

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

**BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS FIXADORAS DE N₂ EM ASSOCIAÇÃO COM
PLANTAS**

**CNPAB
Seropédica, RJ
Dezembro/1997**

ISSN 0104-6187



Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

**BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS FIXADORAS DE N₂ EM ASSOCIAÇÃO COM
PLANTAS**

V.L.D. Baldani, V.M. Reis, J.I. Baldani, O. Kimura e J. Döbereiner

**CNPAB
Seropédica, RJ
Dezembro/1997**

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à
Embrapa-CNPAB
Antiga Rodovia Rio/São Paulo
Telefone: (021)682-1086; (021)682-1500
Telex: (21) 32723 EBPA
Fax: (021)682-1230
Caixa Postal 74505
23851-970 Seropédica, RJ

Comitê de Publicações
Hélvécio De-Polli(Presidente)
Johanna Döbereiner
José Ivo Baldani
Paulo Augusto da Eira
Norma Gouveia Rumjanek
Sebastião Manhães Souto
Dorimar dos Santos Felix(Bibliotecária)

BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; KIMURA, O.; DÖBEREINER, J.
Bactérias fitopatogênicas fixadoras de N₂ em associação com plantas. Seropédica:
Embrapa-CNPAB, 1997. 25p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 41).

1. Bactéria patogênica. 2. Fixação biológica de nitrogênio(FBN). 3. Planta. I. Reis, V.M., colab. II. Baldani, J.I. colab. III. Kimura, O., colab. IV. Döbereiner, J., colab. V. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). VI. Título. VII. Série.

CDD 579.3

© Embrapa

SUMÁRIO

1. RESUMO	4
2. INTRODUÇÃO	5
3. DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS FITOPATOGÊNICAS.....	6
3.1. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	6
3.2. <i>Burkholderia</i> spp.	7
3.3. <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> (Baldani et al., 1996) sin. <i>Pseudomonas rubrisubalbicans</i> (Christopher & Edgerton, 1932).....	9
3.3.1. POSIÇÃO TAXONÔMICA	13
3.4. <i>Pantoea herbicola</i> sin. <i>Erwinia herbicola</i>.....	14
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
5. AGRADECIMENTOS.....	17
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS FIXADORAS DE N₂ EM ASSOCIAÇÃO COM PLANTAS

V.L.D. Baldani¹, V.M. Reis¹, J.I. Baldani¹, O. Kimura⁺ e J. Döbereiner¹.

1. RESUMO

Neste trabalho foram reunidas as informações disponíveis sobre bactérias fitopatogênicas que também são capazes de fixar nitrogênio atmosférico. De toda a literatura citada, apenas quatro espécies foram descritas com estas características: *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e *Pantoea herbicola*. Das quatro, apenas *H. rubrisubalbicans* tem trabalhos que estudam a inoculação em plantas, a expressão de sintomas, além de estudos de infecção e colonização, sendo que todos estes foram desenvolvidos na EMBRAPA-Agrobiologia. *A. tumefaciens* foi citada como fixadora de N₂ por apenas dois relatos de um único grupo de pesquisa. Mesmo na lista de bactérias diazotróficas, essa espécie não é citada, talvez devido a escassez de resultados. *Pantoea herbicola* tem sido descrita como uma bactéria oportunista, isto é, coloniza a planta após a entrada do agente fitopatogênico, aproveitando-se da lesão causada por este. Já o gênero *Burkholderia* inclui a espécie de *B. cepacia* que é o agente causal da podridão mole da cebola (*Allium cepa* L.) e que anteriormente pertencia ao gênero *Pseudomonas*. Recentemente, esta espécie foi descrita como patogênica em seres humanos. Estudos taxonômicos revelaram que as estirpes diazotróficas, na realidade, pertencem a espécie *B. vietnamiensis*, que agrega um grande número de isolados de arroz (*Oriza sativa*), sendo que _____

Pesquisadores PhD da *Embrapa Agrobiologia*, km 47, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica, RJ

[†] In memoriam.

dois isolados de material humano também eram capazes de fixar nitrogênio. Vale ressaltar que, em nenhum dos casos, há relatos de redução agronomicamente importantes na produção das culturas pela presença destas bactérias e mesmo no caso do *H. rubrisulbalbicans*, a doença estria mosqueada da cana-de-açúcar só apresenta sintomas em variedades sensíveis. Outros gêneros, como *Klebsiella* e *Pseudomonas* incluem diversas estirpes e espécies patogênicas, mas nenhuma delas foi capaz de fixar nitrogênio.

Embora se conheça um grande número de bactérias diazotróficas, parece que durante a evolução, houve o favorecimento de material genético que garante a estes organismos a convivência com a planta sem o desenvolvimento de relações fitopatogênicas. Muito pouco se conhece sobre a interface entre os efeitos benéficos e patogênicos, e nem como um mecanismo pode se sobrepor ao outro. Para a nossa sorte, até o momento, bactérias com características benéficas a planta não chegam a desenvolver doenças de importância econômica.

2. INTRODUÇÃO

Durante o processo de evolução, alguns microrganismos foram capazes de colonizar hospedeiros sem causar nenhum sintoma de sua presença, mesmo quando as populações são elevadas, como o caso das bactérias diazotróficas endofíticas que colonizam o interior das plantas. Atualmente são conhecidas mais de 140 espécies de bactérias diazotróficas, incluindo cianobactérias e actinomicetos (Young, 1992). Neste universo, apenas quatro espécies são consideradas fitopatogênicas. São elas: *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Herbaspirillum rubrisulbalbicans* e *Pantoea herbicola*. Entretanto, algumas controvérsias existem sobre a espécie *A. tumefaciens*, pois até o momento apenas dois trabalhos verificaram a capacidade de fixação biológica de N em duas estirpes (Kanvide et al., 1987; Kanvide & Sastry, 1990) sendo que esta espécie não foi citada na lista de bactérias diazotróficas apresentada por Young (1992).

A grande maioria das bactérias fitopatogênicas são parasitas facultativos, possuindo mecanismos versáteis de sobrevivência fora da planta hospedeira. A partir da penetração nas raízes, a bactéria multiplica-se nos espaços intercelulares das células do córtex, invade o parênquima vascular chegando aos vasos do protoxilema através da degradação da parede celular (Wallis & Truter, 1978, Vasse et al., 1995). Uma vez estabelecida a bactéria no tecido vegetal, ocorre o aparecimento da doença ou contrariamente, seu reconhecimento pela planta hospedeira, expressão de mecanismos de defesa específicos ou de uma resposta hipersensível, com conseqüente falha no estabelecimento da bactéria no tecido da planta (Ouchi, 1983; Gross & Cody, 1985; Mckhann & Hirsch, 1994, Mellor & Collinge, 1995).

Djordjevic et al., (1987) sugerem que através de um longo período de evolução, muitos fitopatógenos tornaram-se tão compatíveis com a planta hospedeira e que, com o passar do tempo, foram causando cada vez menos danos e possivelmente promovendo algum benefício. Desta forma, uma bactéria pode ser fitopatógena por um lado e benéfica por outro como por exemplo, através da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Até onde o equilíbrio entre ganhos e perdas se mantém? Numa interação tão complexa sabe-se que o genótipo da planta pode acionar um ou outro lado. Os mecanismos de resistência das plantas aos fitopatógenos podem ser básicos (ou gerais) ou específicos. Mas que outros fatores estão relacionados com esta interação? Esta pergunta ainda não tem resposta.

3. DESCRIÇÃO DAS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS FITOPATOGÊNICAS

3.1. *Agrobacterium tumefaciens*

Esta espécie pertencente à família Rhizobiacea e possui células que podem ser classificadas como bastonetes Gram-negativos, móveis, peritríquias, não esporulantes e aeróbias. O gênero *Agrobacterium* possui quatro espécies: *A. tumefaciens*, *A. radiobacter*, *A. rhizogenes* e *A. rubi*. *A. tumefaciens* invade os tecidos das raízes e dos caules das plantas e esta invasão ocorre através de feridas, causando transformações celulares que acarretam

doenças como a galha ou tumor (Binns & Thomashow, 1988). Após a infecção, a bactéria adere a parede celular do hospedeiro, sendo esta etapa fundamental para a formação dos tumores e existindo uma relação direta entre virulência e adesão (Lippincott & Lippincott, 1969). Desde a descoberta de que *A. tumefaciens* é o agente causal da formação de tumores (galhas) que esta bactéria tem sido considerada um fitopatógeno. O tumor induzido por *Agrobacterium* está correlacionado com a presença de uma grande plasmídeo indutor denominado Ti. É uma bactéria de solo e algumas estirpes possuem especificidade hospedeira. Helmann, (1981) enfatizou a estreita similaridade existente entre *Rhizobium meliloti* e *Agrobacterium tumefaciens* e sugeriu a possibilidade de interconversão entre esses microrganismos.

Há apenas dois relatos sobre fixação de N₂ nesta bactéria feitos por Kanvide et al., (1987) e Kanvide & Sastry (1990). Esses autores reportaram que duas estirpes de *A. tumefaciens* (C58 e B6) pode fixar N₂ em meio de cultivo sem nitrogênio combinado, reduzir acetileno e incorporar ¹⁵N em presença de ¹⁵N₂. Como em outros diazotróficos, a presença de amônia e aerobiose inibem a atividade da nitrogenase. Entretanto, novos estudos são necessários para confirmar o processo de fixação biológica de N₂ nesta bactéria.

3.2. *Burkholderia* spp.

O gênero *Burkholderia* foi recentemente criado e inclui basicamente algumas espécies anteriormente classificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (Yabuuchi et al., 1992). O gênero *Pseudomonas* é constituído de espécies que possuem uma grande diversidade metabólica e propriedades patogênicas. Este gênero tem sido extensamente revisto nos últimos 10 anos sendo várias espécies renomeadas (Palleroni, 1992; 1993), como é o caso de *Pseudomonas cepacia* que formalmente era incluída no grupo II de homologia do rRNA de *Pseudomonas* e agora é reconhecida como *Burkholderia* (Palleroni, 1993). Esta classificação foi baseada na sua composição celular, sequenciamento da 16S rRNA, homologia do DNA:DNA e características fenotípicas (Yabunchi et al. 1992). Esta

bactéria que foi originalmente descrita como agente causal da podridão mole de cebola (Burkholder, 1950; Karns et al., 1983) e tem sido encontrada em diferentes tipos de solo e raízes. Também foi descrita como cohabitante de nódulos de *Frankia* (Knowlton et al., 1980) e como repressor de patógenos de solo (Lumsden et al., 1982). Por outro lado, esta bactéria também tem sido encontrada em pacientes com fibrose cística (Goldmann & Klinger, 1986), além de ser considerada como contaminante de soluções empregadas em práticas hospitalares (Bevivino et al., 1994). Este microrganismo apresenta uma considerável versatilidade fisiológica incluindo atividade de pectinase (Gonzalez & Vidaver, 1979), biodegradação de pesticidas (Chatterjee et al., 1982; Karns et al., 1983) e ampla resistência a antibióticos (Smirnov et al., 1982).

Estudos de comparação fenotípica entre estirpes de *Burkholderia cepacia* isoladas de rizosfera e de ambientes hospitalares revelaram que apenas os isolados de rizosfera foram capazes de fixar nitrogênio, crescer numa ampla faixa de temperatura, produzir ácido indol-acético e sideróforos, além de apresentar atividade antagônica contra vários fungos fitopatogênicos como *Fusarium* e *Rhizoctonia* (Bevivino et al., 1994). Estudos taxonômicos conduzidos posteriormente, mostraram que uma das estirpes fixadoras de N₂ na realidade pertence a espécie *Burkholderia vietnamiensis* que agrega um grande número de isolados de rizosfera de arroz (Gillis et al., 1995). O outro isolado considerado fixador de nitrogênio foi confirmado como pertencente a espécie *B. cepacia* porém não foi demonstrada a capacidade de fixar N₂ pela técnica de redução de acetileno (Gillis et al., 1995). Outro aspecto intrigante no gênero *Burkholderia* refere-se a dois isolados obtidos de amostras de material humano, que fixam nitrogênio e de acordo com as características genéticas foram incluídos na espécie *B. vietnamiensis* (Gillis et al., 1995).

Atualmente esta bactéria tem sido considerada de grande importância devido ao seu uso como controle biológico (Maloughlin et al. 1992), além de estar implicada na degradação de pesticidas (Falson et al. 1990).

Baldani (1996) descreveu uma série de isolados de mandioca (*Manihots sculentum*), batata-doce (*Ipomoeae batatas*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e arroz (*Oriza sativa*) como pertencentes a uma nova espécie do gênero *Burkholderia*, capazes de fixar N₂ em meio de cultura ácido (pH 4.0) e infectar raízes de arroz, sendo denominada de *B. brasilensis*. Oliveira (1992) mostraram aumento de produção de grãos em plantas de arroz

inoculadas com estirpe (M 130) dessa bactéria. Outros isolados de cana-de-açúcar não hibridizaram com a sonda desenvolvida para o grupo de *B. brasiliensis* e podem vir a se constituir como uma nova espécie deste gênero (Baldani, 1996).

3.3. *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (Baldani et al., 1996) sin. *Pseudomonas rubrisubalbicans* (Christopher & Edgerton, 1932)

O gênero *Herbaspirillum* é composto de duas espécies: *H. seropedicae* (Baldani et al., 1986) e *H. rubrisubalbicans* (Baldani et al., 1996). Bactérias deste gênero apresentam forma curvilínea, são Gram-negativas e microaeróbicas quando fixando nitrogênio.

Herbaspirillum rubrisubalbicans é a nova denominação de *Pseudomonas rubrisubalbicans*, reconhecida como agente causal da doença estria mosqueada em cana-de-açúcar (Christopher & Edgerton, 1932; Krasilnikov, 1949). Esta doença foi inicialmente descrita em cana-de-açúcar plantada no Estado de Louisiana (EUA) em 1927 (Christopher & Edgerton, 1932). Posteriormente sua ocorrência foi registrada em mais de 24 países, incluindo o continente Africano e as Américas (Palleroni, 1984). Esta bactéria também foi descrita como fitopatogênica em plantas de sorgo sob condições naturais na Nova Zelândia ou após a sua inoculação artificial (Hale & Wilkie, 1972ab). No Brasil, foi constatada primeiramente em cana-de-açúcar plantada nos estados de Pernambuco e a seguir na Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará nos anos de 1975 a 1978 (Liu et al., 1979). Galli et al., (1980) descreveram uma variedade sensível de cana-de-açúcar, a B 4362 que atualmente é usada para os estudos de colonização no laboratório da *Embrapa Agrobiologia* por desenvolver o sintoma característico da doença (Olivares, 1997). A estria mosqueada é considerada uma doença foliar de pouca importância econômica e não há relatos mais recentes desta doença no Brasil, a partir do momento que são usadas variedades resistentes. É uma doença restrita ao limbo foliar e se expressa na cana-de-açúcar na forma de estrias vermelhas estreitas acompanhando as nervuras secundárias. As estrias vem acompanhadas de um fundo mosqueado de verde e amarelo. Com a evolução dos sintomas, as estrias se coalescem e desenvolvem uma clorose extensa seguida de

necrose e secamento precoce da lâmina foliar, impedindo o transporte de nutrientes. A transmissão se dá por respingos de chuva e mudas contaminadas (Olivares, 1997).

Pimentel et al., (1991) avaliaram a patogenicidade de diversas estirpes de *H. rubrisubalbicans* e *H. seropedicae* em cana-de-açúcar (cv. B 4362), sorgo (*Sorghum bicolor*) e capim Napier (*Pennisetum purpureum*) e observaram que a inoculação artificial dos isolados de *H. rubrisubalbicans* causava sintomas nas três plantas usadas no ensaio.

Posteriormente, James et al. (1997) e Olivares et al. (1997) testaram a patogenicidade das estirpes de *H. rubrisubalbicans* e compararam com estirpes de *H. seropedicae* através de injeções de suspensões de células diretamente no limbo foliar. *H. rubrisubalbicans* desenvolveu sintomas de estrias mosqueadas em sorgo, capim elefante e na variedade sensível de cana-de-açúcar B-4362. Já a variedade resistente de cana-de-açúcar, a SP 70-1143, não apresentou nenhum sintoma da doença. Plantas inoculadas com *H. seropedicae* normalmente não desenvolvem sintomas da doença, embora pequenas estrias (< 3 mm de largura) possam ocasionalmente ocorrer perto do ponto de inoculação (James et al., 1997). Estes resultados parecem estar associados com o número de bactérias que colonizam os vasos. No caso de *H. seropedicae*, estes números são mínimos e não causam sintomas. Já *H. rubrisubalbicans* coloniza intensamente os vasos do xilema e esta invasão está relacionada com a sensibilidade da variedade (Olivares et al., 1997).

Segundo James et al. (1997), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* coloniza intensamente os vasos do protoxilema e as lacunas (cavidades associadas aos vasos xilemáticos) das folhas de sorgo, resultando no aparecimento da doença (estria vermelha é a denominação da doença para sorgo). Neste caso, a bactéria reagiu positivamente com o anticorpo específico para o componente II da nitrogenase aos 5 dias após a inoculação, sendo que aos 14 dias esta reação foi negativa. Estes resultados mostraram que, no início da doença, provavelmente o conteúdo de N extracelular era baixo, o que permitiu a expressão da enzima. Já nos estágios posteriores da lesão, a lise celular libera N e pode ter inativando a enzima. Nestas condições, a intensa colonização do vaso e o baixo pO₂ podem favorecer a

síntese da nitrogenase. Na cana-de-açúcar houve reação com o soro da nitrogenase nas colônias presentes nos espaços intercelulares perto do estômatos antes do aparecimento dos sintomas mais severos da doença. Infelizmente este soro não foi usado na variedade resistente (Olivares et al., 1997). Desta forma, estudos sobre a localização da nitrogenase associada a colonização destas bactérias nos tecidos da cana-de-açúcar devem ser intensificados.

Já *H. seropedicae* apresentou uma reação de hipersensibilidade na folhas de cana (morte celular ao redor do ponto de inoculação), o que impediu o avanço da colonização bacteriana (Olivares et al., 1997). Estudos ecológicos sobre a distribuição desta espécie mostraram que *H. seropedicae* só foi isolado de raízes e colmos de cana-de-açúcar, e não de folhas (Olivares et al., 1996).

Outra diferença encontrada para inoculações artificiais de sorgo e cana-de-açúcar é que no sorgo, a colonização se restringe aos vasos do xilema enquanto que na cana-de-açúcar, as células de *H. rubrisubalbicans* escapam do xilema e colonizam o mesófilo foliar (James et al., 1997).

Na variedade resistente de cana-de-açúcar, a SP 70-1143, não há o aparecimento do sintoma da doença. Próximo ao ponto de inoculação, *H. rubrisubalbicans* foi observado formando pequenas colônias que permaneciam aderidas a parede secundária do metaxilema e desta forma não houve obstrução do vaso. Também foi observado uma grande deposição de gomas derivadas da planta que preenchem o lúmen do vaso. Os autores ressaltam que este material possa fazer parte da resposta de defesa da planta contra a colonização da bactéria como observado para outras interações fitopatogênicas (Wallis, 1977; Ouchi, 1983; Bretschneider et al., 1989; Perroto et al., 1994; Young et al., 1995). Este material gomoso provavelmente contém lecitinas, glicoproteínas, compostos fenólicos e callose, além de outros componentes (Ouchi, 1983; Bestwick et al., 1995). Tais materiais gomosos são produzidos a partir da expansão da parede primária do vaso e da lamela média, que são constituintes do vaso do xilema e são produzidos de uma maneira geral como uma resposta

a infecção. Tal deposição de gomas preenchendo as cavidades entre as deposições da parede secundária e o lúmen dos vasos foi similar ao relatado por Vandermolen et al., (1977), Kao & Damann (1980), Bretschneider et al., (1989) e Boher et al., (1995).

Nas duas variedades de cana-de-açúcar (suscetível e resistente) houve a colonização das cavidades sub-estomáticas e indicação da entrada (ou saída) da bactéria via estômato. Nos estágios mais avançados da doença na variedade sensível, a bactéria parece que emergiu do estômato e colonizou a superfície foliar. A colonização dos estômatos, localizados nas áreas menos afetadas pela doença aos 20 dias após a inoculação, pode ser resultante de uma infecção secundária a partir da superfície dos tecidos doentes (Olivares et al., 1997). Os autores ressaltam que, após a colonização dos vasos do xilema, as bactérias escapam e passam a colonizar o mesófilo adjacente e atingem os estômatos. Na variedade resistente ocorreu uma rápida resposta de defesa da planta que restringiu a disseminação da bactéria como observado no xilema. Esta resposta foi observada através da produção de compostos fenólicos e material gomoso envolvendo a bactéria. Neste caso, *H. seropedicae* não foi capazes de utilizar esta abertura natural.

Já em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas e inoculadas “in vitro” com uma suspensão de bactérias, ocorre uma rápida colonização da superfície na forma de um ataque apolar em monocamada, raramente formando agregados, mesmo após um dia de inoculação. A partir dos 2 até 7 dias após a inoculação ocorreu uma maior multiplicação das células na região de emergência das raízes laterais e regiões de ruptura das células da epiderme. A partir do quarto dia ocorreu a colonização do parênquima xilemático associado aos vasos condutores e em seguida a colonização do próprio xilema. Através desta via, toda a parte aérea pôde ser colonizada (Olivares, 1997).

3.3.1. POSIÇÃO TAXONÔMICA

A inclusão desta espécie no gênero *Pseudomonas* foi inicialmente questionada por Goor et al., (1986) baseado nos resultados de hibridização de DNA:rRNA de 35 estirpes. Seu posicionamento deveria ser dentro da superfamília III rRNA e deveria ocupar um outro gênero já descrito ou criar um novo. Entretanto, Stead (1992) trabalhando com o padrão de ácidos graxos celulares como parâmetro taxonômico para a classificação de *Pseudomonas* fitopatogênicas, confirmaram o seu posicionamento dentro da espécie *Pseudomonas rubrisubalbicans*. Gillis et al., (1990) com base nos resultados de homologia do RNA, DNA e análise numérica de testes de uso de fontes de carbono, enquadraram a espécie num único sub-ramo dentro da superfamília III rRNA e propuseram a inclusão de *Pseudomonas rubrisubalbicans* no gênero *Herbaspirillum*. A subdivisão em duas espécies foi justificada pela baixa percentagem de homologia do DNA entre os isolados e pela existência de diferenças fenotípicas (Baldani et al., 1996).

O gênero *Herbaspirillum* foi descrito por Baldani et al., (1986) para enquadrar um grupo de 119 isolados novos associados à rizosfera, raízes lavadas e esterilizadas de arroz, sorgo e milho. Primeiramente, pensou-se tratar de uma nova espécie de *Azospirillum*, mas Falk et al., (1986) utilizando a técnica de hibridização do RNA:RNA descartaram esta possibilidade. Os resultados de homologia do DNA:DNA mostraram que os 17 isolados testados contra a estirpe padrão Z67 ficaram entre 53 e 100% de similaridade e quando estes isolados foram comparados contra *Azospirillum* sp., esta homologia foi menor que 24% (Baldani et al., 1986). Ao final dos testes comparativos com outras bactérias diazotróficas, foi criado o no gênero *Herbaspirillum* com uma única espécie: *H. seropedicae*. A descrição do gênero inclui bactérias em forma de bastonetes curvos, Gram negativas, microaeróbicas, vibróides, móveis, com 1 a 3 flagelos inseridos em 1 ou 2 pólos (Krieg, 1984).

Diversas fontes de carbono foram utilizadas no sentido de achar fontes diferenciadoras que poderiam ser usadas para separar as espécies. Das 21 fontes testadas,

apenas meso-eritritol (*H. rubrisubalbicans*) e N-acetil-glucosamina (*H. seropedicae*) apresentaram resultados consistentes para todas as estirpes testadas (Baldani et al., 1996).

Em contraste com outras espécies de bactérias diazotróficas como o *Azospirillum* spp., *Herbaspirillum* não sobrevive no solo sem planta, mesmo solo inoculado (Baldani et al., 1992). Após 3 a 4 semanas de inoculação não foi mais possível detectar as bactérias de ambas as espécies de *Herbaspirillum*. Entretanto, após o plantio de sorgo neste solo foi possível detectar a bactéria nas raízes lavadas e esterilizadas (Olivares et al., 1996). Duas hipóteses podem ter ocorrido: ou a bactéria estava presente no solo em números abaixo do nível de detecção do método (em torno de cem células por g de tecido ou solo) ou estavam num estado viável mas não culturável (Roszak & Colwell, 1987). Este estado caracteriza-se pelo desvio no metabolismo natural da bactéria e surge em função dos estresses que ocorrem no solo, em que a célula bacteriana está intacta, viável mas não sofre divisão celular nos meios de cultivo comumente empregados. Esta característica de baixa sobrevivência no solo permite que *Herbaspirillum* seja descrito como uma bactéria endófito, ocupando uma posição intermediária entre os obrigatórios e os facultativos visto que de alguma forma permanece no solo e é estimulado pela presença de plantas hospedeiras como o sorgo.

3.4. *Pantoea herbicola* sin. *Erwinia herbicola*.

O gênero *Erwinia* foi originalmente proposto por Winslow et al, (1917) baseado na patogenicidade das estirpes e pertence a família Enterobacteriaceae. Contém células em forma de bastonete, peritríquias, anaeróbias facultativas, não esporulantes, Gram-negativas, fitopatogênicas e estão associadas as plantas causando doenças de murcha ou podem viver como saprófitas sendo constituintes da flora epifítica do solo. Também podem causar doenças em seres humanos (Pérombelon, 1992). Na última edição do Krieg & Holt, 1984, foram descritas quinze espécies resultando numa nomenclatura bastante confusa. Atualmente, o gênero foi renomeado para *Pantoea* e inclui as antigas espécies *Erwinia herbicola*, *Enterobacter agglomerans* e *Erwinia milletiae* (Beji et al., 1988) sendo que as

duas primeiras fixam nitrogênio. Os isolados clínicos são classificados como pertencentes ao gênero *Enterobacter* e os isolados de plantas no gênero *Pantoae* (Lelliott & Dickey, 1984).

A espécie *Pantoae herbicola* inclui várias estirpes que podem ocorrer na superfície da planta ou em lesões. Nas lesões causadas por outras bactérias fitopatogênicas, é considerada como um organismo secundário. Esta espécie não tem sido descrita como agente causal primário de qualquer doença. Deste forma, é considerada como uma bactéria oportunista, podendo estar presente também em animais, solo, água e ar (Lelliott & Dickey, 1984). Existem relatos que esta espécie poderia estar associada ao raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar. Testes de patogenicidade causaram, em cana inoculadas, uma descoloração vascular semelhante àquela causada pela bactéria do raquitismo da soqueira. Desta forma, foi considerada como integrante do complexo bacteriano associado ao raquitismo juntamente com *Xanthomonas albilineans* e *Pseudomonas* (Galli et al. 1980). Estudos posteriores mostraram que o agente causal do raquitismo da soqueira é a bactéria *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (Harrison & Davis, 1988) e não um complexo de bactérias. Desta mesma forma, *P. herbicola* apresenta-se como um microrganismo oportunista juntamente com *X. albilineans* e *Pseudomonas* em plantas com raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar.

P. herbicola é considerada como fixadora de N₂ quando isolada de raízes e toletes não esterilizados de cana-de-açúcar, onde tem mostrado atividade na redução de acetileno e capacidade de crescer em meio sem nitrogênio combinado (Papen & Werner, 1979; Rennie et al. 1982). Gracioli et al. (1986), evidenciaram a ocorrência desta bactéria em raízes, colmos e folhas secas de cana-de-açúcar. Estes autores utilizando o método de redução de acetileno, reafirmaram o caráter fixador desta bactéria que também pode agir na planta como produtora de hormônios de crescimento (Brande & Lindow, 1996).

Jacobs et al., (1985) utilizaram de imunomarcção com ferretina para visualização ao microscópio eletrônico de varredura e localizaram *P. herbicola* dentre outras bactérias endofíticas associadas as raízes de beterraba (*Beta vulgaris* L.). Esta bactéria também apresenta potencial como agente de biocontrole de outras enfermidades como no caso dos fungos *Fusarium culmorum* e *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* (Kempf & Wolf, 1989) ou

mesmo contra outras espécies de *Erwinia* mais virulentas como *E. amylovora* (Kearns & Hale, 1996).

Entretanto, até o momento, não há relatos na literatura de novos trabalhos sobre esta bactéria no que se refere a fixação biológica de nitrogênio.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o momento, foram descritas apenas quatro espécies de bactérias diazotróficas fitopatogênicas. Das quatro, apenas *H. rubrisubalbicans* foi estudada em mais profundidade quanto a sua interação com a planta e todos os trabalhos foram desenvolvidos na *Embrapa Agrobiologia*. Os demais citam apenas alguns isolados como fitopatógenos, sendo que não foram feitos estudos de inoculação em plantas, sintomatologia ou infecção. Daí a grande dificuldade de se conhecer a interação destes microrganismos com as plantas.

Deve-se destacar que o número de espécies bacterianas descritas até o momento é muito pequeno e representa apenas 5% da biodiversidade bacteriana que já foi encontrada a partir de estudos da 16S rRNA que mostram que a grande maioria são de microrganismos não cultiváveis (Ward et al., 1990). Assim, este número tende a crescer com os avanços na descrição de novas espécies ou mesmo através do posicionamento taxonômico das espécies, como no caso de *H. rubrisubalbicans* e *B. vietnamiensis*. Mas o ponto mais importante é quanto ao relacionamento destes organismos com as plantas. Sabe-se que mecanismos de patogenicidade geram reações por parte de seus hospedeiros e que alguns microrganismos podem penetrar na planta sem causar nenhum dano. Mas o que controla este mecanismo? Até onde uma bactéria desencadeia o mecanismo de reação da planta numa variedade sensível e na outra pode se tornar uma bactéria benéfica, como é o caso do *Herbaspirillum rubrisubalbicans*? Estas, dentre outras, são perguntas que necessitam de estudos mais detalhados para esclarecer a complexidade dessas associações.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a colaboração dos Dr(s). João Carlos Pereira e Helvécio De-Polli pela correção técnica e a Sr^a. Dorimar dos Santos Félix pela normalização das referências bibliográficas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium, **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.36, p. 86-93, 1986.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HORSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Inclusion of “*Pseudomonas*” *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, within the genus *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, p.802-810, 1996.
- BALDANI, V.L.D. **Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica.** Seropédiaca: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 234p. Tese de Doutorado.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Rehovot, v.13, p.65-73, 1992.
- BEJI, A.; MERGAERT, J.; GAVINI, F.; IZARD, D.; KERSTERS, K.; LECLERC, H.; DE LEY, J. Subjective synonymy of *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae* and *Enterobacter agglomerans* and redefinition of the taxon by genotypic and phenotypic data. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, p.77-88, 1988.

- BESTWICK, C.S.; BENNETT, M.M.; MANSFIELD, J.W. Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. **Plant Physiology**, Rockville, v.108, p.503-516, 1995.
- BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; CARUSI, M.V.; DEL GALLO, M.; VISCA, P. Phenotypic comparisons between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. **Microbiology**, New York, v.140, p.1069-1077, 1994.
- BINNS, A.N.; THOMASHOW, M.F. Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. **Annual Reviews of Microbiology**, Palo Alto, v.42, p.575-606, 1988.
- BOHER, B.; KPEMOUA, K.; NICOLE, M.; LUISETTI, J.; GEIGER, J.P. Ultrastructure of interactions between cassava and *Xanthomonas campestris* pv. *manihotis*: cytochemistry of cellulose and pectin degradation in a susceptible cultivar. **Phytopathology**, St. Paul, v.85, p.777-788, 1995.
- BRANDE, M.N.; LINDOW, S.E. Cloning and characterization of a locus encoding an indolepyruvate decarboxylase involved in indole-3-acetic acid synthesis in *Erwinia herbicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.4121-4128, 1996.
- BRETSCHNEIDER, K.E.; GONELLA, M.P.; ROBESON, D.J. A comparative light and electron microscopical study of compatible and incompatible interactions between *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and cabbage (*Brassica oleracea*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.34, p.285-297, 1989.
- BURKHOLDER, W.H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, St. Paul, v.40, p.115-117, 1950.
- CHATTERJEE, D.K.; KILBANE, J.J.; CHAKRABARTY, A.M. Biodegradation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid in soil by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.44, p.514-516, 1982.
- CHRISTOPHER, W.N.; EDGERTON, C.W. Bacterial stripe diseases of sugarcane in Louisiana. **Journal of Agricultural Research**, Queensland, v.41, p.259, 1932.
- DJORDJEVIC, M.A.; GABRIEL, D.W.; ROLFE, B.G. *Rhizobium*-the refined parasite of legumes. **Annual Reviews of Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 145-168, 1987.

- FALK, E.C.; JOHNSON, J.L.; DÖBEREINER, J.; KRIEG, N.R. Deoxyribonucleic acid and ribonucleic acid homology studies of genera *Azospirillum* and *Conglomeromonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.36, p.80-85, 1986.
- FALSON, B.R.; CHAPMAN, P.J.; PRITCHARD, P.H. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.1279-1285, 1990.
- GALLI, F.; CARVALHO, P.C.T.; TOKESHI, H.; BALMER, F.; KIMATI, H.; CARDOSO, C.O.; SALGASO, C.L.; KRUGNER, T.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; BERGAMIN, F.A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. V.2.
- GILLIS, M.; DÖBERENIER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and "*Aquaspirillum autotrophicum*". In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 5., 1990, Florence. **Abstracts...** Florence: University of Florence / National Research Council of Italy, 1990. p.103.
- GILLIS, M.; VAN, T.V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HERBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HENLEIN, T.; FERNANDEZ, M.P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposal of *Burkholderia vietamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in vietnam. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p. 274-289, 1995.
- GOLDMANN, D.A.; KLINGER, J.D. *Pseudomonas cepacia*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **Journal of Pediatrics**, v.108, p. 806-812, 1986.
- GONZALEZ, C.F.; VIDAVER, A.K. Bacteriocin, plasmid and pectolytic diversity in *Pseudomonas cepacia* of clinical and plant origin. **Journal of General Microbiology**, London, v.110, p.161-170, 1979.
- GOOR, M.; FALSEN, E.; POT, E.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; DE-LEY, J. Taxonomy position of the phytopathogen *Pseudomonas rubrisubalbicans* and related clinical

- isolates. **XIV International Congress of Microbiology**, Wanchester, England (Abstracts), 1986.
- GRACIOLI, L.A.; FREITAS, J.R. de; RUSCHEL, A.P. Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.14, p.191-196, 1986.
- GROSS, D.C.; CODY, Y.S. Mechanisms of plant pathogenesis by *Pseudomonas* species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.31, p.403-410, 1985.
- HALE, C.N.; WILKIE, J.P. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. **New Zealand Journal of Agriculture Research**, New Zealand, v.15, p. 448-456, 1972a.
- HALE, C.N. ; WILKIE, J.P. Bacterial leaf stripe of sorghum in New Zeland. **New Zealand Journal of Agriculture Research**, New Zealand, v.15, p.457-460, 1972b.
- HARRISON, N.A.; DAVIS, M.J. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Phytopathology, St. Paul**, v. 78, p.722-727, 1988.
- HELMANN, W. Rhizobium genetics. In: BOTHE, H.; TREBST, A. ed. **Biology of inorganic nitrogen and sulphur**. New York: Springer-Verlag, 1981. p.87-102.
- JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.63, p.1262.1265, 1985.
- JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.48, p.785-797, 1997.
- KANVIDE, L.; SASTRY, G.R.K. *Agrobacterium tumefaciens* is a diazotrophic bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p. 2087-2092, 1990.
- KANVIDE, L.; SOLIMAN, M.H.; WARDHAN, H.; NOWELL, L.; FOX, D.; SASTRY, G.R.K. Studies on the diazotrophic nature of *Agrobacterium*. **Current Plant Science Biotechnology Agriculture**, Dordrecht. v.3, p.309-312, 1987.
- KAO, J.; DAMANN, K.E. “In situ” localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting of sugar cane. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.58, p.310-315, 1980.

- KARNS, J.S.; DUTTAGUPTA, S.; CHAKRABARTY, A.M. Regulation of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and chloroplenol metabolism in *Pseudomonas cepacia* AC1100. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.46, p.1182-1186, 1983.
- KEARNS, L.P.; HALE, C.N. Partial characterization of an inhibitory strain of *Erwinia herbicola* with potencial as a biocontrol agent of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen. **Journal of Applied Bacteriology**, London, v.81, p.369-374, 1996.
- KEMPF, H.J.; WOLF, G. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* on wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.79, p.990-994, 1989.
- KNOWLTON, S.; BERRY, A.; TORREY, J.G. Evidence that associated soil bacteria may influence root hair infection of actinorrhizal plants by *Frankia*. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v.26, p.971-977, 1980.
- KRASILNIKOV, N.A. **Guide to the bacteria and actinomycetes**. Moscow: Akademiia Nank 1949. 830p.
- KRIEG, N.R. Aerobic/microaerophilic motile helical/vibroid gram negative bacteria, In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1984. V.1. p.71-90.
- KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. V.1. 964p.
- LELLIOTT, R.A.; DICKEY, R.S. Genus VII. *Erwinia* Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1920. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.R., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1984.
- LIPPINCOTT, B.B. ; LIPPINCOTT, J.A. Bacterial attachment to a specific wound site as a essential stage in tumour initiation by *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.97, p. 620-628, 1969.
- LIU, H.P.; LEITE, M.C.C.; WANG, S.L. Doenças da cana-de-açúcar no Norte do Brasil. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 1., 1979, São Paulo. **Anais...** São Paulo: STAB, 1979. p. 227-230.

- LUMSDEN, R.D.; FRIAS, G.; GARCIA, E.R.; DUNN, M.T. Biocontrol of *Phythium aphanidermatum* on cucumber by microbial isolates from Mexican soil. **Phytopathology**, St. Paul, v.72, p.1010, 1982.
- MALOUGHLIN, F.J.; QUINN, J.P.; BETTERMANN, A.; BOOKLAND, R. *Pseudomonas cepacia* suppression of sunflower wilt fungus and role of antifungal compounds in controlling the disease. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1760-1763, 1992.
- MCKHANN, H.I.; HIRSCH, A.M. Does *Rhizobium* avoid the host response? In: DANGL, J.I., ed. **Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals**, Berlin: Springer-Verlag, 1994. p.139-162.
- MELLOR, R.B.; COLLINGE, D.B. A simple model based on known plant defence reactions is sufficient to explain most aspects of nodulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.46, p.1-18, 1995.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, p.197-200, 1996.
- OLIVARES, F.L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997. 344p. Tese de Mestrado.
- OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, Oxford, v.135, p.723-737, 1997.
- OLIVEIRA, E. **Estudo da associação entre bactérias diazotróficas e arroz**. Itaguaí:, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1992. 96p. Tese de Mestrado
- OUCHI, S. Induction of resistance or susceptibility. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.21, p.289-315, 1983.
- PALLERONI, N.J. Pseudomonadaceae, In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore: The Williams & Wilkins, 1984. V.1. p. 141-199.

- PALLERONI, N.J. Present situation of the taxonomy of the aerobic pseudomonads. In: GALLI, E.; SILVER, S.; WITHOLT, B., ed. ***Pseudomonas. Molecular Biology and Biotechnology***. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p.105-115.
- PALLERONI, N.J. *Pseudomonas* classification: A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek; Journal of Microbiology and Serology**, Delft, v.64, p.231-251, 1993.
- PAPEN, H.; WERNER, D. N₂ fixation in *Erwinia herbicola*. **Archives of Microbiology** Berlin, v.120, p.25-30, 1979.
- PÉROMBELON, M.C.M. The genus *Erwinia*. In: BALOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.-H. **The prokaryotes**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 1992. P.2899-2921.
- PERROTO, S.; BREWIN, N.J.; KANNENBERG, E.L. Cytological evidence for a host defense that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharide-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.7, p.99-112, 1994.
- PIMENTEL, J.P.; OLIVARES, F.L.; PITARD, R.M.; URQUIAGA, S.; AKIBA, F.; DÖBEREINER, J. Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *Pseudomonas rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.137, p.61-65, 1991.
- RENNIE, R.J.; FREITAS, J.R.; RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B. Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.28, p.462-467, 1982.
- ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environmental. **Microbiology Reviews**, Washington, v.51, p.365-379, 1987.
- SMIRNOV, V.V.; GARAGULYA, A.D.; KIPRIANOVA, E.A. Antibiotic properties of *Pseudomonas cepacia*. **Antibiotiki**, Moscow, v.27, p.577-580, 1982.
- STEAD, D.E. Grouping of plant pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.42, p. 281-295, 1992.
- V.1. p.469-476.

- VANDERMOLEN, G.E.; BECKMAN, C.H.; RODEHORST, E. Vascular gelation: a general response phenomenon following infection. **Physiological Plant Pathology**, Orlando, v.11, p. 95-100, 1977.
- VASSE, J.; FREY, P.; TRIGALET, A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.8, n.2, p.241-251, 1995.
- WALLIS, F.M. Ultrastructural histopathology of tomato plants infected with *Corynebacterium michiganense*. **Physiological Plant Pathology**, Orlando, v.11, p. 333-342, 1977.
- WALLIS, F.M.; TRUTER, S.J. Histopathology of tomato plants infected with *Pseudomonas solanacearum*, with emphasis on ultrastructure. **Physiological Plant Pathology**, Orlando, v.13, p.307-317, 1978.
- WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, London, v.345, p.63-65, 1990.

- WINSLOW, C.E.A.; BROADHURST, J.; BUCHANAN, R.E.; KRUMWIEDE, C.; ROGER, L.A.; SMITH, G.H. The families and genera of the bacteria. Preliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.2, p.505-566, 1917.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (PALLERONI & HOLMES, 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v.36, p.1251-1275, 1992.
- YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STANCEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, J., ed.. In: **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman, 1992. p.43-86.
- YOUNG, S.A.; GUO, A.; GUIKEMA, J.A.; WHITE, F.F.; LEACH, J.E. Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, p.1333-1341, 1995.