calo de 0,2 g foi colocado na superfície de uma cultura bacteriana recém-inoculada, sendo sustentado por uma rede de algodão estéril presa ao frasco por uma linha de algodão. Os ensaios foram realizados com co-culturas das seis bactérias, individualmente. Para cada ensaio foi montada uma bateria de frascos com a finalidade de realizar as medidas de: crescimento bacteriano, atividade da nitrogenase, conteúdo protéico dos calos, liberação de etileno, óxido nítrico, poliaminas, ácido salicílico e compostos fenólicos. Em frascos contendo meio semi-sólido MS também foi determinado o conteúdo protéico dos calos. Os frascos foram incubados a 25 °C±2, no escuro, por até 8 semanas, sem agitação. As amostras foram retiradas periodicamente.

Figura 1 – Frasco de co-cultura.



3.6 Verificação do efeito dos calos sobre as bactérias

3.6.1 Crescimento bacteriano

Para a contagem de bactérias foram enumeradas as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) pelo método da gota (BARBOSA et al., 1995). Para cada amostragem foram utilizados dois frascos de co-cultura e dois de cultura pura.

3.6.2 Atividade da nitrogenase

A atividade da nitrogenase foi analisada pelo método da redução de acetileno (ARA) (ANDERSON et al., 2004). Para cada amostragem foram utilizados três frascos de co-cultura e três da cultura pura. Aos frascos devidamente vedados foram adicionados 10 % de acetileno e incubados a 30 °C por 48 horas. A produção de etileno foi testada quantitativamente injetando-se 0,1 mL da fase aérea em cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14A, com coluna Porapak-N 80/100 – INOX a 70 °C, injetor a 180 °C e detector a 230 °C. As concentrações das amostras foram calculadas comparando-se com curva padrão de etileno e aplicando-se a equação geral dos gases: n= RT/PV onde n = número de moles de etileno, R = constantes dos gases = 0,082 atm.L.mol⁻¹.K⁻¹, T = temperatura em K, P = pressão em atm e V = volume da amostra em litros.

3.7 Verificação do efeito das bactérias sobre os calos

3.7.1 Conteúdo protéico

Para a determinação do conteúdo protéico, em cada amostragem, foram utilizados cinco calos de 0,2 g cada, que, depois de pesados, foram triturados e submetidos à extração de proteínas. As proteínas foram extraídas com 1,3 mL de tampão fosfato (pH 7,5), contendo 50 mM de fosfato de sódio dibásico, 10 mM de 2-mercaptoetanol e 50 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e incubadas durante 30 minutos a 4 °C. O material foi centrifugado por 10 minutos a 20000 g a 4° C. O precipitado foi re-extraído com 0,2 mL do mesmo tampão. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi armazenado a -20 °C (SILVEIRA et al., 2004). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976),

com albumina bovina como padrão em um espectrofotômetro Cary 50 Bio Spectrophotometer (leitura das amostras e padrão em comprimento de onda de 595 nm).

3.7.2 Liberação de etileno

Para a determinação da liberação de etileno pelos calos, em cada amostragem foram utilizados três frascos de co-cultura, três frascos da cultura pura bacteriana e três frascos de calo sem inoculação bacteriana. Todos os frascos utilizados foram montados de acordo com o item 3.5. A produção de etileno pelo calo de cana-de-açúcar foi testada quantitativamente injetando-se 1 mL da fase aérea em cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14A, com coluna Porapak-N 80/100 – INOX a 70 °C, injetor a 180 °C e detector a 230 °C. As concentrações das amostras foram calculadas comparando-se com curva padrão de etileno e aplicando-se a equação geral dos gases: n= RT/PV onde n = número de moles de etileno, R = constantes dos gases = 0,082 atm.L.mol⁻¹.K⁻¹, T = temperatura em K, P = pressão em atm e V = volume da amostra em litros.

3.7.3 Liberação de óxido nítrico – Técnica 1

A quantificação de ON foi determinada através da medida de nitrito nos meios de cultura onde foram realizadas: as culturas de calo controle as co-culturas de calo de cana-deaçúcar com as linhagens bacterianas estudadas. Alíquotas de 50 μL do meio de cultura líquido foram incubadas com um volume igual de reagente de Griess (Promega, Madison, WI, EUA). A Densidade Óptica foi determinada em leitor de ELISA (Bio-Rad) ajustado a comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos em μM de NO₂- com base em curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂).

3.7.4 Liberação de óxido nítrico – Técnica 2

A quantificação de ON nas suspensões celulares foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Silveira et al. (2006). Sessenta miligramas de células de cana-de-açúcar em suspensão foram inoculadas em 1 mL de meio MS e mantidas em cultura, sob agitação de 60 rpm, a 25 °C±2 por 1 hora. Para a quantificação do ON extracelular, adicionouse o marcador de fluorescência DAR-4M (diaminorhodamine 4M) que é impermeável à membrana plasmática. Para se quantificar o ON intracelular utilizou-se o reagente DAR-4M

AM (diaminorhodamine 4M acetoxymethyl ester) que é permeável à membrana plamática. Após a adição destes reagentes, aproximadamente 10^4 células bacterianas.mL⁻¹, provenientes do inóculo descrito no item 3.4, foram adicionadas às células em suspensão. Imediatamente após a adição das bactérias procedeu-se à quantificação da fluorescência por um período de18 horas, a 25 °C±2. A quantificação da fluorescência foi determinada utilizando-se um fluorômetro (Victor 3TM – PerkinElmer), com excitação em comprimentos de onda de 560 nm e emissão em 575 nm.

3.7.5 Conteúdo de espécies reativas de oxigênio

A quantificação de EROs nas suspensões celulares foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Laxalt et al. (2007). Sessenta miligramas de células de cana-de-açúcar em suspensão foram inoculadas em 1 mL de meio MS e mantidas em cultivo, sob agitação de 60 rpm, a 25 °C±2,por 1 hora. Após 30 minutos adicionaram-se: o reagente H₂DCFDA (2'-7'-diclorofluoresceína diacetato) e as bactérias em concentração de aproximadamente 10⁴ mL⁻¹ provenientes do inóculo descrito no item 3.4,. A quantificação da fluorescência foi determinada por um período de 18 horas, a 25 °C±2, utilizando-se um fluorômetro (Victor 3TM – PerkinElmer), com excitação em comprimentos de onda de 502 nm e emissão em 523 nm.

3.7.6 Poliaminas

Para a análise de poliaminas foram utilizados calos em co-culturas e calos controle. Amostras de 200 mg de calos de cana-de-açúcar foram trituradas em 1,4 mL de ácido perclórico (PCA) 5% (v/v). O material triturado foi incubado a 4 °C por uma hora e posteriormente centrifugado a 20000 g por 20 minutos a 4 °C. O precipitado foi re-extraído com 0,2 mL de PCA 5% e submetido a nova centrifugação. O sobrenadante contendo as poliaminas livres foi armazenado a -20 °C. As poliaminas conjugadas foram extraídas por hidrólise ácida, utilizando-se 0,2 mL do sobrenadante em volume igual de HCl 12 N, por 18 h a 110 °C no escuro. As amostras foram então secas a 40 °C sob jato de nitrogênio e ressuspendidas em 180 μL de PCA 5% (SILVEIRA et al., 2004).

As poliaminas livres e conjugadas foram derivatizadas misturando-se $40~\mu L$ da amostra a $100~\mu L$ de cloreto de dansil (5 mg.m L^{-1} em acetona), $50~\mu L$ de solução saturada de NaHCO₃ e $20~\mu L$ de 1,7-diaminoheptano (DAH). Após a mistura, as amostras foram

incubadas por 50 min a 70 °C, no escuro. Com a adição de 25 μL de prolina (100 mg.mL⁻¹), o excesso do cloreto de dansil foi convertido em dansil-prolina incubando por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, as poliaminas derivatizadas foram particionadas com 200 μL de tolueno. A fase apolar foi coletada (175 μL), seca sob jato de nitrogênio e ressuspendida em 175 μL de acetonitrila. A identificação e quantificação das poliaminas foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando-se uma coluna C18 de fase reversa (Shimadzu Shim-pack CLC ODS). Como fase móvel foram utilizadas as soluções de acetonitrila absoluta e acetonitrila 10% em água, com pH de 3,5 ajustado com HCl 1 N. O programa de eluição da fase móvel iniciou com 65 % de acetonitrila absoluta e foi gradativamente aumentando até 100 % durante um tempo total de corrida de 35 min com fluxo de 1 mL.min⁻¹, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado com comprimento de onda de excitação a 340 nm e emissão a 510 nm. Foram injetados 20 μL de cada amostra derivatizada com o cloreto de dansil. As áreas dos picos, os tempos de retenção e a concentração de cada poliamina foram identificados e quantificados comparando-se com seus padrões (putrescina, cadaverina, espermidina e espermina).

3.7.7 Produção de ácido salicílico

Para a análise da produção de ácido salicílico foram utilizados calos em co-culturas e calos controle. Quinhentos miligramas de calo foram triturados com 1 mL de metanol 90% e 60 μL de DHBA (3,4 ácido dihidroxibenzoico). As amostras foram sonicadas por 5 minutos e centrifugadas a 14000 g por 5 minutos a 20 °C. O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi lavado com 0,5 mL de metanol 100%. Aos sobrenadantes coletados adicionou-se 10 μL de hidróxido de sódio 0,2 M. As amostras foram então secas em SpeedVac em temperatura ambiente até restar aproximadamente 50 μL. Ao resíduo foram adicionados 250 μL de ácido tricloroacético 5%. As amostras foram particionadas com 800 µL de acetato de etila:ciclohexano (1:1, v/v). A fase superior contendo o ácido salicílico livre foi coletada. A fase inferior foi particionada novamente. As amostras foram então secas em SpeedVac em temperatura ambiente até restar aproximadamente 25 µL e ressuspendidas em 300 µL de metanol 90%. O ácido salicílico conjugado foi extraído por hidrólise ácida, adicionando-se 300 µL de HCl 8M à fase aquosa da etapa anterior por 1 hora a 80 °C. As amostras foram particionadas novamente com 800 µL de acetato de etila:ciclohexano (1:1, v/v). A fase superior foi coletada, seca em SpeedVac e ressuspendida em 300 µL de metanol 90% (VERBERNE et al., 2002).

A identificação e quantificação do ácido salicílico foi realizada por HPLC, utilizandose uma coluna C18 de fase reversa (Supelco-Supelcosil). Como fase móvel foi utilizada uma solução contendo metanol 10% e acetato de sódio 0,2M com pH de 2,9 ajustado com HCl 12 N. O tempo total de corrida foi de 15 minutos com fluxo de 1 mL.min⁻¹, a 40 °C. O detector de fluorescência foi ajustado com comprimento de onda de excitação a 295 nm e emissão a 412 nm. Foram injetados 20 μL de cada amostra. As áreas dos picos, os tempos de retenção e a concentração do ácido salicílico foram identificados e quantificados comparando-se com seu padrão.

3.8 Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram representados com média e desvio padrão.

Para a análise dos dados de poliaminas e de produção de etileno foi realizado o teste ANOVA (P < 0.05) seguido por teste de Dunnett (P < 0.05).

Para a análise dos demais dados foi realizado o teste ANOVA (P < 0.05) seguido por teste de Tukey (P < 0.05).

4 RESULTADOS

A primeira etapa deste trabalho foram montadas co-culturas com seis linhagens pertencentes a quatro diferentes gêneros bacterianos. Culturas de *Enterobacter* ICB113 e *Enterobacter* ICB117 foram repetidas para confirmação dos dados. *Enterobacter* ICB481 foi aqui estudada com duas finalidades: -de verificar se linhagens distintas do mesmo gênero apresentavam respostas diferentes ou similares e -comparar as respostas provocadas por essa bactéria quando inoculada em plântulas ou em co-cultura com calos. Analisou-se a atividade da nitrogenase e o crescimento bacteriano em cultura pura e em co-cultura com o calo de cana-de-açúcar.

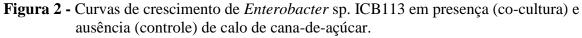
4.1 Efeito dos calos sobre as bactérias – Crescimento bacteriano

4.1.1 Enterobacter sp. ICB113

A figura 2 mostra as curvas de crescimento de *Enterobacter* sp. ICB113 em presença e ausência de calo de cana-de-açúcar. A fase logarítmica de ambas as culturas durou 24 horas. Após 6 horas do início do cultivo, a população bacteriana em co-cultura apresentou crescimento mais acentuado e significativo que o controle. Essa prevalência foi observada até o final do experimento. Apesar da ligeira queda após 168 horas, a população em co-cultura foi, em média, 10% maior que a população controle (Tabela 1 – Apêndice).

4.1.2 Enterobacter sp. ICB117

No ensaio realizado com *Enterobacter* sp. ICB117, as populações bacterianas permaneceram 48 horas em fase exponencial. Após 168 horas, estabeleceu-se um ligeiro declínio das populações em co-cultura e em cultura pura até o fim do experimento (Tabela 2 – Apêndice). A análise estatística demonstrou que, apesar do declínio, após a fase exponencial, a população em co-cultura foi significativamente estimulada, sendo em média 12% maior que a população controle (Figura 3).



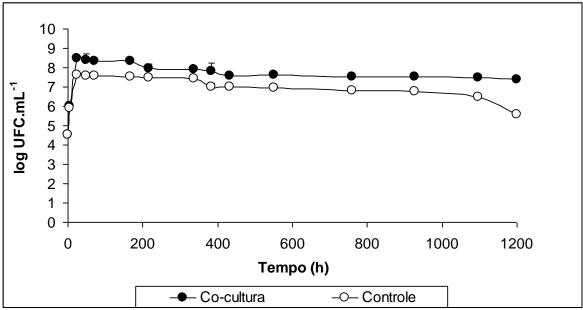
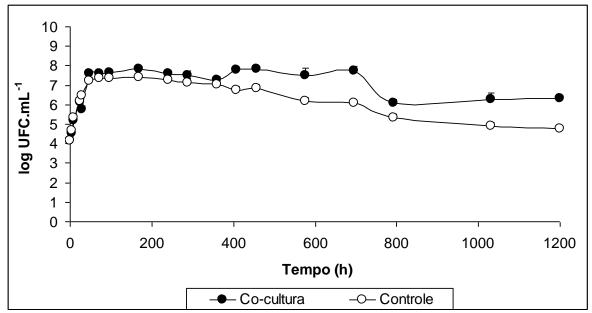


Figura 3 – Curvas de crescimento de *Enterobacter* sp. ICB117 em presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar.



4.1.3. Enterobacter sp. ICB481

A figura 4 mostra as curvas de crescimento de *Enterobacter* sp. ICB481 em cultura pura e em contato com o calo. Pode-se verificar que a fase exponencial de crescimento durou 48 horas no controle e 96 horas na co-cultura. Após este período, o número de UFC das duas populações caiu até 312 horas, permanecendo estável até o fim do experimento. A análise estatística mostrou que os valores de crescimento da bactéria em co-cultura foram significativamente maiores do que os do controle. A população em co-cultura cresceu, em média, 8,6% mais que a população controle.

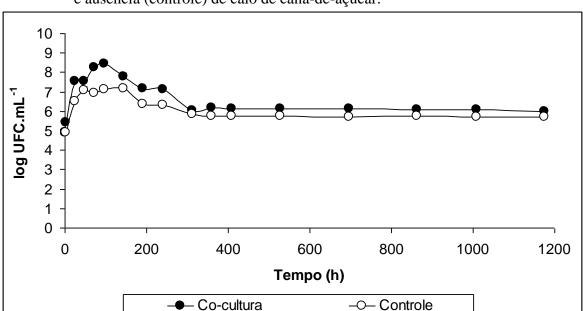


Figura 4 – Curvas de crescimento de *Enterobacter* sp. ICB481 em presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar.

4.1.4 Comparação entre as linhagens de Enterobacter

As três linhagens de *Enterobacter* sp. utilizadas neste trabalho (ICB117, ICB113 e ICB481), quando comparadas, mostraram um estímulo significativo no crescimento em cocultura em relação a cultura pura. Os dados mostram que as três populações de *Enterobacter* sp. atingiram valores máximos de UFC próximos: ICB113 e ICB481 em torno de 3,0.10⁸ UFC.mL⁻¹, enquanto ICB117 em torno de 7,0.10⁷ UFC.mL⁻¹, porém, o estímulo nas primeiras 100 horas foi maior nas co-culturas de ICB113 e ICB481.

4.1.5 Klebsiella sp. ICB375

Na co-cultura de *Klebsiella* sp. ICB375 os valores de UFC foram significativamente maiores que os da cultura pura até 144 horas. Em seguida, houve uma queda desta população em duas etapas até 408 horas, quando os dados praticamente estabilizaram até 1000 horas, havendo nova queda. Após 144 horas, os valores de UFC do controle foram sempre significativamente maiores que os da co-cultura (Figura 5) (Tabela 4 – Apêndice).

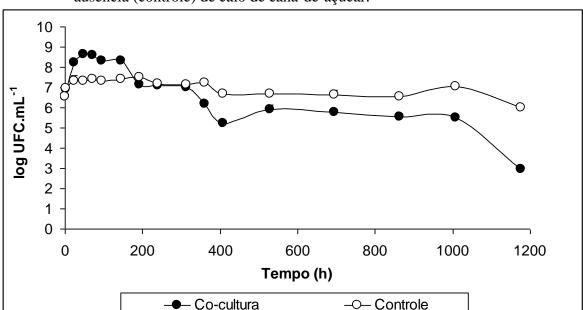


Figura 5 – Curvas de crescimento de *Klebsiella* sp. ICB375 em presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar.

4.1.6 Pseudomonas sp. ICB383

Quando em cultura pura, *Pseudomonas* sp. ICB383 apresentou uma fase exponencial de crescimento de 30 horas (Figura 6). Após 96 horas de cultivo ocorreu uma queda na população que, estabilizou após 216 horas. A fase exponencial, da co-cultura, apresentou duração de 30 horas. A população em co-cultura começou a diminuir após 48 horas com valores estatisticamente iguais ao controle, estabilizando após 216 horas em número significativamente menor que o controle (Tabela 5 – Apêndice).

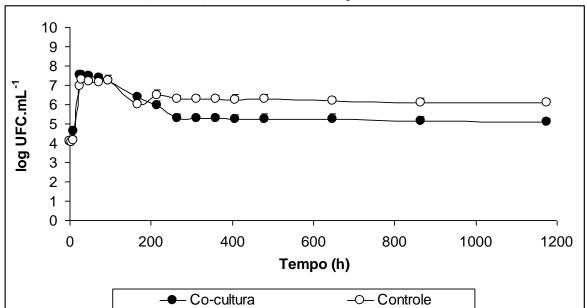


Figura 6 – Curvas de crescimento de *Pseudomomas* sp. ICB383 em presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar.

Comparando-se os perfis das curvas de crescimento de *Pseudomonas sp* ICB383 e de *Klebsiella* sp. ICB375 em cultura pura e em co-cultura verifica-se que ambos foram bastante semelhantes.

4.1.7 Pantoea sp. ICB409

Outra bactéria utilizada para o ensaio de co-cultura foi *Pantoea* sp. ICB409 (Figura 7) cuja curva de crescimento mostrou um perfil diferente das outras bactérias testadas. Até 48 horas o número de UFC de *Pantoea* sp. ICB409, em ambas as culturas, foi muito similar. Após 72 horas os valores de UFC da co-cultura foram significativamente menores que os valores da cultura pura. Após 960 horas de cultivo observou-se uma grande inibição do crescimento apenas da bactéria em co-cultura, finalizando o experimento com a morte da população (Tabela 6 – Apêndice).

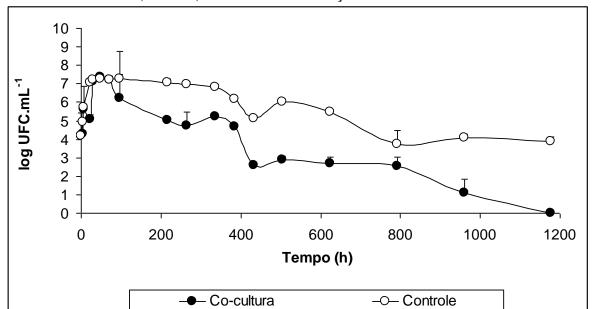


Figura 7 – Curvas de crescimento de *Pantoea* sp. ICB409 em presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar.

4.2 Efeito dos calos sobre as bactérias – Atividade da nitrogenase

4.2.1 Enterobacter sp. ICB113

A figura 8 mostra o efeito do calo sobre a atividade específica da nitrogenase de *Enterobacter* sp. ICB113. Foram observados valores baixos de atividade, que variaram entre 0,05 e 2,77 fmol.UFC⁻¹.h⁻¹ na população controle e entre 0,05 e 3,55 fmol.UFC⁻¹.h⁻¹ na população em co-cultura. A nitrogenase se manteve ativa no controle por 432 horas enquanto na co-cultura por 760 horas (Tabela 7 – Apêndice). Estatisticamente, os valores foram diferentes em duas situações: em 24 horas (co-cultura maior que controle), e em 48 horas (controle maior que co-cultura).

4.2.2 Enterobacter sp. ICB117

Os valores de atividade específica da nitrogenase de *Enterobacter* sp. ICB117 em cocultura foram significativamente mais elevados, durante as quatro primeiras horas de experimento (Figura 9). Os valores na co-cultura variaram entre 10,77 e 3238,00 fmol.UFC⁻¹.h⁻¹ e no controle entre 0,51 e 161,00 fmol.UFC⁻¹.h⁻¹ (Tabela 8 – Apêndice). A enzima manteve-se ativa por mais tempo na população em co-cultura (360 horas) do que na população controle (288 horas).

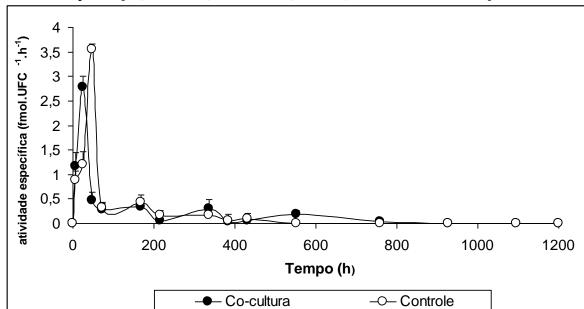
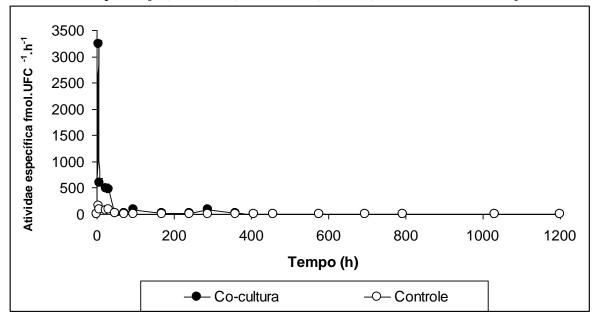


Figura 8 – Curvas de atividade específica da nitrogenase de *Enterobacter* sp. ICB113 em presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar.

Figura 9 – Curvas de atividade específica da nitrogenase de *Enterobacter* sp. ICB117 em presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar.



4.2.3 Enterobacter sp. ICB481

Os valores de atividade específica de *Enterobacter* sp. ICB481 variaram entre 0,08 e 151,35 fmol.UFC⁻¹.h⁻¹ na co-cultura e no controle, entre 1,43 e 124,92 fmol.UFC⁻¹.h⁻¹ (Tabela 9 – Apêndice). Entre 24 e 144 horas, a atividade da nitrogenase foi mais alta no controle que na co-cultura. Após 144 horas não se detectou atividade em nenhuma das condições. Entre 24

e 144 horas os valores do controle foram significativamente maiores que os da co-cultura (Figura 10).

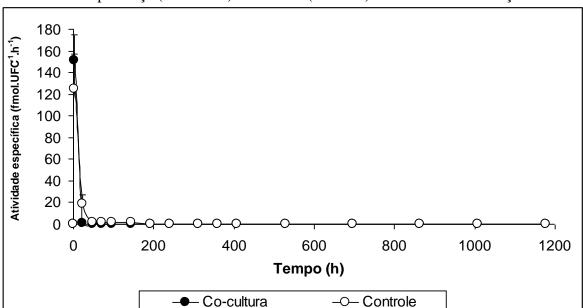


Figura 10 – Curvas de atividade específica da nitrogenase de *Enterobacter* sp. ICB481 em presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar.

4.2.4 Comparação entre as linhagens de Enterobacter

Ao comparar as três linhagens de *Enterobacter* sp. estudadas, observou-se que os valores de atividade da nitrogenase em cultura pura de *Enterobacter* sp. ICB113 foram os menores, enquanto que nas outras duas linhagens (ICB117 e ICB481) os valores foram muito próximos. Em co-cultura com os calos, *Enterobacter* sp. ICB117 apresentou valores da atividade da nitrogenase muito maiores em relação àqueles de *Enterobacter* sp. ICB113 e ICB481. Os valores de atividade em co-cultura das linhagens ICB113 e ICB481 foram de 20 a 30% maiores que aos observados em cultura pura. O tempo no qual a nitrogenase se manteve ativa foi diferente entre as linhagens. Os tempos em que a enzima se manteve ativa foram de 760 horas para a linhagem *Enterobacter* sp. ICB113 em contato com o calo de cana-de-açúcar e de 432 horas em cultura pura. O menor tempo de atividade foi de 144 horas em *Enterobacter* sp. ICB481 tanto em co-cultura como em cultura pura.

4.2.5 Klebsiella sp. ICB375

Os valores de atividade específica de *Klebsiella* sp. ICB375 variaram entre 0,07 e 6,57 fmol.UFC⁻¹.h⁻¹ na co-cultura e entre 0,44 e 8,90 fmol.UFC⁻¹.h⁻¹ no controle (Tabela 10 – Apêndice). Entre 24 e 144 horas, a atividade da nitrogenase foi mais alta no controle que na co-cultura. Após 240 horas não se detectou atividade em nenhuma das condições. Entre 24 e 96 horas, os valores do controle foram significativamente maiores que os da co-cultura (Figura 11).

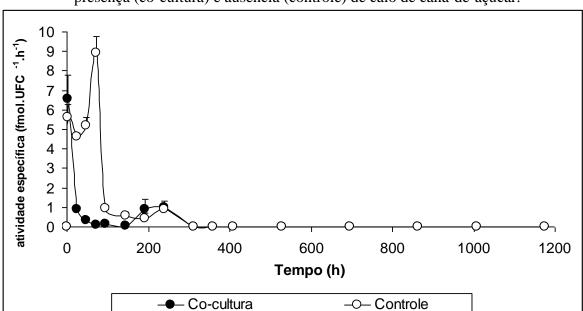


Figura 11 – Curvas de atividade específica da nitrogenase de *Klebsiella* sp. ICB375 em presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar.

4.2.6 Pseudomonas sp. ICB383

A figura 12 mostra as curvas de atividade específica da nitrogenase de *Pseudomonas* sp. ICB383 em co-cultura e em cultura pura. Em presença do calo a enzima se manteve ativa durante 760 horas, com valores entre 0,20 e 6,25 fmol.UFC⁻¹.h⁻¹, e no controle, por 384 horas, entre 0,08 e 1,05 fmol.UFC⁻¹.h⁻¹ (Tabela 11 – Apêndice). Estatisticamente a atividade da nitrogenase foi maior na co-cultura em relação ao controle entre 48 horas e 552 horas.

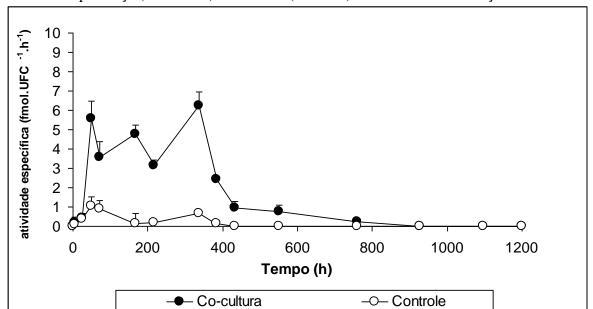


Figura 12 – Curvas de atividade específica da nitrogenase de *Pseudomonas* sp. ICB383 em presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar.

4.2.7 Pantoea sp. ICB409

A figura 13 mostra os valores de atividade específica da nitrogenase de *Pantoea* sp. ICB409 em co-cultura e no controle. A enzima se manteve ativa apenas durante 24 horas em co-cultura, com valores 1,24 e 7,53 fmol.UFC⁻¹.h⁻¹ e por 48 horas no controle com valores entre 2,88 e 79,57 fmol.UFC⁻¹.h⁻¹ (Tabela 12 – Apêndice). A atividade da nitrogenase foi significativamente maior no controle em relação à co-cultura entre 4 horas e 48 horas.

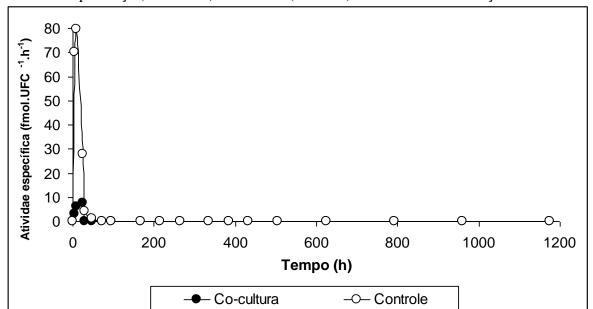


Figura 13 – Curvas de atividade específica da nitrogenase de *Pantoea* sp. ICB409 em presença (co-cultura) e ausência (controle) de calo de cana-de-açúcar.

4.3 Efeito das bactérias sobre os calos

4.3.1 Conteúdo Protéico

Ao comparar as curvas de medidas de proteína de calos em meio MSM (isento de nitrogênio combinado – calos controle) pode-se verificar que algumas bactérias fixadoras de nitrogênio contribuíram para o conteúdo proteico das células vegetais. Onde havia nitrogênio combinado no meio de cultura (meio MS) o conteúdo protéico foi significativamente maior do que apenas nos calos controle ou que nos calos em co-cultura. Os calos cultivados em meio MSM não apresentaram variação significativa em seu conteúdo protéico.

As figuras 14 a 19 mostram os valores de conteúdo protéico dos calos em co-cultura com as seis linhagens analisadas. Após 168 horas, os calos em co-cultura, apresentaram incrementos protéicos significativos em relação aos calos controle, variando entre 23,3 e 50,8%, com exceção daqueles que cresceram em presença de *Pantoea* sp. ICB409. O maior incremento (50,8%) foi observado em calos co-cultivados com *Enterobacter* sp. ICB481 seguidos daqueles em contato com *Enterobacter* sp. ICB117 que tiveram em média um incremento de 41,4%. Os calos em co-cultura com *Pseudomonas* sp. ICB383 tiveram um incremento em média de 32,9%. Calos co-cultivados com *Enterobacter* sp. ICB113 e *Klebsiella* sp. ICB375 tiveram, em média, um incremento de 26,9% e 23,3% respectivamente.

Ao comparar a quantidade de proteína dos calos cultivados com as três linhagens de *Enterobacter* sp. pode-se observar diferentes níveis de incremento: ICB113 – 26,9%, ICB117 – 41,4%, ICB481 – 50,8%.

Figura 14 – Conteúdo protéico de calo de cana-de-açúcar cultivado em meio MS e MSM em presença (co-cultura) ou ausência (controle) de *Enterobacter* sp. ICB113.

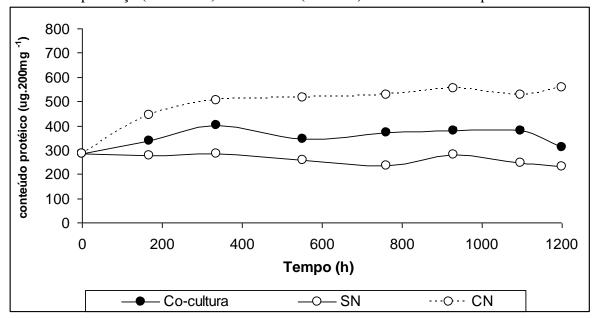
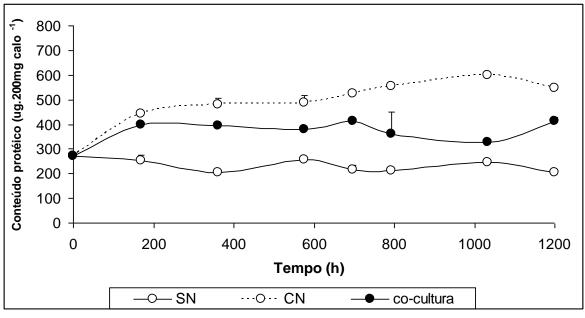
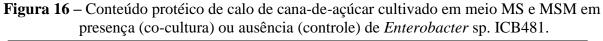


Figura 15 – Conteúdo protéico de calo de cana-de-açúcar cultivado em meio MS e MSM em presença (co-cultura) ou ausência (controle) de *Enterobacter* sp. ICB117.





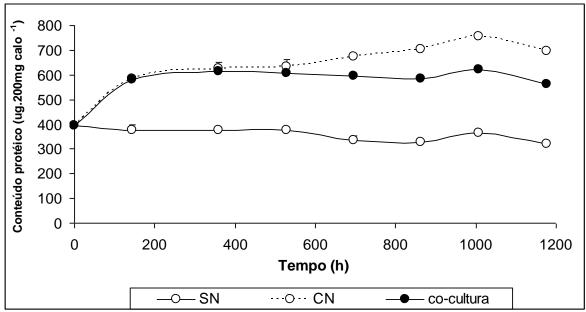
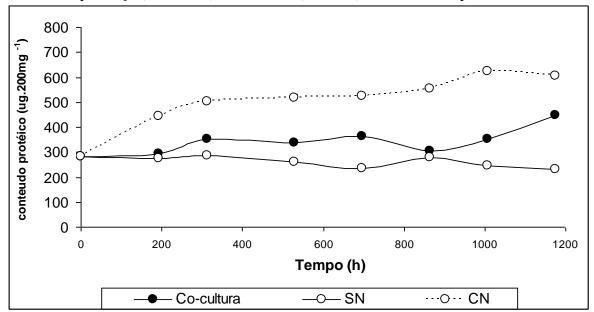
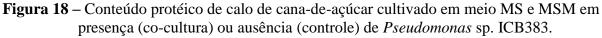


Figura 17 – Conteúdo protéico de calo de cana-de-açúcar cultivado em meio MS e MSM em presença (co-cultura) ou ausência (controle) de *Klebsiella* sp. ICB375.





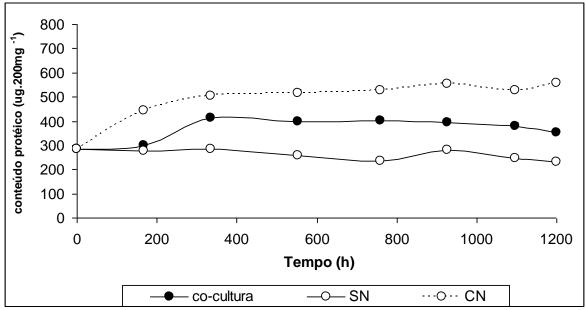
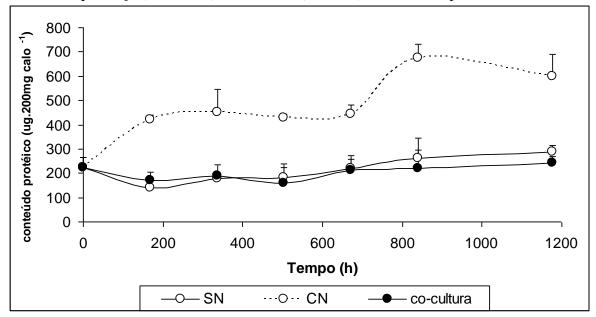


Figura 19 – Conteúdo protéico de calo de cana-de-açúcar cultivado em meio MS e MSM em presença (co-cultura) ou ausência (controle) de *Pantoea* sp. ICB409.



Resposta de defesa das plantas frente às bactérias

4.3.2 Liberação de Óxido Nítrico

Após observar as diferentes interações entre as bactérias endofíticas diazotróficas e os calos de cana-de-açúcar foi verificada a liberação de algumas substâncias relacionadas à resposta de defesa da planta. A primeira substância testada foi o óxido nítrico (ON). Foram utilizadas duas técnicas para essa análise. A produção de ON pela primeira técnica foi determinada quantificando-se nitrito (NO₂⁻) no meio de cultura. Como esta resposta é rápida, os ensaios aqui mostrados são de 96 horas. Nas figuras 20 a 25 verificam-se os valores, ao longo do tempo, de liberação de ON pelas células vegetais em co-cultura e da relação ON/UFC de cada uma das seis linhagens analisadas. Nos calos controle não foi observada a liberação de ON.

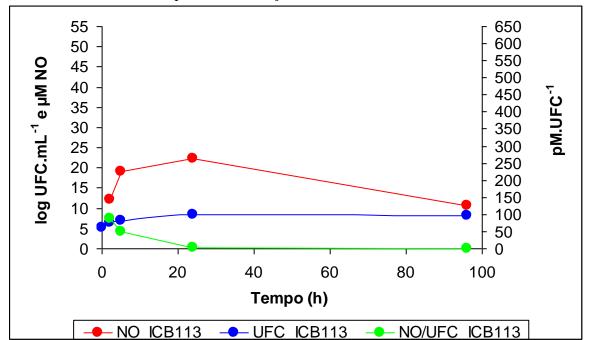
Em todos os ensaios observou-se um aumento da liberação de ON ao longo de 24 horas. Os maiores aumentos foram de duas para cinco horas e continuaram a subir em menores proporções até 24 horas, quando então sofreram queda em torno de 50%. Os valores máximos medidos em cada cultura foram: em co-culturas com *Enterobacter* sp. ICB113, com valor total de 22,27 μM, com *Enterobacter* sp. ICB117, de 21,69 μM, com *Enterobacter* sp. ICB481, de 22,67 μM, com *Klebsiella* sp. ICB375, de 24,86μM, com *Pseudomonas* sp. ICB383 23,22 μM. O perfil de liberação em presença de *Pantoea* sp. ICB409 foi diferente, pois, aumentou a quantidade de ON até 24 horas com valor mais que 100% maior que o de 5 horas, (de 25,86 a 54,63 μM), apresentando uma queda até 96 horas. Os dados mostram que as bactérias estimularam de maneira diferente a liberação de ON pelos calos. Ficou evidente que o estímulo da produção de ON por *Pantoea* sp. ICB409 foi a maior.

Comparando-se as curvas de liberação de ON dos calos em co-cultura com as três linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481) pode-se observar que ao longo do tempo as liberações foram semelhantes.

Ao analisar a relação entre o ON liberado pelo calo e o número de bactérias pode-se verificar que calos com *Enterobacter* sp.ICB117 e *Klebsiella* sp. ICB375 apresentaram os maiores valores iniciais (cerca de 600 pM). Calos com *Enterobacter* sp. ICB113 apresentaram o menor valor inicial (cerca de 88 pM), enquanto observaram-se valores intermediários em calos com *Pantoea* sp. ICB409 (cerca de 250 pM); com *Enterobacter* sp. ICB481 e com *Pseudomonas* sp. ICB383 (cerca de 200 e 150 pM, respectivamente).

A relação ON/UFC das duas linhagens de *Enterobacter* sp. ICB113 e ICB117 evoluiu de maneira semelhante, terminando com os menores valores observados (entre 1 e 2 pM). *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 também evoluíram de maneira semelhante (valores finais entre 12 e 15 pM). Para *Pantoea* sp. ICB409 foram determinados ao longo do processo valores elevados terminando com 34 pM. Para *Enterobacter* sp. ICB481 foram obtidos valores de difícil explicação para o tempo de 96 horas, pois, foram bastante elevados em relação aos demais (123 pM).

Figura 20 – Medida de liberação de ON por calos de cana-de-açúcar em co-cultura com *Enterobacter* sp. ICB113, relação ON/UFC e curva de crescimento bacteriano.



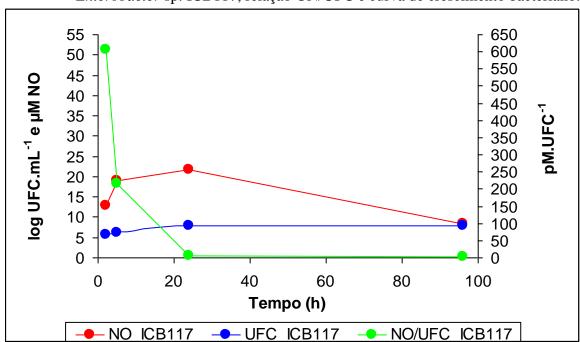
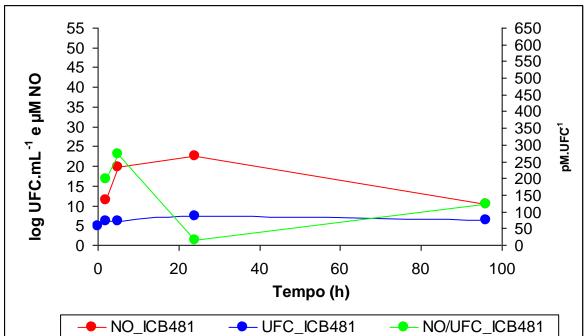


Figura 21 – Medida de liberação de ON por calos de cana-de-açúcar em co-cultura com *Enterobacter* sp. ICB117, relação ON/UFC e curva de crescimento bacteriano.

Figura 22 – Medida de liberação de ON por calos de cana-de-açúcar em co-cultura com *Enterobacter* sp. ICB481, relação ON/UFC e curva de crescimento bacteriano.



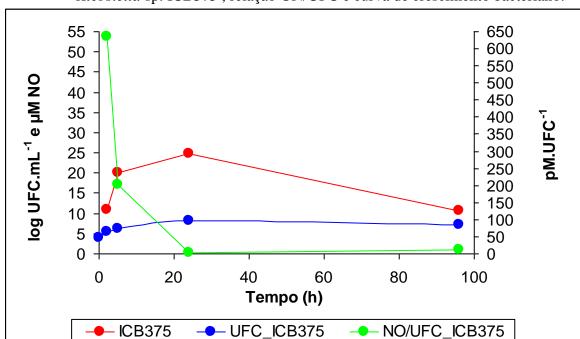
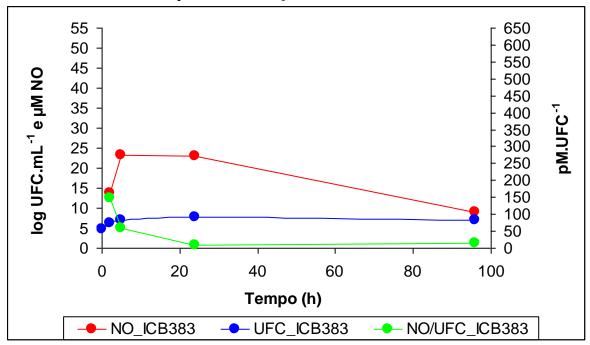


Figura 23 – Medida de liberação de ON por calos de cana-de-açúcar em co-cultura com *Klebsiella* sp. ICB375 , relação ON/UFC e curva de crescimento bacteriano.

Figura 24 – Medida de liberação de ON por calos de cana-de-açúcar em co-cultura com *Pseudomonas* sp. ICB383 , relação ON/UFC e curva de crescimento bacteriano.



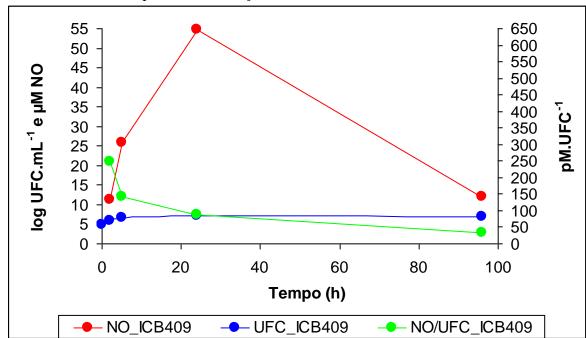


Figura 25 – Medida de liberação de ON por calos de cana-de-açúcar em co-cultura com *Pantoea* sp. ICB409, relação ON/UFC e curva de crescimento bacteriano.

Uma segunda técnica de medida de ON foi utilizada para confirmação dos resultados extracelulares, acrescentando medidas intracelulares. No entanto, com este método não é possível se realizar medidas de UFC. Esta técnica mediu a produção de óxido nítrico pela adição de dois tipos de fluoróforos à suspensão de células de cana-de-açúcar. Um fluoróforo se liga ao ON intracelular enquanto que o outro se liga ao ON extracelular. As figuras 26 e 27 mostram a variação do conteúdo de ON intracelular e extracelular respectivamente.

Ao longo de 18 horas pode-se observar um aumento do conteúdo de ON intra e extracelular tanto das células controle quanto das células em co-cultura com as bactérias.

O conteúdo intracelular de ON das células de cana-de-açúcar em co-cultura com as três linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481) foi muito semelhante ao conteúdo das células controle. Em média, o conteúdo de ON em contato com estas linhagens aumentou 2% em relação ao controle. Quando em contato com *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Klebsiella* sp. ICB375 foi observado um aumento de cerca de 17% no conteúdo de ON em relação ao controle. O maior aumento (cerca de 28%) em relação ao conteúdo de ON do controle foi verificado nas células em contato com *Pantoea* sp. ICB409. A análise estatística mostrou que, ao longo do tempo, não houve diferença em relação ao conteúdo de ON intracelular entre células controle e células com *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481). Com *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Klebsiella* sp. ICB375 houve aumento significativo do conteúdo de ON em relação ao controle após 40 minutos de co-cultivo. Com

Pantoea sp. ICB409 este tempo foi ainda menor, pois, em 20 minutos de co-cultivo pode-se observar aumento significativo em relação ao controle.

O conteúdo extracelular de ON das células de cana-de-açúcar em co-cultura com as três linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481) foi em média 5% maior em relação ao conteúdo das células controle. Do mesmo modo que no conteúdo intracelular, pode-se observar que o conteúdo de ON extracelular as células em contato com *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Klebsiella* sp. ICB375 foi muito semelhante entre estas duas linhagens, sendo em média 10 e 9% maiores, respectivamente. Novamente, foi *Pantoea* sp. ICB409, a linhagem que propiciou o maior aumento (19%) do conteúdo de ON em relação ao controle.

A análise estatística mostrou que, entre 60 e 660 minutos de co-cultivo, houve diferença em relação ao conteúdo de ON extracelular entre células controle e células com *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481). Com *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Klebsiella* sp. ICB375 houve aumento significativo do conteúdo de ON em relação ao controle após 20 minutos de co-cultivo. Com *Pantoea* sp. ICB409 o conteúdo de ON extracelular também aumentou significativamente em relação ao controle em 20 minutos de co-cultivo.

O perfil do conteúdo de ON observado para todas as linhagens testadas, usando-se esta técnica, foi similar ao determinado pela primeira técnica.

Ao compararmos os dois métodos de quantificação de ON extracelular durante as primeiras 18 horas, foi possível observar aumento do conteúdo de ON liberado pelas células vegetais em contato com as bactérias por ambas as metodologias. Pode-se verificar também que nos períodos (2 e 5 horas) medidos pelos dois métodos foi possível observar aumento significativo do conteúdo de ON das células vegetais em co-cultura.

Figura 26 – Medida do conteúdo intracelular de ON por calos de cana-de-açúcar controle e em co-cultura com *Enterobacter* sp. ICB113, *Enterobacter* sp. ICB117, *Klebsiella* sp. ICB375, *Pseudomonas* sp. ICB383, *Pantoea* sp. ICB409 e *Enterobacter* sp. ICB481.

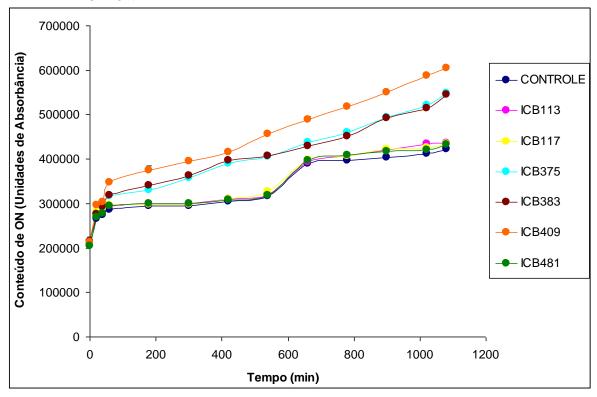
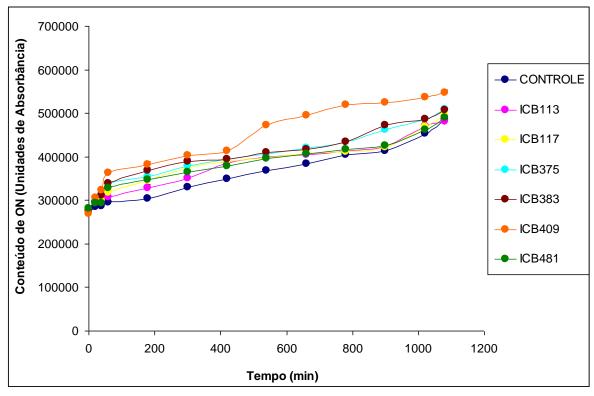


Figura 27 – Medida do conteúdo extracelular de ON por calos de cana-de-açúcar controle e em co-cultura com *Enterobacter* sp. ICB113, *Enterobacter* sp. ICB117, *Klebsiella* sp. ICB375, *Pseudomonas* sp. ICB383, *Pantoea* sp. ICB409 e *Enterobacter* sp. ICB481.



4.3.3 Liberação de Etileno

Outra substância analisada foi o etileno. As figuras 28 a 33 mostram as medidas de liberação de etileno por calos controle e em co-cultura com as bactérias, utilizadas ao longo do tempo. Os calos controle liberaram em média 5,00 nmol.mL⁻¹ de etileno de maneira constante ao longo do tempo. A produção de etileno pelos calos em co-cultura com *Enterobacter* sp. ICB113, *Enterobacter* sp. ICB117, *Enterobacter* sp. ICB481 e *Pantoea* sp. ICB409 aumentou gradualmente até 72 horas, com queda depois desse período. Nas co-culturas de *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 os valores de etileno aumentaram até 168 horas também com queda depois desse período.

Ao longo do tempo pode-se observar que os valores de etileno liberado por calos em co-cultura com as linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481) foi muito semelhante, o mesmo aconteceu com os valores liberados por *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383. O pico máximo de liberação de etileno ocorreu durante a fase estacionária de *Enterobacter* sp. ICB113 (16,81 nmol.mL⁻¹), *Enterobacter* sp. ICB117 (17,78 nmol.mL⁻¹), *Enterobacter* sp. ICB481 (14,93 nmol.mL⁻¹) e *Pantoea* sp. ICB409 (27,67

nmol.mL⁻¹). Em *Klebsiella* sp. ICB375 (24,71 nmol.mL⁻¹) e *Pseudomonas* sp. ICB383 (18,72 nmol.mL⁻¹) o pico de liberação de etileno coincidiu com o início da fase de declínio das populações em co-cultura.

Os valores de liberação de etileno pelos calos em co-culturas, foram significativamente diferentes, nas seguintes situações:

- maiores que nos calos controle em 24 e 48 horas para *Enterobacter* sp. ICB113 e *Enterobacter* sp. ICB117;
 - maiores em 72 e 168 horas para *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Klebsiella* sp. ICB375,
 - entre 24 e 168 horas para Pantoea sp. ICB409
 - apenas em 72 horas para *Enterobacter* sp. ICB481.

Figura 28 – Curva de crescimento de *Enterobacter* sp. ICB113 em ausência (controle) e presença (co-cultura) de calo de cana-de-açúcar e medida de liberação de etileno pelos calos de cana-de-açúcar em ausência e presença de *Enterobacter* sp. ICB113.

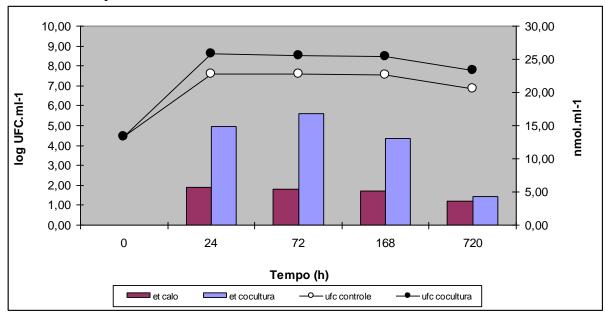


Figura 29 – Curva de crescimento de *Enterobacter* sp. ICB117 em ausência (controle) e presença (co-cultura) de calo de cana-de-açúcar e medida de liberação de etileno pelos calos de cana-de-açúcar em ausência e presença de *Enterobacter* sp. ICB117.

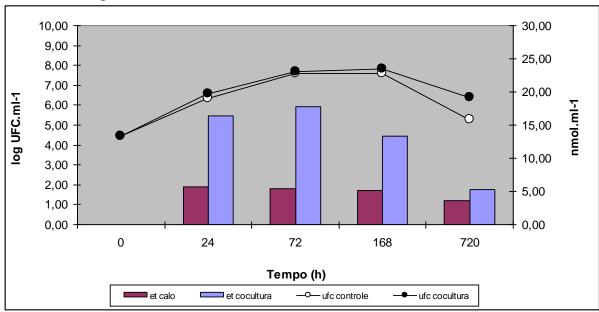


Figura 30 – Curva de crescimento de *Enterobacter* sp. ICB481 em ausência (controle) e presença (co-cultura) de calo de cana-de-açúcar e medida de liberação de etileno pelos calos de cana-de-açúcar em ausência e presença de *Enterobacter* sp. ICB481.

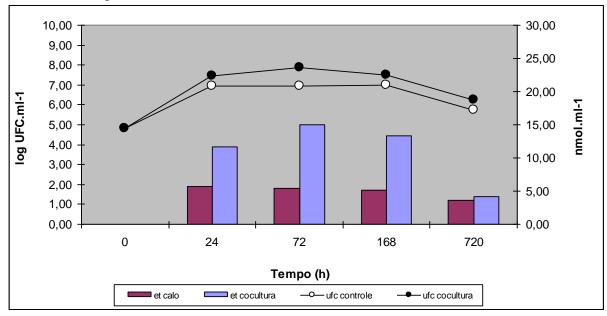


Figura 31 – Curva de crescimento de *Klebsiella* sp. ICB375 em ausência (controle) e presença (co-cultura) de calo de cana-de-açúcar e medida de liberação de etileno pelos calos de cana-de-açúcar em ausência e presença de *Klebsiella* sp. ICB375.

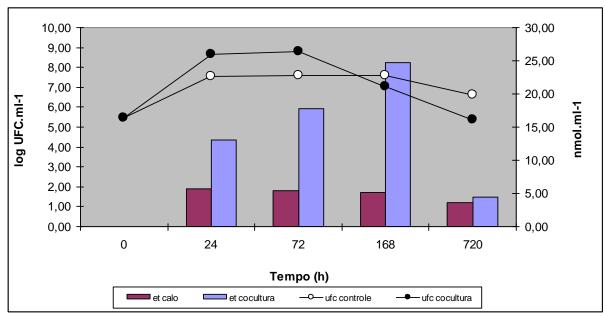
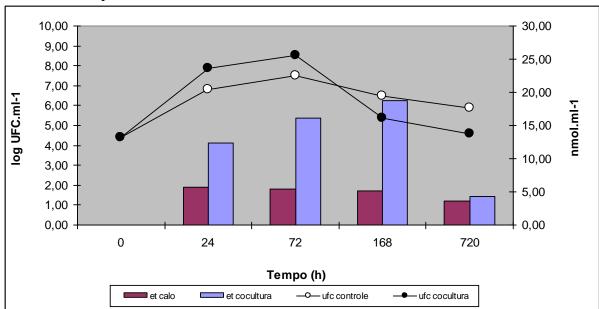


Figura 32 – Curva de crescimento de *Pseudomonas* sp. ICB383 em ausência (controle) e presença (co-cultura) de calo de cana-de-açúcar e medida de liberação de etileno pelos calos de cana-de-açúcar em ausência e presença de *Pseudomonas* sp. ICB383.



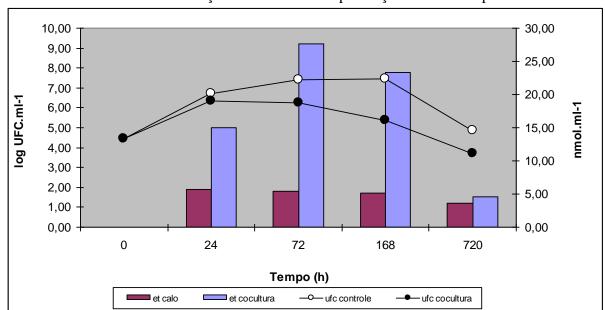


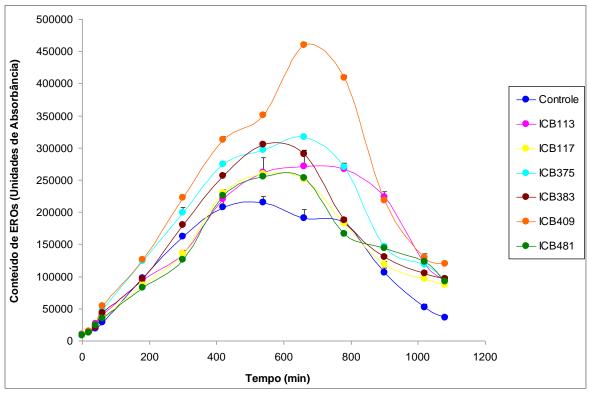
Figura 33 – Curva de crescimento de *Pantoea* sp. ICB409 em ausência (controle) e presença (co-cultura) de calo de cana-de-açúcar e medida de liberação de etileno pelos calos de cana-de-açúcar em ausência e presença de *Pantoea* sp. ICB409.

4.3.4 Conteúdo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

A figura 34 mostra o conteúdo de EROs de células de cana-de-açúcar controle e calos em co-cultura com as seis linhagens bacterianas. Pode-se observar a produção crescente de EROs até 660 minutos em todos os tratamentos analisados. Após este período, os valores diminuíram bastante até 1080 minutos. Até 40 minutos de interação, os valores permaneceram muito próximos aos das células controle.

O conteúdo de EROs das células em co-cultura com *Enterobacter* sp. ICB113 foi por 540 minutos estatisticamente igual ao conteúdo das células controle. Quando co-cultivadas com *Enterobacter* sp. ICB117 e *Enterobacter* sp. ICB481 as células só alteraram significativamente o conteúdo de EROs após 900 minutos. Valores intermediários e significativamente diferentes a partir de 540 minutos também foram observados em *Pseudomonas* sp. ICB 383 e *Klebsiella* sp. ICB375. Os maiores valores foram observados em células em co-cultura com *Pantoea* sp. ICB409 com diferença significativa a partir de 40 minutos. O conteúdo de EROs foi em média, 83% maior em células em contato com *Pantoea* sp. ICB409 em relação ao controle. Em células com *Enterobacter* sp. o conteúdo em relação ao controle variou bastante: ICB113 – 45%, ICB117 – 25% e ICB481 – 30%. Em *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 o conteúdo foi 50 e 39% maior em média, respectivamente.

Figura 34 – Conteúdo de espécies reativas de oxigênio de calos controle e de calos em cocultura com *Enterobacter* sp. ICB113, *Enterobacter* sp. ICB117, *Klebsiella* sp. ICB375, *Pseudomonas* sp. ICB 383, *Pantoea* sp. ICB409 e *Enterobacter* sp. ICB481.



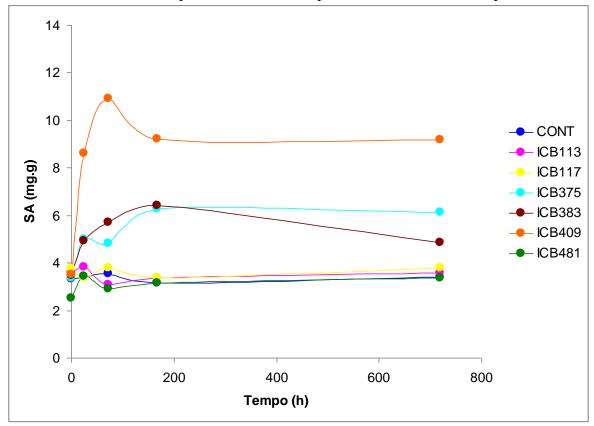
4.3.5 Conteúdo de Ácido Salicílico (AS)

Outra substância analisada e que está relacionada com a resposta de defesa da planta foi o ácido salicílico. Foram feitas medidas de ácido salicílico livre e de ácido salicílico conjugado.

A figura 35 mostra o conteúdo de AS livre de calos de cana-de-açúcar controle e de calos em contato com as diferentes linhagens bacterianas utilizadas. Pode-se observar que os valores de AS nos calos em co-cultura com *Enterobacter* sp. ICB113, *Enterobacter* sp. ICB117 e *Enterobacter* sp. ICB481 foram muito semelhantes aos do calo controle. Valores em média 51% maiores foram observados em calos co-cultivados com *Klebsiella* sp. (ICB 375) e *Pseudomonas* sp. (ICB 383). Os maiores valores foram determinados em calos em co-cultura com *Pantoea* sp. (ICB 409) (em média, 128% maiores que o controle). A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa entre os valores de calos controle com os cultivados com as três linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481). Houve diferenças entre as outras linhagens e os calos controle: após 72 horas em *Klebsiella*

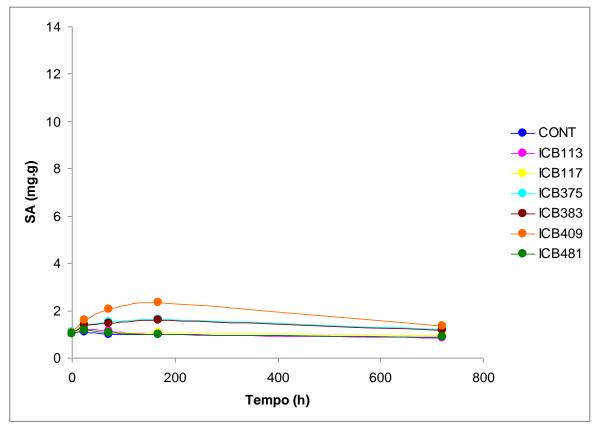
sp.ICB375, entre 72 e 168 horas em *Pseudomonas* sp. ICB383 e após 0 horas em *Pantoea* sp. ICB409.

Figura 35 – Conteúdo de ácido salicílico livre de calos controle e de calos em co-cultura com *Enterobacter* sp. ICB113, *Enterobacter* sp. ICB117, *Klebsiella* sp. ICB 375, *Pseudomonas* sp. ICB383, *Pantoea* sp. ICB409 e *Enterobacter* sp. ICB481.



A figura 36 mostra o conteúdo de AS conjugado de calos de cana-de-açúcar controle e de calos em contato com as diferentes linhagens bacterianas utilizadas. Os valores de AS conjugado observados foram menores em relação aos de AS livre nos calos. Da mesma forma que na análise de AS livre, os valores de AS dos calos em contato com as três linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481) foram estatisticamente iguais aos valores dos calos controle. Entre 24 e 720 horas os conteúdos de AS de calos com *Klebsiella* sp. (ICB 375), *Pseudomonas* sp. (ICB 383) e *Pantoea* sp. (ICB 409) foram significativamente maiores que o de calos controle, 48%, 47% e 128%, respectivamente.

Figura 36 – Conteúdo de ácido salicílico conjugado de calos controle e de calos em cocultura com *Enterobacter* sp. ICB113, *Enterobacter* sp. ICB117, *Klebsiella* sp. ICB375, *Pseudomonas* sp. ICB383, *Pantoea* sp. ICB409 e *Enterobacter* sp. ICB481.



A figura 37 mostra o conteúdo de SA total (livre + conjugado) de calos de cana-de-açúcar controle e de calos em contato com as diferentes linhagens bacterianas utilizadas. Os maiores valores de SA total foram observados em calos em co-cultura com *Pantoea* sp. (ICB 409). Valores intermediários foram observados em calos com *Klebsiella* sp. (ICB 375) e *Pseudomonas* sp. (ICB 383), e valores muito próximos aos do controle em calos com as três linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481). Entre 24 e 720 horas o conteúdo de SA de calos com *Klebsiella* sp. (ICB 375), *Pseudomonas* sp. (ICB 383) e *Pantoea* sp. (ICB 409) foi significativamente maior que o de calos controle, 35%, 33% e 68%, respectivamente.

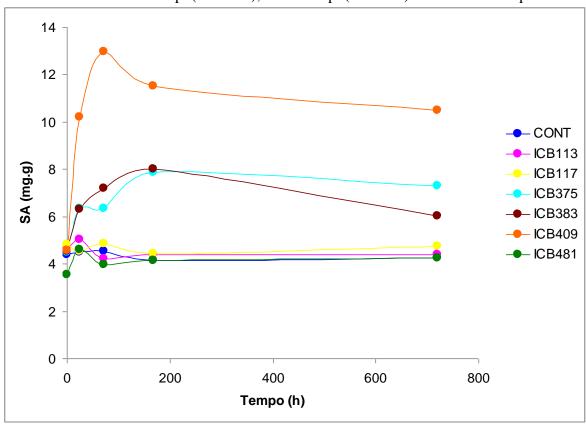


Figura 37 – Conteúdo de ácido salicílico total de calos controle e de calos em co-cultura com *Enterobacter* sp. (ICB 113), *Enterobacter* sp. (ICB 117), *Klebsiella* sp. (ICB 375), *Pseudomonas* sp. (ICB 383), *Pantoea* sp. (ICB 409) e *Enterobacter* sp. ICB481.

4.3.6 Conteúdo de Poliaminas

O conteúdo de poliaminas foi analisado em calos controle e em calos em co-cultura com as diferentes linhagens bacterianas utilizadas. Foram feitas medidas de poliaminas livres e de poliaminas conjugadas.

A tabela4 mostra o conteúdo de poliaminas livres totais. Calos em co-cultura com as três linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481) foram estatisticamente iguais ao conteúdo de poliaminas dos calos controle. Entre 24 e 168 horas, os calos co-cultivados com *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 aumentaram significativamente a liberação de poliaminas livres totais em relação aos calos controle. Os maiores valores foram observados em calos em contato com *Pantoea* sp. ICB409.

O conteúdo de putrescina foi diferente do controle apenas em calos com *Klebsiella* sp. ICB375 em 168 horas. O conteúdo de cadaverina foi diferente em 72 horas em calos com *Enterobacter* sp. ICB117 e ICB481, e em 24 horas em calos com *Pantoea* sp. ICB409.

As maiores variações observadas no conteúdo das poliaminas foram de espermidina e espermina dos calos em co-cultura em relação aos calos controle. O conteúdo de espermidina

dos calos em co-cultura foi diferente dos calos controle nos seguintes tempos analisados: em 72 horas em *Enterobacter* sp. ICB113, *Enterobacter* sp. ICB117, *Enterobacter* sp. ICB481 e *Pseudomonas* sp. ICB383; em 24 e 168 horas em *Klebsiella* sp. ICB375; e em 24 e 72 horas em *Pantoea* sp.ICB409. O conteúdo de espermina dos calos em co-cultura foi diferente dos calos controle nos seguintes tempos analisados: em 24 e 72 horas em *Enterobacter* sp. ICB113; em 24 horas em *Enterobacter* sp. ICB117; entre 24 e 168 horas em *Enterobacter* sp. ICB481 e em *Pseudomonas* sp. ICB383; entre 24 e 720 horas em *Klebsiella* sp. ICB375 e em *Pantoea* sp.ICB409.

A tabela 5 mostra o conteúdo de poliaminas conjugadas. Pode-se observar que os valores de putrescina e cadaverina conjugadas foram semelhantes aos valores destas substâncias na forma livre, tanto em calos em co-cultura como controle. Os valores de espermina e espermidina conjugadas e livres foram diferentes. O conteúdo de poliaminas conjugadas totais foi muito semelhante em todos os calos analisados, diferindo significativamente apenas em 24 e 72 horas em calos em contato com *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 e de 24 a 720 horas em calos com *Pantoea* sp.ICB409.

Em relação a cada poliamina analisada, pode-se observar aumento significativo em relação ao controle nos seguintes casos: putrescina em calos com *Pantoea* sp.ICB409 em 72 horas; cadaverina em calos com *Enterobacter* sp. ICB481 em 168 horas; espermidina em calos com *Klebsiella* sp. ICB375 entre 24 a 168 horas, com *Pseudomonas* sp. ICB383 em 72 horas e *Pantoea* sp.ICB409 entre 72 a 720 horas; espermina em calos com *Enterobacter* sp. ICB117 em 24 horas.

A tabela 6 mostra o conteúdo de poliaminas totais. Calos co-cultivados com *Enterobacter* sp. ICB113, ICB117 e ICB481 possuem conteúdos de poliaminas totais estatisticamente iguais aos de calos controle. Entre 24 e 168 horas, os calos com *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 aumentaram significativamente seu conteúdo de poliaminas em relação aos calos controle. Em calos com *Pantoea* sp. ICB409 puderam ser observados os maiores valores com diferença significativa entre 24 e 720 horas. Em calos com *Pantoea* sp. ICB409 o conteúdo de putrescina diferiu de calos controle em 72 horas e o de cadaverina em 24 horas. O conteúdo de espermidina aumentou em relação ao controle entre 24 e 168 horas em calos tanto com *Klebsiella* sp. ICB375 e quanto com *Pantoea* sp. ICB409. O conteúdo de espermina diferiu do controle em todos os calos em co-cultura: em *Enterobacter* sp. ICB113 e ICB117 em 24 horas; entre 24 e 168 horas em *Klebsiella* sp. ICB375, *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Enterobacter* sp.ICB481; e entre 24 e 720 horas em *Pantoea* sp. ICB409.

Tabela 4 – Conteúdo de poliaminas livres de calos controle e de calos em co-cultura.

Tabela 4 – Conteúdo de j					
Controle	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
0	$4,05\pm0,13$	$0,25\pm0,01$	$6,45\pm0,13$	$4,07\pm0,11$	14,82
24	4,42±0,19	$0,21\pm0,01$	$10,54\pm0,05$	$3,51\pm0,06$	18,68
72	$4,40\pm0,04$	$0,36\pm0,02$	$15,75\pm0,04$	$3,88\pm0,19$	24,39
168	$3,47\pm0,15$	$0,25\pm0,01$	$12,35\pm0,12$	$3,20\pm0,07$	19,27
720	$3,72\pm0,12$	$0,23\pm0,01$	$13,09\pm0,17$	$3,76\pm0,04$	20,80
ICB113 - Enterobacter	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
0	$4,09\pm0,12$	$0,19\pm0,01$	$7,42\pm0,08$	$4,35\pm0,27$	16,05
24	$4,39\pm0,21$	$0,15\pm0,01$	$10,17\pm0,10$	$9,40\pm0,10$	24,11
72	$4,59\pm0,15$	$0,26\pm0,01$	$8,88\pm0,08$	$7,88\pm0,28$	21,61
168	$4,38\pm0,31$	$0,08\pm0,01$	$9,45\pm0,08$	$5,13\pm0,25$	19,04
720	$3,45\pm0,08$	$0,17\pm0,01$	$10,00\pm0,11$	$4,39\pm0,23$	18,01
ICB117 - Enterobacter					
Tempo (h)	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
0	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
24	$4,67\pm0,16$	$0,15\pm0,01$	$6,58\pm0,12$	$3,32\pm0,06$	14,72
72	$4,57\pm0,15$	$0,11\pm0,01$	$9,01\pm0,18$	$7,53\pm0,04$	21,22
168	$4,80\pm0,29$	$0,18\pm0,01$	$10,91\pm0,34$	$5,60\pm0,07$	21,49
720	$4,32\pm0,43$	$0,23\pm0,02$	$13,06\pm0,15$	$4,14\pm0,38$	21,75
ICB481 - Enterobacter	$3,37\pm0,11$	$0,14\pm0,02$	$13,32\pm0,27$	$3,08\pm0,05$	19,91
Tempo (h)	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
0	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
24	$4,67\pm0,41$	$0,08\pm0,01$	$4,51\pm0,15$	$3,69\pm0,11$	12,95
72	$4,76\pm0,22$	$0,13\pm0,01$	$9,65\pm0,04$	$7,12\pm0,07$	21,66
168	$4,75\pm0,29$	$0,09\pm0,00$	$10,64\pm0,39$	$8,01\pm0,11$	23,49
720	$3,87\pm0,11$	$0,13\pm0,01$	$10,99\pm0,21$	$6,94\pm0,19$	21,93
ICB375 - Klebsiella	$4,16\pm0,19$	$0,08\pm0,01$	$11,31\pm0,11$	$3,76\pm0,03$	19,31
Tempo (h)					
0	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
24	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
72	$4,78\pm0,26$	$0,10\pm0,01$	$6,02\pm0,07$	$3,95\pm0,21$	14,85
168	$5,93\pm0,18$	$0,23\pm0,01$	$14,21\pm0,14$	$12,37\pm0,13$	32,74
720	$6,84\pm0,24$	$0,53\pm0,03$	18,06±0,15	$12,44\pm0,09$	37,87
ICB383 - Pseudomonas	$6,48\pm0,09$	0.31 ± 0.02	$16,17\pm0,22$	$8,78\pm0,13$	31,74
Tempo (h)	$3,9\pm0,19$	$0,23\pm0,01$	11,06±0,10	$6,39\pm0,19$	21,58
0	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
24	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
72	4,61±0,24	$0,15\pm0,01$	$7,72\pm0,10$	4,70±0,33	17,18
168	6,02±0,03	$0,25\pm0,01$	10,92±0,24	8,11±0,16	25,30
720	6,64±0,10	0.31 ± 0.01	11,28±0,17	10,32±0,39	28,55
ICB409 - Pantoea	5,51±0,16	$0,17\pm0,02$	11,22±0,35	$7,03\pm0,02$	23,93
Tempo (h)	4,38±0,09	0.16 ± 0.02	10,54±0,36	6,26±0,15	21,34
0	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
24	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
72	4,83±0,30	$0,23\pm0,02$	$7,02\pm0,18$	3,70±0,21	15,78
168	4,42±0,25	0.50 ± 0.04	16,99±0,22	19,21±0,15	41,12
720	$7,15\pm0,16$	0.35 ± 0.01	29,00±0,39	52,84±0,44	89,34
	4,46±0,28	$0,13\pm0,01$	15,42±0,08	$10,57\pm0,12$	30,58
	$4,41\pm0,06$	$0,22\pm0,02$	$12,32\pm0,16$	$8,64\pm0,11$	25,59

Tabela 5 – Conteúdo de poliaminas conjugadas de calos controle e de calos em co-cultura.

Tabela 5 – Conteúdo de	Cabela 5 – Conteúdo de poliaminas conjugadas de calos controle e de calos em co-cultura.							
Controle	PUT	CAD	SPD	SPM	PA			
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais			
0	$4,09\pm0,06$	$0,14\pm0,01$	$4,12\pm0,29$	$3,11\pm0,09$	11,46			
24	$4,49\pm0,07$	$0,15\pm0,01$	$4,89\pm0,36$	$2,53\pm0,09$	12,06			
72	$3,25\pm0,21$	$0,19\pm0,01$	$3,90\pm0,13$	$4,36\pm0,25$	11,70			
168	$4,17\pm0,06$	$0,10\pm0,01$	$3,73\pm0,47$	$2,80\pm0,05$	10,80			
720	$3,63\pm0,12$	$0,15\pm0,01$	$4,80\pm0,34$	$3,02\pm0,12$	11,60			
ICB113 - Enterobacter	PUT	CAD	SPD	SPM	PA			
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais			
0	$4,23\pm0,17$	$0,13\pm0,01$	$4,27\pm0,17$	$3,81\pm0,05$	12,44			
24	$3,89\pm0,19$	$0,09\pm0,01$	$3,92\pm0,16$	$4,28\pm0,16$	12,18			
72	$4,05\pm0,28$	$0,11\pm0,01$	$3,76\pm0,09$	$3,30\pm0,07$	11,22			
168	$3,82\pm0,08$	$0,08\pm0,01$	$3,83\pm0,09$	$3,96\pm0,13$	11,69			
720	$3,89\pm0,05$	$0,10\pm0,01$	$4,33\pm0,26$	$3,82\pm0,20$	12,14			
ICB117 - Enterobacter	PUT	CAD	SPD	SPM	PA			
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais			
0	$4,28\pm0,20$	$0,13\pm0,01$	$3,73\pm0,08$	$2,72\pm0,05$	10,85			
24	$4,29\pm0,28$	$0,08\pm0,01$	$4,76\pm0,36$	$5,29\pm0,33$	14,42			
72	$2,90\pm0,11$	$0,06\pm0,01$	$4,94\pm0,17$	$3,40\pm0,08$	11,30			
168	$3,44\pm0,10$	$0,10\pm0,01$	$3,81\pm0,08$	$3,47\pm0,08$	10,83			
720	$3,87\pm0,14$	$0,11\pm0,01$	$5,14\pm0,31$	$3,00\pm0,07$	12,12			
ICB481 - Enterobacter	PUT	CAD	SPD	SPM	PA			
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais			
0	$3,55\pm0,12$	$0,14\pm0,02$	$4,62\pm0,15$	$4,86\pm0,31$	13,17			
24	$3,98\pm0,38$	$0,22\pm0,02$	$6,83\pm0,43$	$3,56\pm0,12$	14,59			
72	$4,51\pm0,24$	$0,08\pm0,01$	$3,31\pm0,06$	$4,67\pm0,40$	12,57			
168	$3,61\pm0,39$	$0,26\pm0,01$	$3,88\pm0,26$	$4,29\pm0,29$	12,04			
720	$3,82\pm0,11$	$0,1\pm0,01$	$3,77\pm0,12$	$4,09\pm0,07$	11,78			
ICB375 - Klebsiella	PUT	CAD	SPD	SPM	PA			
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais			
0	4,21±0,06	0.05 ± 0.01	$3,12\pm0,06$	$3,45\pm0,12$	10,83			
24	$3,82\pm0,05$	0.06 ± 0.01	$7,77\pm0,33$	$3,40\pm0,11$	15,05			
72	4,03±0,08	0,31±0,03	$7,56\pm0,13$	4,20±0,10	16,10			
168	$3,36\pm0,07$	0.09 ± 0.01	$6,84\pm0,26$	4,07±0,10	14,36			
720	3,39±0,11	0.16 ± 0.02	$6,69\pm0,22$	3,31±0,08	13,55			
ICB383 - Pseudomonas	PUT	CAD	SPD	SPM	PA			
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais			
0	4,18±0,09	$0,10\pm0,01$	3,63±0,11	3,59±0,09	11,50			
24	3,85±0,18	0.09 ± 0.01	$6,97\pm0,28$	4,37±0,16	15,28			
72	$3,81\pm0,11$	0.07 ± 0.01	$7,04\pm0,11$	4,07±0,14	14,99			
168	$4,14\pm0,14$	0.10 ± 0.02	$6,26\pm0,19$	$3,23\pm0,05$	13,73			
720	3,78±0,05	$0,09\pm0,01$	6,71±0,18	2,81±0,03	13,39			
ICB409 - Pantoea	PUT	CAD	SPD	SPM	PA			
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais			
0	$3,74\pm0,10$	0.16 ± 0.01	$3,60\pm0,22$	$3,14\pm0,03$	10,64			
24	$5,17\pm0,23$	0.27 ± 0.01	$7,04\pm0,28$	$4,48\pm0,33$	16,96			
72	$6,49\pm0,05$	0.12 ± 0.00	8,66±0,20	$3,28\pm0,04$	18,55			
168	$4,47\pm0,27$	0.14 ± 0.01	$8,30\pm0,21$	4,46±0,24	17,37			
720	$3,95\pm0,07$	$0,14\pm0,01$	$7,23\pm0,28$	$5,07\pm0,32$	16,39			

Tabela 6 – Conteúdo de poliaminas totais de calos controle e de calos em co-cultura.

Tabela 6 – Conteudo de	1				
Controle	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
0	8,14±0,19	0.39 ± 0.01	10,57±0,41	7,18±0,19	26,29
24	8,91±0,26	0.36 ± 0.02	15,43±0,41	6,04±0,14	30,74
72	$7,65\pm0,25$	$0,55\pm0,03$	19,65±0,17	8,24±0,44	36,09
168	$7,64\pm0,21$	0.35 ± 0.01	16,08±0,59	6,00±0,12	30,07
720	$7,35\pm0,24$	$0,15\pm0,02$	$17,89\pm0,51$	$6,78\pm0,15$	32,40
ICB113 - Enterobacter	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
0	$8,32\pm0,28$	$0,32\pm0,02$	$11,69\pm0,25$	$8,16\pm0,32$	28,50
24	$8,28\pm0,40$	$0,24\pm0,02$	$14,09\pm0,26$	$13,68\pm0,26$	36,29
72	$8,64\pm0,43$	$0,37\pm0,01$	$12,64\pm0,16$	$11,18\pm0,35$	32,83
168	$8,20\pm0,39$	$0,16\pm0,01$	$13,28\pm0,17$	$9,09\pm0,38$	30,73
720	$7,34\pm0,13$	$0,27\pm0,01$	$14,33\pm0,37$	$8,21\pm0,43$	30,15
ICB117 - Enterobacter	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
0	$8,95\pm0,36$	$0,28\pm0,02$	$10,31\pm0,21$	$6,04\pm0,11$	25,58
24	$8,85\pm0,43$	$0,19\pm0,01$	$13,77\pm0,54$	$12,82\pm0,37$	35,64
72	$7,70\pm0,40$	$0,24\pm0,02$	$15,85\pm0,51$	$9,00\pm0,15$	32,79
168	$7,76\pm0,53$	$0,33\pm0,02$	$16,87\pm0,23$	$7,61\pm0,46$	32,57
720	$7,24\pm0,25$	$0,25\pm0,02$	$18,46\pm0,58$	$6,08\pm0,12$	32,03
ICB481 - Enterobacter	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
0	$8,22\pm0,53$	$0,22\pm0,02$	$9,13\pm0,29$	$8,55\pm0,42$	26,12
24	$8,74\pm0,60$	$0,35\pm0,03$	$16,48\pm0,47$	$10,68\pm0,18$	36,25
72	$9,26\pm0,53$	$0,17\pm0,01$	$13,95\pm0,46$	$12,68\pm0,51$	36,06
168	$7,48\pm0,49$	$0,39\pm0,01$	$14,87\pm0,47$	$11,23\pm0,47$	33,97
720	$7,98\pm0,30$	$0,18\pm0,02$	$15,08\pm0,22$	$7,85\pm0,10$	31,09
ICB375 - Klebsiella	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
0	$8,99\pm0,32$	$0,15\pm0,01$	$9,14\pm0,13$	$7,40\pm0,33$	25,68
24	$9,75\pm0,22$	$0,29\pm0,02$	$21,98\pm0,47$	$15,77\pm0,24$	47,79
72	$10,87\pm0,32$	$0,84\pm0,05$	$25,62\pm0,28$	$16,64\pm0,19$	53,96
168	$9,84\pm0,15$	$0,40\pm0,03$	$23,01\pm0,49$	$12,85\pm0,23$	46,09
720	$7,29\pm0,29$	$0,39\pm0,02$	$17,75\pm0,32$	$9,70\pm0,27$	35,13
ICB383 - Pseudomonas	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
0	$8,79\pm0,33$	$0,25\pm0,02$	$11,35\pm0,20$	$8,29\pm0,41$	28,68
24	$9,87\pm0,20$	$0,34\pm0,02$	$17,89\pm0,52$	$12,48\pm0,32$	40,58
72	$10,45\pm0,21$	$0,38\pm0,01$	$18,32\pm0,29$	$14,39\pm0,53$	43,54
168	$9,65\pm0,30$	$0,27\pm0,03$	$17,48\pm0,54$	$10,26\pm0,06$	37,66
720	$8,16\pm0,14$	$0,25\pm0,03$	$17,25\pm0,54$	$9,07\pm0,18$	34,73
ICB409 - Pantoea	PUT	CAD	SPD	SPM	PA
Tempo (h)	mg/g	mg/g	mg/g	mg/g	totais
0	$8,57\pm0,40$	$0,39\pm0,03$	$10,62\pm0,41$	$6,84\pm0,23$	26,42
24	$9,59\pm0,49$	$0,75\pm0,05$	$24,03\pm0,49$	$23,69\pm0,48$	58,06
72	$13,64\pm0,21$	$0,47\pm0,01$	$37,66\pm0,59$	$56,12\pm0,48$	107,89
168	$8,93\pm0,55$	$0,27\pm0,01$	$23,72\pm0,29$	$15,03\pm0,36$	47,95
720	$8,36\pm0,13$	$0,36\pm0,02$	$19,55\pm0,44$	$13,71\pm0,44$	41,98

5 DISCUSSÃO

Os estudos atuais de interações entre cana-de-açúcar e bactérias endofíticas diazotróficas evidenciaram que estas bactérias podem contribuir beneficamente para a planta, uma vez que foi demonstrada a capacidade de determinadas linhagens de liberar, *in vitro*, fitormônios, fixar nitrogênio, solubilizar fosfato, etc (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Vários trabalhos mostram que bactérias endofíticas influenciaram positivamente o crescimento de plantas de cana-de-açúcar (GOVINDARAJAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2002; SEVILLA et al., 2001).

Uma maneira de se estudar a interação planta-microrganismo é o estabelecimento, *in vitro*, de associações entre os dois tipos de célula. Quando a pesquisa envolve plantas, tornase relativamente complicada, sendo necessárias condições controladas de luz, temperatura, umidade, ausência de microrganismos contaminantes, etc.

O diferencial do presente trabalho é o uso de células indiferenciadas de cana-de-açúcar na forma de calos. A cultura de células vegetais possui boas vantagens em relação à utilização de plantas: rápida disponibilidade de material estéril e necessidade de pouco espaço em estufa com controle apenas de temperatura (EVANS; COLEMAN; KEARNS, 2003). Martins (2007) verificou que era possível a utilização de calos de cana-de-açúcar para a pesquisa dos efeitos que as células vegetais podem exercer sobre o crescimento bacteriano e, por outro lado, se as bactérias podem interferir no conteúdo protéico de calos em meio isento de nitrogênio combinado. Outro ponto importante foi comparar os dados obtidos em ensaios de co-culturas com aqueles observados em ensaios com plantas. Foi então constatado que a resposta do crescimento de bactérias em co-culturas com calos de cana-de-açúcar coincidia com aquelas das mesmas linhagens em plantas (MARTINS et al., 2013). Esta técnica mostrou que as co-culturas são modelos adequados para se verificar se uma bactéria é aceita ou não pela planta.

A manutenção da integridade das células vegetais é fundamental para que as interpretações dos dados estejam corretas. Vasil et al. (1979) mostraram que culturas de calos de tabaco, *Pennisetum americanum* e *Eremochloa ophiuroides* não sobreviveram quando inoculadas com a bactéria diazotrófica de vida livre *Azospirillum brasilense*. Porém, em outro tipo de interação foi observado que calos de cana-de-açúcar e de cenoura mantiveram-se íntegros e com capacidade de crescimento quando em co-cultura com bactérias endofíticas (MARTINS, 2007; VARGA et al., 1994; VASIL et al., 1979).

No presente trabalho, os calos utilizados foram provenientes da mesma variedade de cana-de-açúcar da qual as bactérias foram isoladas, pois, Baldani et al. (1986) verificaram que as melhores interações entre microrganismo e planta ocorreram quando bactérias foram inoculadas em plantas da mesma linhagem da qual haviam sido isoladas.

A escolha do meio de cultura para o estudo da interação calo de cana-de-açúcar e bactéria também foi importante. O meio de cultura utilizado foi o meio MSM que permitiu o cultivo tanto das células vegetais como das bactérias, para se verificar se havia contribuição com nitrogênio fixado pelas bactérias para as células vegetais. Assim, o meio MSM foi preparado isento de fonte de nitrogênio combinado, permitindo que as bactérias realizassem a fixação biológica de nitrogênio.

A nitrogenase, enzima responsável pela fixação de N₂, é sensível ao oxigênio. Assim, as bactérias aeróbias diazotróficas que não apresentam mecanismos de proteção contra a inativação enzimática, só conseguem realizar a fixação de N₂ em meios semi-sólidos. Neste tipo de meio de cultura as bactérias podem se posicionar em regiões ideais de oxigenação, onde sua taxa de respiração está em equilíbrio com a taxa de difusão de oxigênio no meio, impedindo, assim, a inativação da nitrogenase (POSTGATE, 1998).

5.1 Crescimento Bacteriano

Três diferentes perfis de crescimento bacteriano foram observados nas co-culturas em presença do calo: as três linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481) foram estimuladas; *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 foram parcialmente estimuladas e depois, foram parcialmente inibidas e *Pantoea* sp. ICB409 foi totalmente inibida (Figuras 2 a 7).

Observando-se os resultados das figuras 2 a 4 as populações de *Enterobacter* sp. atingiram valores máximos de UFC, distintos em períodos de tempo diferentes, demonstrando que, apesar de haver estímulo de crescimento para todas, os perfis das curvas não foram iguais provavelmente por serem linhagens diferentes. O estímulo do crescimento observado nas três linhagens de *Enterobacter* sp. em presença do calo de cana-de-açúcar pode estar relacionado com a liberação de substâncias "benéficas" pelas células vegetais. No presente trabalho não foram avaliados os possíveis fatores responsáveis pelo estímulo do desenvolvimento microbiano.

Varga et al. (1994) estudaram uma associação entre calos de cenoura e a bactéria diazotrófica *Azotobacter zettuovii*. O número de bactérias vivas em co-cultura com células

vegetais vivas foi seis vezes maior do que em co-cultura com as células vegetais mortas, ou do que bactérias em cultura pura. Estes dados indicam que as células vegetais vivas estariam liberando ativamente substância(s) que estimularia(m) o crescimento bacteriano. Os autores não apresentaram nenhuma explicação para tais resultados.

O estímulo inicial no crescimento de Klebsiella sp. ICB375 e Pseudomonas sp. ICB383 com calos foi similar ao verificado para as linhagens de *Enterobacter* sp. Porém, após atingirem valores altos de UFC, estas populações tiveram seu crescimento parcialmente inibido. O Quorum Sensing é um mecanismo de comunicação entre bactérias, através da produção e difusão de moléculas sinal (WATERS; BASSLER, 2005). Estas moléculas sinal foram identificadas como N-acil-homoserina-lactona (AHL) em bactérias Gram negativas e regulam a expressão de genes especializados. Esta resposta se dá frente a determinadas densidades populacionais, interferindo em processos fisiológicos como diferenciação celular, bioluminescência, indução de fatores de virulência em patógenos de plantas e animais, biossíntese de antibióticos e formação de biofilmes (BAI; RAI, 2011; SCHAUDER; BASSLER, 2001). A planta ao reconhecer a molécula sinal AHL pode controlar ou exterminar a população bacteriana pela produção de moléculas que mimetizam o AHL (WATERS; BASSLER, 2005). Mathesius et al. (2003) observaram que plantas de *Medicago* truncatula reconheceram concentrações muito pequenas de moléculas AHL. Estas moléculas induziram um acúmulo de 7% de proteínas nas raízes, das quais 25% tinham funções na resposta de defesa da planta. Os dados aqui apresentados sugerem que a planta permite o estabelecimento de uma população máxima de bactérias dependendo da linhagem. Vinagre et al. (2006) mostraram que quanto mais benéfica a associação entre cana-de-açúcar e bactérias endofíticas, maior era o decréscimo na expressão de genes relacionados à defesa.

As inibições observadas nos crescimentos de *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 foram resultado da liberação, pelas células vegetais, de substâncias inibidoras do crescimento. Se a planta não tivesse mecanismos para controlar o crescimento de microrganismos endofíticos ou patogênicos, eles aumentariam muito seu número levando, a planta à morte. Neste trabalho, a inibição parcial do crescimento bacteriano, está relacionada a um controle populacional pelo calo de cana-de-açúcar, conforme será discutido mais adiante. A manutenção da viabilidade de parte da população bacteriana pode ser explicada pelos resultados obtidos nas medidas de proteína dos calos que evidenciaram o potencial benéfico dessas bactérias transferindo nitrogênio combinado (Figuras 17 e 18). A literatura mostra que o gênero *Pseudomonas* também possui diversas espécies fitopatogênicas. A espécie *Pseudomonas syringae* é um patógeno hemibiotrófico que causa uma variedade de doenças

em plantas (ZHENG et al., 2012). O modo de vida desses microrganismos pode ajudar a entender a inibição parcial observada nos experimentos mencionados acima, pois, os resultados aqui apresentados mostraram que a linhagem de *Pseudomonas* utilizada propiciou um incremento protéico significativo dos calos de cana-de-açúcar. A literatura não mostra curvas de crescimento do gênero *Klebsiella*, com calos, e nem medidas de conteúdo protéico de calos em co-cultura, portanto, esses dados de inibição parcial da população bacteriana e de aumento de proteína dos calos são inéditos; interação semelhante foi aqui observada para *Pseudomonas* com calos mostrando também resultados inéditos.

A linhagem ICB409 utilizada neste trabalho foi inicialmente identificada como pertencente ao gênero Erwinia. Um novo sequenciamento do gene 16S rRNA foi feito e ela foi, então, identificada como pertencente ao gênero Pantoea. A eliminação de Pantoea sp. ICB409 quando em co-cultura pode estar relacionada com diferentes estratégias observadas no gênero, para se aproveitar da planta ao invadi-la. Microrganismos necrotróficos (ex. Erwinia, Pantoea) levam à morte das células vegetais (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000). A espécie fitopatogênica Erwinia cypripedii, foi recentemente reclassificada como Pantoea cypripedii (BRADY et al., 2010). Outras espécies de Pantoea também causam doenças em plantas: Pantoea stewartii subsp. stewartii, Pantoea agglomerans, e Pantoea ananatis (BRADY et al., 2008). Diversos sintomas podem ser observados na planta quando está infectada por este gênero: necrose, perda de vigor da planta, apodrecimento de raízes e até de todo o vegetal (BARRAS et al., 1994). No caso do uso de calos não foi possível observar tais efeitos das bactérias sobre eles. Os limites da interação entre planta e bactéria (benéfica ou patogênica) estão sendo atualmente esclarecidos. A eliminação de *Pantoea* pelas células do calo indica que o vegetal respondeu à provável agressão bacteriana, conforme será mostrado mais adiante.

5.2 Atividade Específica da Nitrogenase

Juntamente com o perfil de crescimento das bactérias em co-cultura com os calos analisou-se a atividade da nitrogenase. Muitas vezes os perfis de atividade específica da nitrogenase são de difícil interpretação, pois, os valores são muito variáveis entre as amostras. Na literatura existem poucos artigos que avaliam a influência do calo na atividade da nitrogenase quando cultivado com bactérias.

Conforme observado nas figuras 8 a 13 valores de atividade muito baixos e muito altos foram observados nas co-culturas, em um curto intervalo de tempo. Os resultados obtidos para

os três diferentes isolados de *Enterobacter* sp. mostram capacidades distintas de fixação de nitrogênio. Segundo Madigan; Cox e Stegeman (1984) a capacidade de fixar nitrogênio é virtualmente universal entre os membros de uma mesma família, mas a eficácia deste processo varia consideravelmente entre espécies. Considerando que, neste trabalho, foram estudados isolados de diferentes gêneros, as diferenças nas atividades estão de acordo com o autor acima citado.

No presente estudo, *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pantoea* sp. ICB409 tiveram sua atividade da nitrogenase inibida na presença do calo, dados estes que coincidem com a inibição do crescimento. Apenas na co-cultura com *Pseudomonas* sp. ICB383 houve um longo período de estímulo da atividade da nitrogenase. As linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481) tiveram suas atividades estimuladas, em relação ao controle, apenas no início da co-cultura. Berg et al. (1980), verificaram que em presença de calo de cana-de-açúcar, a atividade da nitrogenase de *Azospirillum brasilense* foi quatro vezes maior do que em sua ausência. No entanto, os autores não explicaram de que forma o calo estimulou a atividade da nitrogenase. DeMoranville et al. (1981) verificaram que a atividade da nitrogenase de *Rhizobium japonicum* foi inibida em presença de células e de extrato de células de soja. Os autores destacaram que macromoléculas produzidas pela planta podiam estimular ou inibir a redução de acetileno, dependendo das condições de cultivo da co-cultura. No entanto, nenhuma das macromoléculas isoladas do extrato de células de soja foi caracterizada. O presente trabalho não se voltou para a identificação de substâncias que atuassem sobre a atividade da nitrogenase.

Sabe-se que a atividade da nitrogenase é inibida pelo oxigênio, porém outras moléculas também podem inativá-la. Segundo Imlay (2003), enzimas que contenham o *cluster* [4Fe-4S], como a nitrogenase, podem ser inativadas irreversivelmente pelas espécies reativas de oxigênio, superóxido e peróxido de hidrogênio. A inibição da atividade da nitrogenase observada em *Pantoea* sp. ICB 409 em co-cultura, nas primeiras horas de cultivo, deve estar relacionada com o aumento significativo do conteúdo de EROs que ocorreu a partir de 40 minutos de interação bactéria/calo.

A forma de apresentação dos dados pela literatura dificulta o alcance de uma conclusão sobre efeitos estimulatórios ou inibitórios das células vegetais sobre a atividade da nitrogenase. Normalmente, os dados mostrados não são expressos como atividade específica (quantidade de produto formada por unidade de tempo e por UFC). Child e Kurz (1978) observaram, em *Rhizobium* e *Azospirillum* em co-cultura com células vegetais, variações na atividade da nitrogenase ao longo do tempo; porém, não foi feita nenhuma relação com o

crescimento bacteriano, não sendo possível saber qual bactéria tinha a nitrogenase mais ativa, pois, era desconhecido o tamanho das populações. Da mesma forma, não foi possível saber se os calos estimularam ou inibiram a atividade da enzima.

A maior atividade específica da nitrogenase em *Enterobacter* sp. ICB117 não refletiu em maior crescimento bacteriano. Uma parte do nitrogênio fixado pela bactéria não estava sendo utilizado para aumentar a população, mas, estava sendo transferido para as células vegetais. A atividade da enzima de *Enterobacter* sp. ICB113 e *Enterobacter* sp. ICB117 foi estimulada pelo calo durante a fase exponencial do crescimento bacteriano, como demonstrado também por Berg et al. (1980) em co-cultura de calo de cana-de-açúcar com *Azospirillum brasilense*. Assim, esta atividade foi efetiva para a população se manter em fase exponencial. Além das EROs, outras substâncias nitrogenadas foram quantificadas neste trabalho, não sendo possível observar relação com o estímulo ou inibição da nitrogenase.

5.3 Conteúdo Protéico dos Calos

O conteúdo protéico das células vegetais pode ser usado como indicador de transferências de nitrogênio combinado liberado pelas bactérias e assimilado pelo calo (MARTINS, 2007). Ensaios anteriores demonstraram aumento significativo no conteúdo protéico de calos de cana-de-açúcar co-cultivados com bactérias endofíticas diazotróficas.

Em todos os experimentos foi possível observar incremento protéico do calo de canade-açúcar, exceto em calos co-cultivados com *Pantoea* sp. ICB409. A nitrogenase desta linhagem permaneceu ativa por apenas 24h. Assim, *Pantoea* sp. ICB409 não contribuiu com nitrogênio fixado para as células vegetais. Estes dados são coerentes com os resultados obtidos para o crescimento.

O incremento protéico (41,4%) de calos em co-cultura com *Enterobacter* sp. ICB117 deve estar relacionado com os maiores valores de atividade da nitrogenase (sendo 3238 fmol.UFC.⁻¹h⁻¹, o maior valor) observados nesta bactéria. No entanto, o maior incremento (50,8%) foi verificado em *Enterobacter* sp. ICB481 onde se observaram valores intermediários e tempo muito menor de atividade enzimática.

Portanto, os dados aqui apresentados mostram que não há uma relação direta entre a atividade da nitrogenase bacteriana e o conteúdo proteico dos calos, podendo haver destinos diferentes para o nitrogênio combinado, disponibilizado pelo microrganismo, conforme será discutido a seguir.

Os conteúdos protéicos dos calos em co-cultura com as outras bactérias (*Enterobacter* sp. ICB113, *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383) aumentaram em menores proporções. Esses valores, mais baixos de conteúdos protéicos, podem ser reflexo dos menores valores de atividade observados. Outra hipótese a ser considerada é o fluxo de nitrogênio fixado ter sido desviado para ser utilizado na síntese de outras moléculas nitrogenadas. Em calos co-cultivados com *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 verificou-se uma maior liberação das substâncias nitrogenadas ON e poliaminas, em relação às linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB117 e ICB481) onde se observaram os maiores incrementos protéicos.

O tempo em que a nitrogenase se manteve ativa também pode estar relacionado com o aumento protéico. Apesar das co-culturas com *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Klebsiella* sp. ICB375 apresentarem picos de atividade da nitrogenase muito semelhantes, o conteúdo protéico de *Pseudomonas* sp. ICB383 foi 9% maior em relação aos de calos em co-cultura com *Klebsiella* sp. ICB375. Isso deve-se, provavelmente, a atividade da nitrogenase ter-se mantido ativa por mais tempo. As nitrogenases de *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Enterobacter* sp. ICB113 estiveram ativas pelo mesmo tempo (760h), porém, os valores dos picos observados em *Pseudomonas* sp. ICB383 foram 2,3 vezes maiores que os de *Enterobacter* sp. ICB113, refletindo em conteúdo protéico 6% maior dos calos com *Pseudomonas* sp. ICB383.

5.4 Espécies Reativas de Oxigênio e Óxido Nítrico

Sabe-se que um microrganismo, ao entrar na planta, desencadeia a produção de diversas substâncias em resposta a esta "invasão". A produção de EROs é a primeira resposta detectada poucos minutos após o contato com o patógeno (ADAM et al., 1989). Esta primeira geração de EROs deve-se a uma reação biologicamente não-específica apresentando uma rápida duração, pois, os valores de EROs caem em poucas horas. Isso indica que, ao entrar em contato com a planta, todo microrganismo é encarado como "organismo estranho" (APEL; HIRT, 2004). Em interações incompatíveis entre planta e patógeno, após algumas horas, ocorre uma segunda produção de EROs, mais intensa e prolongada chamada de "explosão oxidativa". As principais EROs produzidas no local da infecção são o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (APEL; HIRT, 2004). Este fenômeno foi verificado pela primeira vez em plantas de batata infectada com *Phytophtora infestans* (DUKE, 1983).

Neste trabalho observou-se que ocorreu a produção de EROs característica da reação biologicamente não-específica, tanto em relações benéficas para a célula vegetal, como em

relações patogênicas. Os resultados aqui apresentados estão parcialmente de acordo com a literatura, pois, após cerca de 40 minutos tanto de interação bactéria/célula vegetal quanto nas células controle não se observou a queda de EROs. Nas co-culturas com *Pantoea* sp. ICB409 foi observado um aumento significativo de EROs em relação às células controle e mais acentuado que nas com *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp.ICB383. Não se observou a chamada "explosão oxidativa" nos calos controle e em nenhuma das co-culturas testadas neste trabalho, incluindo os resultados obtidos para as três linhagens de *Enterobacter* que foram muito próximos do controle.

Segundo Nanda et al. (2010) a "explosão oxidativa" parece diferir em intensidade entre interações planta-patógeno e interações planta-simbionte. Esta diferença poderia atuar como um sinal específico pré-definindo a resposta do hospedeiro ao microrganismo. A figura 34 mostra a diferença de intensidade na produção de EROs por células co-cultivadas com *Pantoea* sp. ICB409 que apresentaram os maiores valores, seguidas das co-culturas com *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp.ICB383, onde os valores foram intermediários e, finalmente, as co-culturas com as três linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481) onde os valores foram estatisticamente iguais às células controle. Nem sempre as respostas a células não patogênicas mostram um perfil similar ao de *Enterobacter*, pois, a bactéria simbionte *Rhizobium* parece ter uma eficiente defesa antioxidante, pois as EROs não foram detectadas na bainha de infecção quando estes microrganismos entraram na planta (NANDA et al., 2010). Klessig et al. (2000) detectaram que a atividade de algumas enzimas destoxificantes foi suprimida pela ação do óxido nítrico, outra molécula analisada neste trabalho e que pode ter sido responsável pelos menores valores de EROs nas bactérias não patogênicas.

Além da produção de EROs, na chamada "resposta hipersensível", também é produzido óxido nítrico. Esta molécula sinal foi rapidamente acumulada em resposta a patógenos em culturas de células de *Arabidopsis* e de soja (DELLEDONNE et al ., 1998; CLARKE et al ., 2000). Em todos os ensaios realizados neste trabalho foi possível observar a produção de ON pelas células vegetais em contato com as bactérias, demonstrando que essa liberação de ON pelas células vegetais ocorreu não somente nas interações incompatíveis (*Pantoea* sp. ICB409), mas também em interações compatíveis (linhagens de *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383). Diferenças na intensidade da liberação de ON intracelular também foram observadas: com *Pantoea* sp. ICB409 observaram-se os maiores valores, com *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 valores intermediários e com

as três linhagens de *Enterobacter* sp. (ICB113, ICB117 e ICB481) valores estatisticamente iguais às células controle.

Na literatura são citadas diversas técnicas de medida de ON, no entanto, esta quantificação é problemática, e desta maneira poucos dados em relação a medidas e detecção de ON estão disponíveis (NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2003). Neste trabalho duas metodologias foram utilizadas para esta quantificação: uma delas quantificava o ON extracelular por medidas de nitrito, enquanto a outra quantificava ON extra e intracelular utilizando-se de fluoróforos. Ao comparar os dados obtidos pelas duas técnicas observou-se que até 18 horas, o perfil do conteúdo de ON extracelular foi semelhante (Figuras 20 a 25 e 27). Esta é a única comparação possível de ser feita entre as determinações do nitrito e de fluoróforos, uma vez que as medidas desta técnica só podem ser realizadas até 18 horas por limitação do fluorímetro.

Para Clarke et al. (2000) e Delledonne et al. (1998), em resposta a patógenos, a planta sempre gera EROs e ON concomitantemente. Estes autores mostraram a ocorrência de um pico de ON juntamente com um pico de explosão oxidativa frente à inoculação com um microrganismo patogênico em uma cultura de células em suspensão de *Arabidopsis*. O incremento simultâneo destas duas substâncias foi capaz de ativar a resposta hipersensível em cultura de células em suspensão de soja e de tabaco. Apesar de não ter sido observada a "explosão oxidativa" foram detectados altos valores de EROs e de ON liberados concomitantemente pelas células vegetais em co-cultura com *Klebsiella* sp. ICB375, *Pseudomonas* sp.ICB383 e *Pantoea* sp. ICB409 (Figuras 26 e 33). Estes dados mostram que estas substâncias parecem ter um papel importante na resposta das células vegetais ao entrarem em contato com diferentes microrganismos.

5.5 Etileno e Poliaminas

Outra substância medida neste trabalho foi o etileno. Esta substância é freqüentemente sintetizada em nível basal durante interações compatíveis funcionando como fitormônio ou sendo uma molécula sinal responsável pela ativação de resistência sistêmica induzida contra patógenos (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

Nos ensaios realizados observou-se um aumento significativo na liberação de etileno pelos calos em co-cultura com todas as linhagens utilizadas. Assim, pode-se concluir que aqui, a liberação do etileno não foi específica para relações patogênicas ou benéficas.

A produção significativa de etileno por calos em co-cultura com *Klebsiella* sp. ICB375, *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Pantoea* sp. ICB409 sugere que esta molécula pode estar envolvida na redução das populações bacterianas, que decaíram exatamente após a maior liberação de etileno, evidenciando que calos podem demonstrar o papel da célula vegetal na defesa da planta. A quantidade de etileno produzida pelos calos em resposta à presença bacteriana pode ter ocasionado as alterações dos perfis de crescimento bacteriano: calos em contato com *Pantoea* sp. ICB409, onde houve inibição total, liberaram mais etileno do que com *Klebsiella* sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 onde se observou inibição parcial. Iniguez et al. (2005) observaram que a adição da molécula precursora de etileno, ACC (ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano), em plantas de *Medicago sativa*, diminuiu a colonização por *Klebsiella pneumoniae* 342 (Kp342) e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Igualmente, Thomma et al. (1999) verificaram que plantas de *Arabidopsis*, incapazes de perceber o etileno, foram mais suscetíveis à infecção com o fungo *Botrytis cinerea*.

O etileno é um dos fatores envolvidos no estabelecimento da interação endofítico/cana-de-açúcar, pois, a sua sinalização pode ser modulada de maneira diferente de acordo com o microrganismo. A expressão de determinados genes e fatores de transcrição relacionados ao etileno foi distinta em resposta à inoculação com diferentes espécies de bactérias endofíticas diazotróficas e patogênicas. Uma expressão mais acentuada ocorre quando este segundo grupo penetra na planta, podendo se especular que estes genes podem ser modulados de maneira diferente em associações benéficas ou patogênicas (CAVALCANTE et al., 2007).

Em plantas três poliaminas são as mais abundantes e estão envolvidas em diversas respostas a estresses bióticos e abióticos: putrescina, espermidina e espermina (ALCÁZAR et al., 2006; HUSSAIN et al., 2011). Alterações nos níveis de poliaminas foram observadas em plantas infectadas com fungos e vírus (WALTERS, 2000). Da mesma forma, os dados apresentados neste trabalho, mostraram alterações significativas no conteúdo de poliaminas livres totais em calos co-cultivados com *Klebsiella* sp. ICB375, *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Pantoea* sp. ICB409.

Yamakawa et al. (1998) observaram que, após infecção com o vírus do mosaico do tabaco, o acúmulo de espermina em células vegetais induziu a expressão de proteínas relacionadas à patogênese. Torrigiani et al. (1997) observaram um aumento nas concentrações de putrescina e espermidina livres e conjugadas em plantas de tabaco infectadas com o vírus após 3 a 5 dias. Neste trabalho, alterações nos níveis totais de espermina e espermidina foram observadas nos calos co-cultivados com todas as linhagens bacterianas utilizadas. Deste

modo, pode-se concluir que, apesar da literatura citar alterações nos níveis destas poliaminas em interações patogênicas, ela também pode ocorrer em interações benéficas. Nos calos co-cultivados com *Klebsiella* sp. ICB375, *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Pantoea* sp. ICB409 os picos de liberação de espermina e espermidina livres foram detectados em 72 horas de experimento, como no trabalho de Torrigiani et al. (1997). Segundo Yoda et al. (2009) a espermina e seu produto de degradação, o peróxido de hidrogênio, são elementos chave para induzir a resposta hipersensível contra patógenos em plantas. As maiores alterações observadas no conteúdo de EROs também foram encontradas em calos co-cultivados com estas três linhagens onde houve alteração no conteúdo de espermina, reforçando o papel dessas duas substâncias na defesa da planta.

As vias biossintéticas do etileno e das poliaminas possuem um precursor comum, a S-adenosil metionina (SAM). Em calos em contato com *Klebsiella* sp. ICB375, *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Pantoea* sp. ICB409 foram encontradas alterações significativas nos níveis tanto de etileno quanto de poliaminas. Assim, pode-se sugerir que estas duas vias tenham tido um papel fundamental no controle populacional destas linhagens bacterianas.

5.5 Ácido Salicílico

O principal papel fisiológico atribuído ao AS na planta é o de funcionar como uma molécula sinalizadora na resposta de defesa a patógenos biotróficos e hemibiotróficos bem como no estabelecimento da resistência sistêmica adquirida (GRANT; LAMB, 2006). Esta substância é capaz de induzir a expressão de genes ligados a várias proteínas relacionadas à patogênese em plantas (MARTINEZ et al., 2000).

Por ser um hormônio vegetal, o AS é produzido pelas células vegetais para a regulação de diversas funções. Assim, nos calos controle encontrou-se AS tanto na forma livre como conjugado a outras moléculas na célula (Figuras 34 e 35).

Bari, Jonathan e Jones (2009) verificaram que os níveis de AS aumentaram em tecidos de plantas infectados por patógenos. As figuras 34 a 36 mostram aumentos significativos no conteúdo de AS dos calos em co-cultura com *Klebsiella* sp. ICB375, *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Pantoea* sp. ICB409. As relações benéficas (calos co-cultivados com *Enterobacter* sp.) não foram diferentes estatisticamente em relação ao conteúdo de AS do controle. Os maiores níveis de AS foram verificados nos calos em co-cultura com *Pantoea* sp.ICB409. Os calos co-cultivados com esta linhagem apresentaram os maiores valores de todas as substâncias de defesa analisadas, além de não apresentarem incremento protéico.

Duas vias distintas de resposta de defesa sistêmica existem em plantas. Uma, a resistência sistêmica adquirida, usa ácido salicílico como sinal, enquanto a outra, resistência sistêmica induzida, usa etileno como sinal. Dependendo da bactéria, a planta pode ativar as duas vias ao mesmo tempo. Os maiores valores de etileno e ácido salicílico observados em *Klebsiella* sp. ICB375, *Pseudomonas* sp. ICB383 e *Pantoea* sp. ICB409 foram verificados nos mesmos tempos de medida, indicando que estas duas substâncias podem estar ativando as duas vias de defesa para controlar as populações bacterianas.

5.6 Conclusões Finais

Todos os dados obtidos até o momento permitem distinguir que tipos distintos de bactérias endofíticas levam a diferentes interações entre os calos de cana-de-açúcar e os microrganismos. Estas interações podem caracterizar as bactérias como: benéficas, patogênicas e "intermediárias". Quando foram observados: estímulo do crescimento bacteriano pelo calo, atividade de nitrogenase e incremento protéico dos calos, pode-se sugerir que a interação entre os calos e as bactérias (Enterobacter sp. ICB113, ICB117 e ICB481) foi benéfica. Outros dados que reforçam este caráter benéfico são as medidas estatisticamente iguais ao controle do conteúdo de poliaminas, ácido salicílico, EROs e ON. Pantoea sp. ICB409 em co-cultura com calos teve seu crescimento e atividade da nitrogenase inibidos, além de não ocorrer incremento protéico dos calos. Neste caso, a bactéria foi patogênica. A resposta de defesa foi coerente, os níveis encontrados foram sempre os maiores. Um tipo de microrganismo "intermediário" foi observado pelo: crescimento de Klebsiella sp. ICB375 e *Pseudomonas* sp. ICB383 inicialmente estimulado e depois parcialmente inibido, presença de atividade da nitrogenase que refletiu no incremento protéico dos calos e nas maiores concentrações de substâncias de defesa nitrogenadas (poliaminas e ON). Aqui, níveis intermediários das medidas de etileno e ácido salicílico foram observados.

Portanto, pode-se concluir que o modelo calo de cana-de-açúcar/bactéria endofítica diazotrófica foi capaz de evidenciar diferentes interações entre vegetal e bactéria, assim como, diferentes níveis de resposta de defesa da célula vegetal.

6 CONCLUSÕES

- Os calos evidenciou a capacidade de células vegetais interagirem com bactérias de diferentes maneiras: estímulo, inibição parcial e inibição total do crescimento bacteriano.
- O calo pode atuar sobre a atividade da nitrogenase bacteriana estimulando-a ou inibindo-a.
- A contribuição bacteriana pode ser evidenciada pelo aumento significativo do conteúdo protéico de calos em co-cultura em relação aos calos controle.
- As respostas de defesa dos calos foram observadas em diferentes níveis e refletiram de modo similar aos efeitos verificados no crescimento de cada linhagem.
- O modelo calo de cana-de-açúcar/bactéria endofítica diazotrófica foi capaz de evidenciar diferentes interações entre vegetal e bactéria, assim como, diferentes níveis de resposta de defesa da célula vegetal.

REFERÊNCIAS*

- ADAM, A.; FARKAS, T.; SOMLAYAI, G.; HEVESI, M.; KIRALY, Z. Consequence of O2–generation during bacterially induced hypersensitive reaction in tobacco: deterioration of membrane lipids. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 34, p. 13–26, 1989.
- ALCÁZAR, R.; MARCO, F.; CUEVAS, J. C.; PATRON, M.; FERRANDO, A.; ARRASCO, P.; TIBURCIO, A. F.; ALTABELLA, T. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. **Biotechnol. Lett.**, v. 28, p. 1867–1876, 2006.
- ANDERSON, M. D.; RUESS, R. W.; ULIASS, D. D.; MITCHELL, J. S. Estimating N_2 fixation in two species of Alnus in interior Alaska using acetylene reduction an $^{15}N_2$ uptake. **Écoscience**, v. 11, p. 102-114, 2004.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373–399, 2004.
- ARENCIBIA, A. D.; ESTEVEZ, Y.; VINAGRE, F.; BERNAL, A.; PEREZ, J.; CARMONA, E.; HEMERLY, A. S.; SANTANA, I. Induced-resistance in sugarcane against pathogenic bacteria *Xanthomonas albilineans* mediated by an endophytic interaction. **Sugar Tech.**, v. 8, p. 272-280, 2006.
- BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial quorum sensing and food industry. **Compr. Rev. Food Sci.**, v. 10, p. 183-193, 2011.
- BALACHANDAR, D.; SANDHIYA, G. S.; SUGITHA, T. C. K.; KUMAR, K. Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 707-712, 2006.
- BALDANI, V. L. D.; ALVAREZ, M. A.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of fieldgrown wheat and sorghum. **Plant Soil**, v. 90, p. 35-46, 1986.
- BARBOSA, H. R.; RODRIGUES, M. F. A.; CAMPOS, C. C.; CHAVES, M. E.; NUNES, I.; JULIANO, Y.; NOVO, N. F. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: a comparison between the drop and the spread methods. **J. Microbiol. Methods**, v. 22, p. 39-50, 1995.
- BARI, R.; JONATHAN, E.; JONES, J. D. G. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Mol. Biol.**, v. 69, p. 473–488, 2009.
- BARON, K.; STASOLLA, C. The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development. **Vitro Cell. Dev. Biol. Plant,** v. 44, p. 384-395, 2008.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BARRAS, F. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 32, p. 201-234, 1994.
- BENT, E.; TUZUN, S.; CHANWAY, C. P.; ENEBACK, S. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. **Can. J. Microbiol.,** v. 47, p. 793–800, 2001.
- BERG, R. H.; VASIL, V.; VASIL, I. K. The biology of *Azospirillum*-sugarcane association. II. Ultrastructure. **Protoplasma**, v. 101, p. 143-163, 1979.
- BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. **Plant Soil**, v. 108, p. 53-65, 1988.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant Soil**, v. 252, p. 139-149, 2003.
- BOLWELL, P. P.; PAGE, A.; PIGLEWSKA, M.; WOJTASZEK, P. Pathogenic infection and the oxidative defences in plant apoplast. **Protoplasma**, v. 217, p. 20-32, 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRADY, C. L.; CLEENWERCK, I.; VENTER,S. N.; ENGELBEEN,K.; DE VOS, P.; COUTINHO, T. A. Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium cypripedii* (Hori 1911) Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 to the genus as *Pantoea cypripedii* comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 60, p. 2430–2440, 2010.
- BRADY, C.; CLEENWERCK, I.; VENTER, S.; VANCANNEY, M.; SWINGS, J.; COUTINHO, T. Phylogeny and identification of *Pantoea* species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). **Syst. Appl. Microbiol.**, v. 31, p. 447-460, 2008.
- CAVALCANTE, J. J. V.; VARGAS, C.; NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; SCHWARCZ, K.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. **J. Exp. Bot.**, v. 58, p. 673-686, 2007.
- CHILD, J. J.; KURZ, W. G. W. Induction effect of plant cells on nitrogenase activity by *Spirillum* and *Rhizobium* in vitro. **Can. J. Microbiol.**, v. 24, p. 143-148, 1978.
- CLARKE, A.; DESIKAN, R.; HURST, R. D.; HANCOCK, J. T.; NEILL, S. J. NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. **Plant J**, v. 24, p. 667–677, 2000.
- COCKING, E. C. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. **Plant Soil**, v. 252, p. 169-175, 2003.

- CONN, V. M.; WALKER, A. R.; FRANCO, C. M. M. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 21, p. 208-218, 2008.
- DEMORANVILLE, C. J.; KAMINSKI, A. R.; BARNETT, N. M.; BOTTINO, P. J.; BLEWIS, D. G. Substances from cultured soybeans cells which stimulate or inhibit acetylene reduction by free-living *Rhiziobium japonicum*. **Physiol. Plant.**, v. 52, p. 53-58, 1981.
- DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R. A.; LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v. 394, p. 585–588, 1998.
- DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant Growth-promoting effects os diazotrophs in the rizosphere. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 22, p. 107-149, 2003.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa, 1995. 60 p.
- DUKE, N. Involvement of superoxide anion generation in hypersensitive response of potato tube tissues to infection with an incompatible rac of *Phytophtora infestans*. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 23, p.345-347, 1983.
- DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 42, p. 185-209, 2004.
- EDREVA, A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. **Gen. Appl. Plant Physiology**, v. 31, p. 105-124, 2005.
- EVANS, D. E.; COLEMAN, J. O. D.; KEARNS, A. Callus cultures. In: _____. Plant cell culture. London: Bios Scientific Publishers, 2003.
- FERRARINI, A.; DE STEFANO, M.; BAUDOUIN, E.; PUCCIARIELLO, C.; POLVERARI, A.; PUPPO, A.; DELLEDONNE, M. Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 21, p. 781–790, 2008.
- FLORES, T.; TODD, C. D.; TOVAR-MENDEZ, A.; DHANOA, P. K.; CORREA-ARAGUNDE, N.; HOYOS, M. E.; BROWNFIELD, D. M.; MULLEN, R. T.; LAMATTINA, L.; POLACCO, J. C. Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. **Plant Physiol.**, v. 147, p. 1936–1946, 2008.
- FOISSNER, I.; WENDEHENNE, D.; LANGEBARTELS, C.; DURNER, J. In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. **Plant J.**, v. 23, p. 817-824, 2000.
- GAYOSO, C.; POMAR, F.; MERINO, F.; BERNAL, M. A. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. annuum infected by *Phytophthora capsici* Leon. **Sci. Hort.,** v. 102, p. 1-13, 2004.
- GOVINDARAJAN, M.; BALANDREAU, J.; MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant Soil**, v. 280, p. 239-252, 2006.

- GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. Curr. Opin. Plant Biol., v. 9, p. 414–420, 2006.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J. D. G. Response to plant pathogens. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry & molecular biology of plants**. Maryland: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1102-1156.
- HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends Microbiol.**, v. 16, p. 463-471, 2008.
- HARISH, S.; KAVINO, M.; KUMAR, N.; SARAVANAKUMAR, D.; SOORIANATHASUNDARAM, K.; SAMIYAPPAN, R. Biohardening with plant growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistance against *banana bunchy top virus*. **Appl. Soil Ecol.**, v. 39, p. 187-200, 2008.
- HAUSE, B.; MAIER, W.; MIERSCH, O.; KRAMELL, R.; STRACK, D. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. **Plant Physiol.**, v. 130, p. 1213-1220, 2002.
- HOLSTEN, R. D.; BURNS, C. R.; HARDY, W. F.; HEBERT, R. R. Establishment of symbiosis between *Rhizobium* and plant cells in vitro. **Nature**, v. 232, p. 173-177, 1971.
- HONG, J. K.; YUN, B. W.; KANG, J. G.; RAJA, M. U.; KWON, E.; SORHAGEN, K.; CHU, C.; WANG, Y.; LOAKE, G. J. Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. **J. Exp. Bot.**, v. 59, p. 147–154, 2008.
- HUCKELHOVEN, R.; FODOR, J.; PREIS, C.; KOGEL, K. H. Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. **Plant Physiol.**, v. 119, p. 1251–1260, 1999.
- HUREK, T.; HANDLEY, L. L.; REINHOLD-HUREK, B.; PICHE, Y. *Azoarcus* grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 15, p. 233-242, 2002.
- HUSSAIN, S.S.; ALI, M.; AHMAD, M.; SIDDIQUE, K.H.M. Polyamine: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Biotechnol. Adv.**, v. 29, p. 300–311, 2011.
- INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; CARTER H. D.; AHMER, B. M. M.; STONE, J. M.; TRIPLETT, E. W. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 18, p. 169-178, 2005.
- IVANOV, S.; FEDOROVA, E. E.; LIMPENS, E. L.; MITA, S.; GENRE, A.; BONFANTE, P.; BISSELING, T. Rhizobium–legume symbiosis shares an exocytotic pathway required for arbuscule formation. **PNAS**, v. 109, p. 8316-8321, 2012.

- JAYANI, R. S.; SAXENA, S.; GUPTA, R. Microbial pectinolytic enzymes: a review. **Process Biochem.**, v. 40, p. 2931-2944, 2005.
- KENNEDY, I. R.; ISLAM, N. The current and potential contribution of a symbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. **Aust. J. Exp. Agr.**, v. 41, p. 447-457, 2001.
- KLESSIG, D. F.; DURNER, J.; NOAD, R.; NAVARRE, D. A.; WENDEHENNE, D. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **PNAS**, v. 97, p. 8849–8855, 2000.
- KOMBRINK, E.; HAHLBROCK, K. Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. Timing and dose dependency of elicitor-induced reaction. **Plant Physiol.**, v. 81, p. 216-221, 1986.
- KUZNETSOV, V. V.; RADYUNKA, N. L.; SHEVYAKOVA, N. I. Polyamines and stress: biological role, metabolism and regulation. **Russ. J. Plant. Physiol.**, v. 53, p. 583-604, 2006.
- LAMATTINA, L.; GARCÍA-MATA, C.; GRAZIANO, M.; PAGNUSSAT, G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. **Annu. Ver. Plant. Biol.**, v. 54, p. 109–136, 2003.
- LERY, L. M. S.; HEMERLY, A. S.; NOGUEIRA, E. M.; VON KRÜGER, W. M. A.; BISCHL, P. M. Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v. 24, p. 562-576, 2011.
- LIBA, C. M.; FERRARA., F. I. S.; MANFIO, G. P.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; ALBUQUERQUE, R. C.; PAVAN, C.; RAMOS, P. L.; MOREIRA-FILHO, C. A.; BARBOSA, H. R. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobaceria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. **J. Appl. Microbiol.**, v. 101, p. 1076-1086, 2006.
- LODWIG, E.; POOLE, P. Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 22, p. 37-78, 2003.
- LÓPEZ, M. A.; BANNENBERG, G.; CASTRESANA, C. Controlling hormone signaling is a plant and pathogen challenge for growth and survival. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 11, p. 420-427, 2008.
- LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p. 506-577, 2002.
- MADIGAN, M.; COX, S.S.; STEGEMAN, R.A. Nitrogen-fixation and nitrogenase activities in members of the family Rhodospirilaceae. **J. Bacteriol.**, v. 157, p. 73-78, 1984.
- MANDAL, S. M.; CHAKRABORTY, D.; DEY, S. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. **Plant Signal. Behav.**, v. 5, p. 359-368, 2010.

- MARTINEZ, C.; BACCOU, J. C.; BRESSON, E.; BAISSAC, Y.; DANIEL, J. F.; JALLOUL, A.; MONTILLET, J. L.; GEIGER, J. P.; ASSIGBETSÉ, K.; NICOLE, M. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacerum*. **Plant Physiol.**, v. 122, p. 757-766, 2000.
- MARTINS, R. C. R. Associações *in vitro* de bactérias endofíticas diazotróficas com células de calo de cana-de-açúcar. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- MATHESIUS, U.; MULDERS, S.; GAO, M.; TEPLITSKI, M.; CAETANO-ANOLLES, G.; ROLFE, B.G.; BAUER, W. D. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum sensing signals. **PNAS**, v. 100, p. 1444-1449, 2003.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, v. 15, p. 473-497, 1962.
- MYSORE, K. S.; RYU, C. M. Nonhost resistance: how much do we know? **Trends Plant Sci.**, v. 9, p. 97-104, 2004.
- NANDA, A. K.; ANDRIO, E.; MARINO, D.; PAULY, N.; DUNAND, C. Reactive Oxygen Species during Plant-microorganism Early Interactions. **J. Integr. Plant Biol.**, v. 52, p. 195–204, 2010.
- NEILL, S.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J. WILSON, I. Nitric oxide evolution and perception. **J. Exp. Bot.**, v. 59, p. 25-35, 2008.
- NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T. Nitric oxide signalling in plants. **New Phytol.**, v. 159, p. 11-35, 2003.
- OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant Soil**, v. 242, p. 205-215, 2002.
- PENCE, V. C.; NOVICK, N. J.; OZIAS-AKINS, P.; VASIL, I. K. Induction of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* by conditioned medium from cell suspension cultures of *Pennisetum americanum* (Pearl millet) and *Panicum Maximum* (Guinea grass). **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 106, p. 139-147, 1982.
- POSTGATE, J. Nitrogen fixation. 3rd ed. Cambridge: University Press, 1998. 112 p.
- PREININGER, E.; ZATYKÓ, J.; SZŰCS, P.; KORÁNYL, P.; GYURJÁN, I. *In vitro* establishment of nitrogen-fixing strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) via artificial symbiosis with *Azomonas insignis*. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.**, v. 33, p. 190-194, 1997.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Life in grasses: diazotrophic endophytes. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 139-144, 1998.

- REYES, I.; BERNIER, L.; ANTOUN, H. Rock phosphate solubilization and colonization of maize rhizosphere by wild and genetically modified strains of *Penicillium rugulosum*. **Microb. Ecol.,** v. 44, p. 39–48, 2002.
- RIVAS, R. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 5217–5222, 2002.
- ROCHA, F. R.; PAPINI-TERZI, F. S.; NISHIYAMA J R; VÊNCIO, M. Y.; VICENTINI, R.; DUARTE, R. D. C.; ROSA J. R; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A. H.; RODRIGUES, F. A.; ULIAN, E. C.; ZINGARETTI, S. M.; GALBIATTI, J. A.; ALMEIDA, R. S.; FIGUEIRAS, A. V. O.; HEMERLY, A. S.; SILVA-FILHO, M. C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, v. 8, p. 71, 2007.
- ROMERO, D.; DE VICENTE, A.; RAKOTOALY, R. H.; DUFOUR, S. E.; VEENING, J. W.; ARREBOLA, E.; CAZORLA, F. M.; KUIPERS, O. P.; PAQUOT, M.; PEREZ-GARCIA, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 20, p. 430-440, 2007.
- ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 19, p. 827-837, 2006.
- ROULIN, S.; BUCHALA, A. J. The induction of β -1,3-glucanase and other enzymes in groundnut leaves infected with *Cercospora arachidicola*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 46, p. 471-489, 1995.
- SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes & Development**, v. 15, n. 12, p. 1468-1480, jun. 2001.
- SEVILLA, M.; BURRIS, R. H.; GUNAPALA, N.; KENNEDY, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and $^{15}N_2$ incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif- mutant strains. **Mol. Plant-Microbe Interact.**, v. 14, p. 358-366, 2001.
- SIKORSKI, M. M.; BIESIADKA, J.; KASPERSKA, A. E.; KOPCINSKA, J.; LOTOCKA, B.; GOLINOWSKI, W.; LEGOCKI, A. B. Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules. **Plant Sci.**, v. 149, p. 125-137, 1999.
- SILVEIRA, V.; BALBUENA, T. S.; SANTA-CATARINA, C.; FLOH, E. I. S.; GUERRA, M. P.; HANDRO, W. Biochemical changes during development in *Pinus taeda* L. **Plant Growth Regul.**, v. 44, p. 147-156, 2004.
- SPRENT, J. I.; DE FARIA, S. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen-fixing organisms. **Plant Soil**, v. 110, p. 157-165, 1988.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, p. 491-502, 2003.

- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 257-268, 2004.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. Plant Physiology. 4rd ed. China: Sinauer, 2006. 782 p.
- THOMMA, B. P. H. J.; EGGERMONT, K.; TIERENS, K. F. M. J.; BROEKAER, W. F. Requirement of Functional Ethylene-Insensitive 2 Gene for Efficient Resistance of *Arabidopsis* to Infection by *Botrytis cinerea*. **Plant Physiol.**, v. 121, p. 1093-1101, 1999.
- THULER, D. S.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; BARBOSA, H. R. Plant growth regulators and a mino acids released by Azospirillum sp. In chemically defined media. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 37, p. 147-178, 2003.
- TORRIGIANI, P.; RABITI, A. L.; BORTOLOTTI, G.; BETTI, L.; MARANI, F.; CANOVA, A.; BAGNI, N. Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. **New Phytol.**, v. 135, p. 467–473, 1997.
- TREUTTER, D. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. **Environ. Chem. Lett.**, v. 4, p. 147-157, 2006.
- TUTEJA, N.; CHANDRA, M.; TUTEJA, R.; MISRA, M. K. Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology. **J. Biomed. Biotech.**, v. 4, p. 227–237, 2004.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (ÚNICA). Disponível em http://www.unica.com.br. Acesso em: 03 out. 2012.
- VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **Eur. J. Plant Pathol.**, v. 119, p. 243-254, 2007.
- VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 36, p. 453-483, 1998.
- VAN LOON, L. C.; PIERPOINT, W. S.; BOLLER, T. H.; CONEJERO, V. Recomendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Mol. Biol. Rep.**, v. 12, p. 245-264, 1994.
- VARGA, S. S.; KORÁNYI, P.; PREININGER, É.; GYURJÁN, I. Artificial associations between *Daucus* and nitrogen-fixing *Azotobacter* cells in vitro. **Physiol. Plant.**, v. 90, p. 786-790, 1994.
- VARGAS, C.; PADUA, V. L. M.; NOGUEIRA, E. M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H. P.; SILVA, F. R.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic bacteria: A genomic approach. **Symbiosis**, v. 35, p. 159-180, 2003.
- VASIL, V.; VASIL, I. K.; ZUBERER, D. A.; HUBBELL, D. H. The biology of *Azospirillum*-sugarcane association. I. Establishment of the association. **Z. Pflanzenphysiol.**, v. 95, p. 141-147, 1979.

- VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K.; CAVALCANTE, J.; NOGUEIRA, E. M.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Shr5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N2-fixing endophytic bacteria association. **J. Exp. Bot.**, v. 57, p. 559-569, 2006.
- WALTERS, D. R. Polyamines in plant-microbe interactions. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v. 57, p. 137–146, 2000.
- WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 21, p. 319–346, 2005.
- WEBSTER, G.; JAIN, V.; DAVEY, M.R.; GOUGH, C.; VASSE, J.; DENARIÉ, J.; COCKING, E. C. The flavonoid naringenin stimulates the intercellular colonization of wheat roots by *Azorhizobium caulinodans*. **Plant Cell Environ.**, v. 21, p. 373-383, 1998.
- WHITE, R. F. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. **Virology**, v. 99, p. 410-412, 1979.
- YAMAKAWA, H.; KAMADA, H.; SATOH, M.; OHASHI, Y. Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiol.**, v. 118, p. 1213–1222, 1998.
- YODA, H.; FUJIMURA, K.; TAKAHASHI, H.; MUNEMURA, I.; UCHIMIYA, H.; SANO, H. Polyamines as a common source of hydrogen peroxide in host- and nonhost hypersensitive response during pathogen infection. **Plant Mol. Biol.**, v. 70, p. 103–112, 2009.
- ZHENG, X. Y.; SPIVEY, N. W.; ZENG, W.; LIU, P. P.; FU, Z. Q.; KLESSIG, D. F.; HE, S. Y.; DONG. X. Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. **Cell Host Microbe**, v. 11, p. 587-596, 2012.

APÊNDICE - Tabelas suplementares

Tabela 1 – Valores de UFC de *Enterobacter* sp. ICB113 em cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar.

Tempo (h)	UFC Controle	UFC Co-cultura
Tempo (n)	(UFC.mL ⁻¹)	(UFC.mL ⁻¹)
0	3,22E+04±0,07	$3,22E+04\pm0,07$
6	$8,30E+05\pm0,04$	$9,78E+05\pm0,06$
24	$3,96E+07\pm0,05$	$3,14E+08\pm0,06$
48	$3,93E+07\pm0,05$	$2,33E+08\pm0,34$
72	$3,75E+07\pm0,04$	$2,11E+08\pm0,02$
168	$3,25E+07\pm0,05$	$2,07E+08\pm0,09$
216	$2,98E+07\pm0,06$	$8,70E+07\pm0,23$
336	$2,75E+07\pm0,07$	$8,18E+07\pm0,05$
384	$9,87E+06\pm0,21$	$6,27E+07\pm0,43$
432	$9,50E+06\pm0,03$	$3,84E+07\pm0,04$
552	$8,80E+06\pm0,02$	$4,17E+07\pm0,05$
760	$6,77E+06\pm0,07$	$3,39E+07\pm0,09$
928	$5,77E+06\pm0,10$	$3,27E+07\pm0,09$
1096	$3,15E+06\pm0,04$	$2,97E+07\pm0,08$
1200	$3,80E+05\pm0,04$	$2,42E+07\pm0,07$

Tabela 2 – Valores de UFC de *Enterobacter* sp. ICB117 em cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar.

		··
Tempo (h)	UFC Controle	UFC Co-cultura
	(UFC.mL ⁻¹)	$(UFC.mL^{-1})$
0	1,47E+04±0,17	1,47E+04±0,17
4	$4,64E+04\pm0,09$	$3,37E+04\pm0,06$
8	$2,15E+05\pm0,08$	$1,53E+05\pm0,15$
24	$1,46E+06\pm0,10$	$1,41E+06\pm0,13$
30	$2,87E+06\pm0,16$	$5,90E+05\pm0,15$
48	$1,71E+07\pm0,17$	$4,11E+07\pm0,14$
72	$2,35E+07\pm0,11$	$4,06E+07\pm0,09$
96	$2,23E+07\pm0,12$	$4,38E+07\pm0,09$
168	$2,68E+07\pm0,09$	$6,68E+07\pm0,15$
240	$1,82E+07\pm0,11$	$4,13E+07\pm0,09$
288	$1,37E+07\pm0,24$	$3,14E+07\pm0,23$
360	$1,02E+07\pm0,19$	$1,83E+07\pm0,19$
408	$5,68E+06\pm0,19$	$5,79E+07\pm0,10$
456	$6,57E+06\pm0,20$	$6,79E+07\pm0,13$
576	$1,52E+06\pm0,20$	$3,26E+07\pm0,37$
696	$1,17E+06\pm0,13$	$5,62E+07\pm0,20$
792	$2,21E+05\pm0,18$	$1,24E+06\pm0,18$
1032	$8,07E+04\pm0,19$	$1,89E+06\pm0,31$
1200	$6,13E+04\pm0,14$	$2,15E+06\pm0,12$

Tabela 3 – Valores de UFC de *Enterobacter* sp. ICB481 em cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar.

TF (1)	UFC Controle	UFC Co-cultura
Tempo (h)	$(UFC.mL^{-1})$	(UFC.mL ⁻¹)
0	8,40E+04±0,11	8,40E+04±0,11
3	8,13E+04±0,06	$2,73E+05\pm0,11$
24	$3,09E+06\pm0,07$	$3,37E+07\pm0,05$
48	$1,21E+07\pm0,16$	$3,66E+07\pm0,13$
72	8,33E+06±0,11	$1,80E+08\pm0,09$
96	$1,34E+07\pm0,03$	$2,86E+08\pm0,12$
144	$1,46E+07\pm0,03$	$6,35E+07\pm0,17$
192	$2,32E+06\pm0,04$	$1,44E+07\pm0,05$
240	$2,09E+06\pm0,03$	$1,29E+07\pm0,06$
312	$7,33E+05\pm0,06$	$1,13E+06\pm0,04$
360	$5,70E+05\pm0,09$	$1,53E+06\pm0,05$
408	$5,63E+05\pm0,10$	$1,39E+06\pm0,06$
528	$5,53E+05\pm0,11$	$1,42E+06\pm0,03$
696	$5,10E+05\pm0,10$	$1,33E+06\pm0,03$
864	$5,43E+05\pm0,10$	$1,17E+06\pm0,08$
1008	$5,37E+05\pm0,08$	$1,21E+06\pm0,09$
1176	5,17E+05±0,09	9,80E+05±0,04

Tabela 4 – Valores de UFC de *Klebsiella* sp. ICB375 em cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar.

Tempo (h)	UFC Controle	UFC Co-cultura
Tempo (n)	(UFC.mL ⁻¹)	(UFC.mL ⁻¹)
0	3,57E+06±0,08	3,57E+06±0,09
3	8,99E+06±0,03	$8,46E+06\pm0,03$
24	$2,10E+07\pm0,27$	$1,66E+08\pm0,02$
48	$2,01E+07\pm0,07$	$4,45E+08\pm0,08$
72	$2,59E+07\pm0,14$	$4,04E+08\pm0,09$
96	$2,13E+07\pm0,10$	$1,99E+08\pm0,04$
144	$2,68E+07\pm0,04$	$2,04E+08\pm0,01$
192	$3,08E+07\pm0,05$	$1,32E+07\pm0,03$
240	$1,46E+07\pm0,06$	$1,18E+07\pm0,21$
312	$1,40E+07\pm0,03$	9,97E+06±0,06
360	$1,69E+07\pm0,12$	$1,53E+06\pm0,07$
408	$4,98E+06\pm0,02$	$1,78E+05\pm0,06$
528	4,97E+06±0,14	$7,84E+05\pm0,25$
696	$4,24E+06\pm0,25$	$6,11E+05\pm0,11$
864	$3,52E+06\pm0,05$	$3,41E+05\pm0,04$
1008	$1,08E+07\pm0,05$	$3,15E+05\pm0,06$
1176	1,00E+06±0,06	9,00E+02±0,05

Tabela 5 – Valores de UFC de *Pseudomonas* sp. ICB383 em cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar.

Tempo (h)	UFC Controle	UFC Co-cultura
	(UFC.mL ⁻¹)	(UFC.mL ⁻¹)
0	1,24E+04±0,14	1,24E+04±0,14
4	$1,10E+04\pm0,24$	$1,12E+04\pm0,16$
8	$1,37E+04\pm0,18$	$3,97E+04\pm0,10$
24	$8,75E+06\pm0,22$	$3,32E+07\pm0,13$
30	$1,94E+07\pm0,18$	$3,34E+07\pm0,12$
48	$1,56E+07\pm0,18$	$2,85E+07\pm0,15$
72	$1,36E+07\pm0,26$	$2,28E+07\pm0,22$
96	$1,67E+07\pm0,28$	$1,74E+07\pm0,08$
168	$1,05E+06\pm0,19$	$2,36E+06\pm0,11$
216	$3,11E+06\pm0,28$	$9,23E+05\pm0,21$
264	1,91E+06±0,19	$1,95E+05\pm0,23$
312	$1,98E+06\pm0,20$	$2,00E+05\pm0,09$
360	$1,85E+06\pm0,20$	$2,00E+05\pm0,13$
408	$1,74E+06\pm0,26$	$1,72E+05\pm0,26$
480	$1,83E+06\pm0,24$	$1,65E+05\pm0,29$
648	$1,48E+06\pm0,23$	$1,76E+05\pm0,26$
864	$1,21E+06\pm0,27$	$1,46E+05\pm0,23$
1176	$1,25E+06\pm0,21$	1,21E+05±0,20

Tabela 6 – Valores de UFC de *Pantoea* sp. ICB409 em cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar.

Tempo (h)	UFC Controle	UFC Co-cultura
	$(UFC.mL^{-1})$	$(UFC.mL^{-1})$
0	1,59E+04±1,20	1,59E+04±1,20
4	$7,97E+04\pm1,01$	$1,92E+04\pm0,16$
8	$5,08E+05\pm1,17$	$4,25E+05\pm0,11$
24	$1,17E+07\pm0,21$	$1,17E+05\pm0,25$
30	$1,58E+07\pm0,15$	$1,34E+07\pm0,12$
48	$1,77E+07\pm0,09$	$2,21E+07\pm0,06$
72	$1,72E+07\pm0,17$	$1,62E+07\pm0,17$
96	$1,86E+07\pm1,49$	$1,74E+06\pm1,29$
216	$1,18E+07\pm0,18$	$1,02E+05\pm0,15$
264	$9,53E+06\pm0,14$	$5,05E+04\pm0,77$
336	$6,45E+06\pm0,14$	$1,66E+05\pm0,09$
384	$1,46E+06\pm0,11$	$4,95E+04\pm0,11$
432	$1,41E+05\pm0,10$	$3,67E+02\pm0,07$
504	$1,02E+06\pm0,18$	$7,77E+02\pm0,21$
624	$3,08E+05\pm0,10$	$4,87E+02\pm0,37$
792	$5,14E+03\pm0,78$	$3,50E+02\pm0,50$
960	$1,21E+04\pm0,18$	$1,23E+01\pm0,77$
1176	$7,68E+03\pm0,23$	$0,00E+00\pm0,00$

Tabela 7 – Valores de atividade específica da nitrogenase de *Enterobacter* sp. ICB113 em cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar.

Tempo (h)	Atividade Controle (fmol.UFC ⁻¹ .h ⁻¹)	Atividade Co-cultura (fmol.UFC ⁻¹ .h ⁻¹
0	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
6	0.88 ± 0.19	$1,16\pm0,28$
24	$1,21\pm0,26$	$2,77\pm0,24$
48	$3,55\pm0,11$	$0,47\pm0,17$
72	$0,32\pm0,12$	$0,29\pm0,13$
168	$0,43\pm0,16$	$0,33\pm0,17$
216	$0,17\pm0,10$	$0,06\pm0,09$
336	$0,16\pm0,11$	$0,30\pm0,19$
384	$0,05\pm0,13$	$0,04\pm0,05$
432	$0,09\pm0,11$	0.06 ± 0.07
552	$0,00\pm0,00$	$0,18\pm0,09$
760	$0,00\pm0,00$	$0,04\pm0,05$
928	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
1096	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
1200	$0,\!00\pm0,\!00$	$0,00\pm0,00$

Tabela 8 – Valores de atividade específica da nitrogenase de *Enterobacter* sp. ICB117 em cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar.

Tempo (h)	Atividade Controle (fmol.UFC ⁻¹ .h ⁻¹)	Atividade Co-cultura (fmol.UFC ⁻¹ .h ⁻¹
0	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
4	$161,23\pm52,50$	$3238,68\pm75,20$
8	$87,16\pm17,40$	598,33±87,40
24	$72,73\pm13,26$	494,13±84,80
30	$89,70\pm10,25$	474,81±35,60
48	$10,34\pm2,65$	$17,58\pm17,40$
72	$4,64\pm0,15$	$23,79\pm4,20$
96	$2,28\pm0,45$	$94,89\pm22,30$
168	$0,51\pm0,12$	$10,77\pm3,70$
240	$0,00\pm0,00$	$22,54\pm4,80$
288	$0,69\pm0,21$	$81,24\pm9,50$
360	$0,00\pm0,00$	$22,72\pm3,60$
408	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
456	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
576	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
696	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
792	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
1032	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
1200	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$

Tabela 9 – Valores de atividade específica da nitrogenase de *Enterobacter* sp. ICB481 em cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar.

Tempo (h)	Atividade Controle (fmol.UFC ⁻¹ .h ⁻¹)	Atividade Co-cultura (fmol.UFC ⁻¹ .h ⁻¹
0	0,00±0,00	$0,00\pm0,00$
3	$124,92\pm31,75$	151,35±23,50
24	$18,26\pm8,97$	$0,59\pm0,56$
48	$1,70\pm0,55$	$0,09\pm0,08$
72	$2,11\pm0,98$	$0,10\pm0,12$
96	$1,43\pm0,37$	0.08 ± 0.07
144	$1,53\pm0,69$	$0,20\pm0,05$
192	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
240	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
312	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
360	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
408	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
528	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
696	$0,\!00\pm0,\!00$	$0,\!00\pm0,\!00$
864	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
1008	$0,\!00\pm0,\!00$	$0,\!00\pm0,\!00$
1176	$0,\!00\pm0,\!00$	$0,\!00\pm0,\!00$

Tabela 10 – Valores de atividade específica da nitrogenase de *Klebsiella* sp. ICB375 em cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar.

Tempo (h)	Atividade Controle (fmol.UFC ⁻¹ .h ⁻¹)	Atividade Co-cultura (fmol.UFC ⁻¹ .h ⁻¹
0	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
3	$5,63\pm0,64$	$6,57\pm1,22$
24	$4,63\pm0,18$	$0,88\pm0,12$
48	$5,18\pm0,44$	$0,32\pm0,17$
72	$8,90\pm0,87$	$0,08\pm0,06$
96	$0,95\pm0,15$	$0,14\pm0,10$
144	$0,55\pm0,21$	$0,07\pm0,05$
192	$0,44\pm0,28$	$0,92\pm0,48$
240	$0,88\pm0,25$	$0,97\pm0,37$
312	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
360	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
408	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
528	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
696	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
864	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
1008	$0,\!00\pm0,\!00$	$0,\!00\pm0,\!00$
1176	$0,\!00\pm0,\!00$	$0,\!00\pm0,\!00$

Tabela 11 – Valores de atividade específica da nitrogenase de *Pseudomonas* sp. ICB383 em cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar.

Tempo (h)	Atividade Controle	Atividade Co-cultura
	(fmol.UFC ⁻¹ .h ⁻¹)	(fmol.UFC ⁻¹ .h ⁻¹
0	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
6	$0,08\pm0,25$	$0,\!20\pm\!0,\!27$
24	$0,39\pm0,26$	$0,45\pm0,17$
48	$1,05\pm0,48$	$5,58\pm0,89$
72	$0,89\pm0,46$	$3,59\pm0,78$
168	$0,16\pm0,49$	$4,75\pm0,48$
216	$0,17\pm0,08$	$3,14\pm0,28$
336	$0,66\pm0,09$	$6,25\pm0,68$
384	$0,12\pm0,17$	$2,44\pm0,15$
432	$0,00\pm0,00$	$0,95\pm0,34$
552	$0,00\pm0,00$	$0,78\pm0,32$
760	$0,00\pm0,00$	$0,24\pm0,07$
928	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
1096	$0,\!00\pm0,\!00$	$0,00\pm0,00$
1200	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$

Tabela 12 – Valores de atividade específica da nitrogenase de *Pantoea* sp. ICB409 em cultura pura e em co-cultura com calo de cana-de-açúcar.

Tempo (h)	Atividade Controle	Atividade Co-cultura
	$(fmol.UFC^{-1}.h^{-1})$	(fmol.UFC ⁻¹ .h ⁻¹
0	0±	$0,00\pm0,00$
4	$70,25\pm0,76$	$2,88\pm0,68$
8	$79,57\pm1,02$	$6,12\pm0,57$
24	$27,88\pm0,45$	$7,53\pm0,21$
30	$4,05\pm0,23$	$0,00\pm0,00$
48	$1,24\pm1,08$	$0,00\pm0,00$
72	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
96	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
168	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
216	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
264	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
336	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
384	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
432	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
504	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
624	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
792	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
960	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$
1176	$0,00\pm0,00$	$0,00\pm0,00$