

## Aspectos Genéticos e Moleculares na Interação entre Organismos Patogênicos e Diazotróficos em Cana-de-açúcar







## ***Documentos 233***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

**Embrapa Agrobiologia**

BR465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: [www.cnpab.embrapa.br](http://www.cnpab.embrapa.br)

e-mail: [sac@cnpab.embrapa.br](mailto:sac@cnpab.embrapa.br)

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)  
José Guilherme Marinho Guerra  
Maria Cristina Prata Neves  
Veronica Massena Reis  
Robert Michael Boddey  
Maria Elizabeth Fernandes Correia  
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Rosa Pitard e Márcia Soares Vidal

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Felix

Edição eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2007): 50 exemplares

P445a Perin, Liamara

Aspectos genéticos e moleculares na interação entre organismos patogênicos e diazotróficos em cana-de-açúcar / Jean Luiz Simões Araújo, Verônica Massena Reis. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 41 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 233).

ISSN 1517-8498

1. Cana-de-açúcar. 2. Bactéria diazotrófica. 3. Genética molecular. I. Simões Araújo, J. L., colab. II. Reis, V. M., colab. III. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). IV. Título. V. Série.

CDD 633.61

## Autores

### **Liamara Perin**

Doutoranda em Agronomia - Ciência do Solo, UFRRJ.  
BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970,  
Seropédica/RJ  
e-mail: liaperin@yahoo.com.br

### **Jean Luiz Simões Araújo**

Eng<sup>a</sup> Agrônomo, PhD em Genética de Plantas, Pesquisador  
da Embrapa Agrobiologia  
BR 465, km 7, Caixa Postal 74505, Cep 23851-970,  
Seropédica/RJ  
e-mail: jean@cnpab.embrapa.br

### **Veronica Massena Reis**

Eng<sup>a</sup>. Agrônoma, PhD em Ciência do Solo, Pesquisadora da  
Embrapa Agrobiologia.  
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970,  
Seropédica/RJ  
e-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

VINAGRE, F. da S. **Estudo de vias de sinalização e receptores do tipo quinase envolvidos na interação entre gramíneas e bactérias diazotróficas endofíticas.** 2005. 173 p. Tese (Doutorado em Química Biológica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

VISWANATHAN, R.; MALATHI, P.; SUNDAR, A. R.; AARTHI, S.; PREMKUMARI, S. M.; PANDANABAN, P. Differential induction of chitinase and thaumatin-like proteins in sugarcane in response to infection by *Colletotrichum falcatum* causing red rot disease. **Journal of Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v. 112, n. 5, p. 471-425, 2005.

VISWANATHAN, R.; SAMIYAPPAN, R. Role of oxidative enzymes in the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) mediated induced systemic resistance in sugarcane against *Colletotrichum falcatum*. **Journal of Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v. 109, n. 1, p. 88-100, 2002.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 105-114, 1992.

URQUIAGA, S.; JANTALIA, C. P.; RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produtividade dos sistemas agrícolas na América latina. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de (Ed.). **Processos biológicos no sistema solo-planta**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. Cap. 7. p. 181-200.

VALARINI, M. J. Base molecular da interação *Rhizobium*-leguminosa. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. Cap. 12. p. 311-325.

VARGAS, C.; VINAGRE, F.; NOGUEIRA, E. M.; BALDANI, J. I.; SILVA, F. R. da; FERREIRA, P. C. G.; PADUA, V. L. M.; HEMERLY, A. S. Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: A genomic approach. **Symbiosis**, Rehovot, v. 35, n. 1-3, p. 159-180, 2003.

VETTORE, A. L.; SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1-4, p. 1-7, 2001.

VINAGRE, F.; VARGAS, C.; SCHWARCZ, K. D.; JAPIASSU, J.; NOGUEIRA, E. M.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. SHR5: a novel plant receptor kinase involved in plant-N<sub>2</sub> fixing endophytic bacteria association. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 3, p. 559-569, 2006.

VINAGRE, F. da S. **Caracterização das respostas de cana-de-açúcar da variedade B4362 à infecção por *Herbaspirillum* spp.** 2001. 68 p. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

## Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

O documento 233/2007 trata de diversos microrganismos que podem estar presentes em plantas de cana-de-açúcar, muitos deles são patógenos e provocam doenças, outros não causam doenças e podem beneficiar a planta pelo controle de patógenos, promoção de crescimento pela Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) ou produção de hormônios. Saber como a planta diferencia estes organismos é importante para obtenção de variedades mais resistentes a doenças e com maiores benefícios das associações.

José Ivo Baldani  
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

# SUMÁRIO

1. Introdução .....	7
2. A cultura da cana-de-açúcar .....	8
3. Patógenos em cana-de-açúcar .....	9
3.1. O papel da planta na defesa contra patógenos.....	10
4. Aspectos genéticos e moleculares envolvidos na resposta da cana-de-açúcar à presença de organismos patogênicos.....	13
4.1. Produção de elicitores.....	14
5. Bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar .....	15
5.1. Estabelecimento endofítico de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar.....	17
5.2. Contribuição de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar....	19
5.3. O papel da planta no estabelecimento da associação com bactérias diazotróficas .....	21
6. Aspectos genéticos e moleculares na resposta da cana-de-açúcar à presença de bactérias diazotróficas endofíticas.....	21
6.1. Receptores do tipo quinase .....	26
6.2. Glutamina sintetase .....	28
6.3. Atuação de <i>G. diazotrophicus</i> no controle de <i>X. albilineas</i> .....	28
7. Considerações finais .....	30
8. Referências Bibliográficas.....	30

SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 26, p. 136-168, 1997.

SOLAS, M. T.; PIÑON, D.; ACEVEDO, R.; FONTANIELLA, B.; LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Ultrastructural changes and production of a xanthan-like polysaccharide associated with scald of sugarcane leaves caused by *Xantomonas albilineans*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 351-359, 2003.

SOUTO, S. M.; DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio atmosférico por *Beijerinckia* na rizosfera do capim elefante (*Pennisetum purpureum*) "elefante de pinda". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 11., 1967, Brasília. **Anais...** Brasília: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1971. p. 32-33.

STASKAWICZ, B. J.; AUSUBEL, F. M.; BAKER, B. J.; ELLIS, J. G.; JOHNS, J. D. G. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science**, Washington, v. 268, p. 661-667, 1995.

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Systematic Acquired Resistance. **Phytopathology**, St. Paul, v. 35, p. 235-270, 1997.

SUNDAR, A. R.; VELAZHAHAN, R.; VISWANATHAN, R.; VIDHYASKARAN, P. Induction of active oxygen species (AOS), lipoxygenase and lipid peroxidation in suspension-cultured cells by a glycoprotein elicitor isolated from *Colletotrichum falcatum*. **Journal of Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v. 109, n. 5, p. 441-451, 2002a.

SUNDAR, A. R.; VELAZHAHAN, R.; VISWANATHAN, R. A glycoprotein elicitor isolated from *Colletotrichum falcatum* induces defense mechanisms in sugarcane leaves and suspension cultured cells. **Journal of Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v. 109, n. 6, p. 601-611, 2002b.

UMALI-GARCIA, M.; HUBBELL, D. H.; GASKINS, M. H.; DAZZO, F. B. Association of *Azospirillum* with grass roots. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, p. 219-26, 1980.

POLIDORO, J. C. **O Molibdênio na nutrição nitrogenada e na contribuição da fixação biológica de nitrogênio associada à cultura da cana-de-açúcar.** 2001. 185 p. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

REIS, V. M. **Aspectos ecológicos e fisiologia da bactéria fixadora de N<sub>2</sub> *Acetobacter diazotrophicus*.** 1991. 119 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

REIS, V. M. **Estudo de infecção e métodos de detecção da bactéria endófito *Acetobacter diazotrophicus* em associação com a cana-de-açúcar.** 1994. 213 f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

REIS, V. M.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOLGEL, J.; STROFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

ROACH, B. T.; DANIELS, J. A. Review of the origin and improvement of sugar cane. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1987, Piracicaba. **Anais...** Sao Paulo: COPERSUCAR, 1987. p. 1-33.

ROSSI, M.; ARAÚJO, P. G.; PAULET, F.; GARSMEUR, O.; DIAS, V. M.; CHEN, H.; VAN SLUYS, M. A.; D'HONT, A. Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics**, New York, v. 269, p. 406-419, 2003.

SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D.; PENIDO, E. G. C. *Bacillus azotofixans* sp. nov., a nitrogen-fixing species from Brazilian soils and roots. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 34, p. 451-456, 1984.

## Aspectos Genéticos e Moleculares na Interação entre Organismos Patogênicos e Diazotróficos em Cana-de-açúcar

---

Liamara Perin  
Jean Luís Simões Araújo  
Veronica Massena Reis

### 1. Introdução

---

No Brasil, a cultura da cana-de-açúcar ocupa uma área de mais de 5 milhões de hectares, sendo promissora para a produção de energia e importante economicamente pela geração de empregos. Diversos microrganismos podem estar presentes em plantas de cana-de-açúcar, muitos deles são patógenos e provocam doenças, outros não causam doenças e podem beneficiar a planta pelo controle de patógenos, promoção de crescimento pela Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) ou produção de hormônios. Saber como a planta diferencia estes organismos é importante para obtenção de variedades mais resistentes a doenças e com maiores benefícios das associações. Este documento buscou reunir o conhecimento das vias de sinalização e troca de sinais moleculares envolvendo a colonização das plantas por microrganismos patogênicos e diazotróficos endofíticos. Foi demonstrando o papel ativo e determinante que essa cultura tem na eficiência da associação com microrganismos e que a resposta vegetal é mediada por um complexo sistema de sinalização e de uma grande quantidade de genes, incluindo genes de defesa na planta, ativados a partir da presença de microrganismos. Parte da troca de sinais moleculares que ocorre durante a interação planta-microrganismo tem sido caracterizada em cana-de-açúcar. Nestas plantas, na defesa contra patógenos, receptores específicos da planta reconhecem inúmeros elicitores liberados pelo patógeno, que induzem a expressão de proteínas de defesa nas plantas. Na associação com bactérias diazotróficas, vias de reconhecimento e transdução de sinais semelhantes são utilizados, porém muitos são

exclusivos desta associação e grande parte das seqüências expressas na cana-de-açúcar ainda não possui função conhecida. Diferenças foram observadas na expressão de receptores do tipo quinase, receptores de etileno e genes de glutamina sintetase, e parecem estar envolvidos em melhores contribuições da FBN.

## 2. A cultura da cana-de-açúcar

---

A cana-de-açúcar é cultivada em mais de 130 países, sendo Índia, Cuba e Brasil os maiores produtores mundiais de cana e seus derivados. No caso do Brasil, foi a primeira atividade agrícola e, atualmente, é cultivada em quase todos os estados. Ocupa área de mais de 5 milhões de hectares sendo uma importante cultura para o país em função do complexo agroindustrial que gira em torno do seu cultivo, da quantidade de empregos gerados e por ser promissora para a produção de energia.

Segundo o sistema de classificação botânica, a cana-de-açúcar pertence à divisão *Angiospermae*, classe *Monocotyledonea*, família *Poaceae*, tribo *Andropogonea*, subtribo *Saccharinae*. A subtribo *Saccharinae* possui 10 gêneros, dentre os quais, *Erianthus erundinaceus*, *Miscanthus*, *Sclerostachya*, *Norenga*, *Ripidium* e *Saccharum*, formam um grupo de intercruzamento muito próximo denominado "Complexo *Saccharum*", envolvidos na origem da cana-de-açúcar (ROACH & DANIELS, 1987), constituindo os recursos genéticos básicos da cana-de-açúcar. O gênero *Saccharum* é a base genética das principais espécies cultivadas comercialmente no mundo e compreende 6 espécies: *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*.

Segundo MATSUOKA et al. (1999), nos 3 primeiros séculos de cultivo de cana-de-açúcar no Brasil, predominou a variedade Criola, sendo mais tarde substituída pela Caiana, mais produtiva e com maior teor de açúcar. Com o passar do tempo, novas variedades foram introduzidas tendo seu cultivo encerrado devido uma epidemia de Mosaico na década de 20. Este fato abriu espaço para a entrada das variedades japonesas de sigla POJ e, mais tarde, para variedades importadas de Coimbatore, na Índia. Novamente a ocorrência de doença, desta vez o Carvão, prejudicou as lavouras

PAN, Q.; WENDEL, J.; FLUHR, R. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 51, n. 3, p. 203-213, 2000.

PEDROSA, F. O.; BENELLI, E. M.; YATES, M. G.; WASSEM, R.; MONTEIRO, R. A.; KLASSEN, G.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M.; CHUBATSU, L. S.; RIGO, L. V. Recent developments in the structural organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 189-195, 2001.

PERIN, L. **Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; CABELLOS-AVELAR, T. GUEDES, H. V.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 5, p. 3103-3110, 2006a.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp nov., a novel diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 56, p. 1931-1937, 2006b.

PIÑÓN, D.; CASAS, M.; BLANCH, M.; FONTANIELLA, B.; BLANCO, Y.; VICENTE, C.; SOLAS, M. T.; LEGAZ, M. E. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, a sugar cane endosymbiont produces a bacteriocin against *Xantomonas albilineans*, a sugar cane pathogen. **Research in Microbiology**, Paris, v. 153, p. 345-351, 2001.

O'DONNELL, P.; CALVERT, C.; ATZON, R.; WASTERNAK, L.; LEYZ, H.; BOWLES, D. Ethylene as a signal, mediating the wound response of tomato plants. **Science**, Washington, v. 274, p. 1914-1917, 1996.

OLIVARES, F. L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum***. 1997. 341 p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

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.; FERREIRA, F. P.; SILVA, L. G.; FAÇANHA, A. R.; RAMOS, A. C.; NETTO, A. T.; CAMPOSTRINI, E.; REIS, V. M.; MIGUENS, F. C. Physiological changes induced on the host plant during the endophytic interaction between sugar cane and diazotrophic bacteria. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 9th., 2002, Leuven, Belgium. **Book of abstracts...** Leuven: Katholieke Universiteit / Centre of Microbial and Plant Genetics, 2002. p. 38.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease susceptible and resistant varieties of sugar cane by endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, Oxford, v. 135, p. 723-737, 1997.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E. L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, suppl. 1, p. 59-61, 2003.

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

de cana-de-açúcar e novos genótipos eram necessários. A partir de 1950, as variedades CB, desenvolvidas na Estação Experimental de Campos dos Goytacazes, no estado do Rio de Janeiro, passaram a ser amplamente cultivadas, destacando-se a CB45-3, que mais tarde foi substituída pela variedade importada Na56-79, pelo alto teor de açúcar, precocidade e excelente brotação das soqueiras. A variedade Na56-79 chegou a ocupar 50% da área cultivada com cana-de-açúcar, porém foi substituída devido ao ataque do Carvão, Ferrugem e Raquitismo da Soqueira, tornando as variedades SP, obtidas pelo Programa de Melhoramento da Copersucar, e RB pelo Planalsucar, as mais cultivadas.

Atualmente no Brasil, o principal órgão envolvido na manutenção e continuidade da pesquisa relacionada ao Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar (PMGCA), é a RIDESA (Rede Internuniversitária para o Desenvolvimento Sucroalcooleiro), constituída por sete universidades (UFRPE, UFAL, UFGO, UFV, UFRRJ, UFSCar, UFPR), localizadas onde a cultura da cana-de-açúcar apresenta maior expressão. Em 14 anos de atuação, a rede já liberou 13 variedades para a região Norte e Nordeste e 17 variedades para as outras regiões.

### **3. Patógenos em cana-de-açúcar**

---

No Brasil, diversos tipos de patógenos podem atacar a cultura da cana-de-açúcar, podendo reduzir drasticamente sua produção. O Vírus do Mosaico da cana-de-açúcar foi introduzido no país por volta da década de 1920. Entre os anos de 1922 e 1925, o Brasil passou de uma produção de 1250 mil sacas de açúcar para uma produção de 220 mil e de seis milhões de litros de álcool para apenas dois milhões (MORAIS, 2003).

Vários fungos podem causar doenças como a ferrugem, provocada por *Puccinia melanocephala*, fusariose e podridão do colmo por *Gibberella moniliformis*, podridão das raízes por *Pythium* e carvão, por *Ustilago scitaminea*, que chegou a atingir 100% das touceiras plantadas com as variedades POJ36 e POJ213 no Estado de São Paulo, durante a década de 40 (BERGAMIN-FILHO et al., 1995).

Diversos nematóides atacam a cana-de-açúcar, dentre eles estão os causadores de galhas em raízes (*Melodogyne javanica*, *M. icognita*, *M. arenaria*), os migradores (*Pratylenchus brachyurus*) e os anelados (*Criconemoides* spp.), dentre outros. O combate a nematóides pode resultar em um aumento de até 42% na produtividade de cana, por hectare plantado (LORDELLO, 1992).

Dentre as bactérias encontra-se

HEATH, M. The role of gene-for-gene interaction in the determination of host species specificity. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, n. 2, p. 127-130, 1991.

HENTSCHEL, U.; STEINERT, M; HACKER, J. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. **Trends in Microbiology**, London, v. 8, n. 5, p. 226-231, 2000.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 17, p. 77-119, 1998.

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 785-797, 1997.

JAMES, G. A review in ratoon stunting disease. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 98, p. 532-541, 1996.

KUC, J. Compounds from plants that regulate or participate in disease resistance. **Ciba Foundation Symposium**, v. 154, p. 213-224, 1990.

LADHA, J. K.; BARRAQUIO, W. L.; WATANABE, I. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, p. 1301-1308, 1983.

LAMBAIS, M. R. Regulation of plant DR genes in arbuscular mycorrhizae. In: PODILA, G.K.; DOUDS JR., D. D. (ed.). **Current advances in mycorrhizae research**. New York: APS, 2000. p. 45-59.

LAMBAIS, M. R. In silico differential display of defense-related expressed sequence tags from sugarcane infected with diazotrophic endophytes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1-4, p. 103-111, 2001.

patógeno em outros órgãos da planta, protegendo-a contra ataques subsequentes.

A resistência localizada, reconhecida pela reação de hipersensibilidade (RH), provoca morte das células situadas nos locais onde o agressor entra no vegetal. Com isso, a planta impede o acesso do patógeno às células vizinhas, limitando a abrangência da infecção. Os aspectos fisiológicos da RH incluem aumento rápido de agentes oxidantes, perda de íons potássio e ganho de íons hidrogênio, espessamento da parede celular e da cutícula, além de síntese de toxinas e proteínas relacionadas à defesa vegetal.

Já a SAR protege a planta, contra novos ataques de um mesmo patógeno. A resistência só acontece se a planta perceber a presença do agressor e transmitir sinais que ativam mecanismos de defesa.

A primeira etapa, das muitas que compõem a resposta de defesa da planta a um indutor, é o reconhecimento de compostos chamados de elicitores. Elicitores são moléculas que estimulam a resposta de defesa na planta. São substâncias necessárias para o metabolismo normal do patógeno e devido a evolução dos mecanismos de defesa do hospedeiro, eles passaram a detectar essas substâncias e assim, induzir resposta aos patógenos. O elicitador pode ser um produto químico como o ácido salicílico, um patógeno avirulento, parte de um patógeno como uma glicoproteína ou carboidrato, ou organismo não patogênico (STICHER et al., 1997; SHEWRY & LUCAS, 1997).

Segundo KUC (1990), além da morte por RH, outros mecanismos de defesa podem ser induzidos, como:

1. Produção de espécies ativas de oxigênio (EAO), como  $O_2$  e  $H_2O_2$ , que são tóxicas para os patógenos e podem ativar genes de defesa. Também  $H_2O_2$  pode se ligar a glicoproteínas de parede celular e ativar a síntese de lignina;
2. Produção de óxido nítrico que inibe catalase e ascorbato peroxidase, levando ao aumento de EAO, induzindo a morte celular e/ou genes de resistência;

3. Formação de estruturas de resistência na parede celular como papilas de calose e lignina;
4. Tradução de sinais secundários, como ácido benzóico, ácido salicílico, jasmonato e etileno, induzindo genes de resistência localizada e sistêmica;
5. Síntese de fitoalexinas com propriedades antimicrobianas;
6. Síntese de enzimas que degradam patógenos como quitinase,  $\beta$  1,3 glucanase e proteases.

Genes de resistência (R) representam o principal mecanismo genético que permite às plantas se defender de determinados patógenos. Os genes R são responsáveis pela defesa específica da planta contra o ataque de um determinado patógeno. Eles iniciam esta defesa reconhecendo a presença do produto da expressão de um gene de avirulência (*avr*) presente no patógeno. A esta interação entre os produtos do gene R e do gene *avr* dá-se o nome de interação gene-a-gene. Em muitos casos, esta pode ser seguida por uma reação hipersensitiva (RH), a qual resulta em um rápido colapso do tecido infectado (STASKAWICZ et al., 1995).

O primeiro gene envolvido na interação gene-a-gene descoberto foi o gene *Pto*, que confere ao tomate resistência contra a bactéria *Pseudomonas syringae*, a qual possui o gene *avrPto* (MARTIN et al., 1993). Diversos genes R já foram isolados e classificados de acordo com suas seqüências nucleotídicas ou através de seus domínios conservados (ELLIS et al., 2000).

Os genes R são muito conservados, em contraste com a grande diversidade de produtos dos genes *avr*, podendo ser classificados em 3 grupos baseados em seus domínios conservados. O maior grupo codifica repetições ricas em leucina (Rich Repetitions in Leucine - RRL), que se subdivide em 2 classes baseadas na natureza da região N terminal em LRR-TIR (Toll Interleukin Receptor-like), que possui similaridade com genes que participam da resposta imune inata de animais. Esta subclasse está amplamente distribuída entre as dicotiledôneas, no entanto, até o momento nenhuma seqüência semelhante foi encontrada em monocotiledôneas, sugerindo que o domínio TIR tenha surgido

DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 251-258, 1959.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, Lisboa, v. 1, p. 261-272, 1958.

DONG, Z.; CANNY, M. J.; MCCULLY, M. E.; ROBOREDO, M. R.; CABADILLA, C. F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: A new role for the apoplast. **Plant Physiology**, Washington, v. 105, p. 1139-1147, 1994.

DONG, Z.; MCCULLY, M. E.; CANNY, M. J. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Some anatomical and physiological data. **Annals of Botany**, London, v. 80, p. 147-58, 1997.

ELLIS, J.; DODDS, P.; PRYOR, T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 278-284, 2000.

FONTANIELLA, B.; MÁRQUEZ, A.; RODRÍGUES, C. W.; PIÑON, D.; SOLAS, M. T.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. A role for sugarcane glycoproteins in the resistance of sugarcane to *Ustilago scitaminea*. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 40, p. 881-889, 2002.

FRANÇA, S. C.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M. A.; PUGA, R. D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J. O. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Prato, v. 24, n. 1-4, p. 243-250, 2001.

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; JIMENEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I. R.; CABALERO-MELLADO, J. *Acetobacter diazotrophicus* a endolactic producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 154, p. 145-150, 1993.

GRACIOLLI, L. A.; FREITAS, J. R.; 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, 1983.

BODDEY, L. H.; DART, P.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I. Ocorrência de bactéria diazotróficas endofíticas no cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23., REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7., SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5., REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., 1998, Caxambu. **Resumos...** Lavras: UFLA / SBCS / SBM, 1998. FERTBIO 98.

BORRÁS-HIDALGO, O.; THOMMA, B. P. H. J.; CARMONA, E.; BORROTO, C. J.; PUJOL, M.; ARENCIBIA, A.; LOPEZ, J. Identification of sugarcane genes induces in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilagos scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Kalyani, v. 43, p. 1115-1121, 2003.

BOWER, N. I.; CASU, R. E.; MACLEAN, D. J.; REVERTER, A.; CHAPMAN, S. C.; MANNERS, J. M. Transcriptional response of sugarcane roots to methyl jasmonate. **Plant Science**; an International Journal of Experimental Plant Biology, Limerick, v. 168, p. 761-772, 2005.

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., in N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophy species. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 54, p. 1165-1172, 2004.

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

CONTESSOTTO, M. G. G.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; MARIANI, P. D. S. C.; COUTINHO, L. L. A new member of the chacone synthase (CHS) family in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1-4, p. 257-261, 2001.

durante a evolução divergente das 2 classes de Angiospermas. O segundo grupo apenas codifica proteínas com LRRs e o terceiro grupo apresenta uma serina-treonina-quinase (PAN et al., 2000).

#### **4. Aspectos genéticos e moleculares envolvidos na resposta da cana-de-açúcar à presença de organismos patogênicos**

---

Pouco se sabe sobre a atuação da planta na defesa contra patógenos. Porém, estudos recentes mostraram que a planta tem papel ativo no reconhecimento de elicitores produzidos por patógenos e na indução da expressão de genes de defesa.

O projeto genoma da cana-de-açúcar, desenvolvido pelo consórcio entre a rede ONSA (Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis) e o SUCEST (Sugarcane Expressed Sequence Tag Project), sequenciou ESTs (Expressed Sequences Tags) ou Etiquetas de Sequências Expressas, de diferentes órgãos e tecidos, em diferentes estágios de desenvolvimento (VETTORE et al., 2001).

Nas bibliotecas do SUCEST foram encontrados 88 genes análogos a genes de resistência, com representantes nos 3 grupos de genes R (ROSSI et al., 2003). Em outro trabalho de busca e descrição de genes de resistência (R), foi observado que a maior similaridade dos genes de resistência expressos em cana-de-açúcar, foram com a dicotiledônea *Arabidopsis thaliana* e com a monocotiledônea arroz, 63% e 23%, respectivamente (MORAIS, 2003). Com exceção da classe das redutases, todas as outras classes de genes R foram encontradas e em todas as bibliotecas construídas. No entanto, sua presença foi maior nas bibliotecas construídas a partir de plantas novas e tecidos de flores (27,1%), raízes (13,1%) e o meristema apical com 11,1% dos genes expressos. Nas bibliotecas infectadas, AD1 (plantas inoculadas com a bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus*, antiga *Acetobacter diazotrophicus*) teve expressão de 6,5% de todos os genes R encontrados no genoma da cana-de-açúcar e a biblioteca HR (plantas inoculadas com a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum rubrisubalbicans*), apenas 2,6% dos genes expressos.

#### 4.1 Produção de elicitores

Foram detectados elicitores, que induzem proteínas de defesa em plantas, na variedade Janoru 60-5, cultivada em Cuba, após a inoculação do fungo *Ustilago scitaminea*, causador da doença chamada carvão. Também foi observado que o micélio *in vitro*, excretou outro elicitor, o ácido salicílico (FONTANIELLA et al., 2002). Glicoproteínas foram produzidas na variedade Mayarí, também cultivada em Cuba, após inoculação do fungo *U. scitaminea*, onde sintomas de doença não apareceram, e verificou-se que este elicitor provoca adesão e inibe a germinação de esporos (MILLARES et al., 2005).

Glicoproteínas também foram isoladas de micélio do fungo *Colletotrichum falcatum*, patógeno em cana-de-açúcar. Este elicitor induziu a atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL) e peroxidase em folhas de variedades resistentes e suscetíveis (SUNDAR et al., 2002a), porém a ativação de espécies oxidativas foi mais rápida na espécie resistente e mais lenta na suscetível (SUNDAR et al., 2002b).

Plantas doentes e infectadas com *C. falcatum*, quando inoculadas com um isolado de *Pseudomonas* spp., induziram SAR pelo aumento no nível de peroxidase e PAL nas plantas (VISWANATHAN & SAMIYPPAN, 2002). VISWANATHAN et al. (2005), mostraram que em variedade suscetível ao fungo apenas uma proteína do tipo quinase foi expressa, enquanto que em variedade resistente, 4 proteínas foram expressas, possivelmente associadas à defesa da planta.

O jasmonato é um importante hormônio elicitor que provoca reação de defesa em plantas. A aplicação de jasmonato em raízes de cana-de-açúcar, variedade Q117 resultou na indução de 21 ESTs e redução na expressão de 23 ESTs, todos relacionados com defesa vegetal (BOWER et al., 2005). Entre os genes induzidos, a maioria está relacionada com patogenicidade e glutamina-S-transferase. As ESTs que tiveram expressão reduzida na presença de jasmonato, a maioria tem função desconhecida e outras induzem proteínas relatadas com patogenicidade, lipoxigenase e chalcona sintase.

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

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.

BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R.; BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 e A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**; an International Journal on Natural and Synthetic Regulations, The Hague, v. 24, p. 7-11, 1998.

BERGAMIN-FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Importância das doenças de plantas. In: \_\_\_\_\_. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Ceres, 1995. p. 13-31.

BLANCO, Y.; BLANCH, M.; PIÑON, D.; LEGAZ, M. E.; VICENTE, C. Antagonism of *G. diazotrophicus* (a sugarcane endosymbiont) against *X. albilineans* (pathogen) studied in alginate-immobilized sugarcane stalk tissues. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 99, n. 4, p. 366-371, 2005.

BODDEY, L. H. **Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas do gênero Burkholderia, isoladas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) cultivadas na Austrália e no Brasil**. 2003. 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

## 7. Considerações finais

---

Microrganismos patogênicos e simbiotes possuem a planta como hospedeiro alvo. Enquanto as interações patogênicas resultam em danos ou morte do hospedeiro, as interações simbióticas são caracterizadas por benefícios para ambas as partes envolvidas e acredita-se que os mecanismos moleculares que regulam interações patogênicas e simbióticas sejam os mesmos (HENTSCHEL et al., 2000).

Em cana-de-açúcar alguns sinalizadores são os mesmos, porém diferenças foram observadas na expressão de receptores do tipo quinase, receptores para etileno e genes de glutamina sintetase. Estas moléculas parecem estar associadas a melhores contribuições da FBN. Também nas associações com bactérias diazotróficas endofíticas, um grande número de genes induzidos possuem função desconhecida, mostrando que o estudo deste tipo de interação é um campo com grande potencial para a descoberta de novos genes.

Um melhor entendimento dos genes da planta, envolvidos nas vias de sinalização e defesa, poderiam aumentar as possibilidades de manipulação para a obtenção de variedades mais produtivas, pela otimização direta da associação planta/diazotrófico ou através do controle de patógenos. O sequenciamento da bactéria endofítica *G. diazotrophicus*, que apresenta resultados positivos de inoculação na cana-de-açúcar, está em fase final de execução e poderá auxiliar no entendimento desta associação, levando a melhor exploração da FBN nesta cultura.

## 8. Referências Bibliográficas

---

ASH, C.; PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Antonie van Leeuwenhoek**; Journal of Microbiology and Serology, Delft, v. 64, p. 253-260, 1993.

Um estudo (BORRÁS-HIDALGO et al., 2003), avaliou as variedades JaS44 e Ja60-5, resistente e suscetível, respectivamente a *Ustilago scitaminea* e as variedades CC54-84 e C87-51, resistente e suscetível, respectivamente a *Bipolaris sacchari*. A expressão dos genes foi avaliada por cDNA-AFLP e variações foram observadas. Foram obtidos 595 fragmentos, sendo 62 diferentemente expressos. Destes, 10 tiveram expressão reduzida e 52 foram induzidos pelos patógenos. Dos 52 fragmentos induzidos, 32 foram expressos na variedade JaS44, resistente a *U. scitaminea* e 20 na variedade CC54-84 resistente a *B. sacchari*, sendo todos seqüenciados para identificar sua função. Dos 52 fragmentos induzidos, 19 estiveram relacionados com defesa e transdução de sinais e o restante apresentou função ainda desconhecida.

Os dados apresentados mostram que as plantas respondem à presença de patógeno, reconhecendo-o e ativando proteínas de defesa e estas respostas são diferentes em plantas resistentes e suscetíveis.

## 5. Bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar

---

Diversas bactérias diazotróficas foram localizadas na rizosfera e colonizando o interior de tecidos das plantas de cana-de-açúcar. Ao longo de diversos anos de estudo, foram descritos inúmeros gêneros de bactérias e já há bastante conhecimento sobre a ecologia, fisiologia e genética desses microrganismos. Além disso, inúmeros experimentos foram conduzidos para avaliar a contribuição desses microrganismos no crescimento vegetal.

Análise de amostras de solos de canaviais de diferentes regiões do Brasil levou ao isolamento do gênero *Beijerinckia* e descrição de uma nova espécie, *B. fluminensis* (DÖBEREINER & RUSCHEL, 1958). Esta espécie ocorreu predominantemente em solos cultivados com cana-de-açúcar (DÖBEREINER, 1959), e parece ter influência da planta no desenvolvimento da bactéria. Estudos posteriores isolaram, na rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, outras bactérias como *B. indica* (SOUTO & DÖBEREINER, 1971), *Klebsiela* (GRACIOLLI et al., 1983), *Enterobacter* (LADHA et al., 1983), *Bacillus azotofixans* (SELDIN et al., 1984), reclassificado

para *Paenibacillus azotofixans* (ASH et al., 1993) e *Azospirillum amazonense* (BALDANI et al., 1997).

As bactérias diazotróficas de vida livre e rizosféricas foram consideradas menos importantes quando se descobriu que o interior das plantas abrigava um grande número de bactérias diazotróficas. Estudos posteriores mostraram que estes organismos possuem maior capacidade de contribuição no crescimento vegetal que as bactérias rizosféricas. Foram denominados endofíticos e despertou bastante interesse mundial. O termo endofítico refere-se à colonização de plantas por microrganismos que não causam danos ao hospedeiro e vivem as maiores partes de sua vida dentro dos tecidos da planta sem emitir nenhum sintoma de patogenicidade (BALDANI et al., 1997).

A capacidade de colonizar o interior das plantas pode conferir vantagem ecológica sobre as bactérias rizosféricas. A capacidade de colonizar nichos específicos no interior dos tecidos das plantas permite que estas bactérias estejam protegidas das altas taxas de oxigênio, que inibem a enzima nitrogenase, tendo acesso facilitado e sem competição a fontes de carbono. Além de serem beneficiadas, as bactérias podem contribuir pela fixação do nitrogênio atmosférico diretamente nos tecidos das plantas.

Na cultura da cana-de-açúcar, encontram-se frequentemente bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia*.

*G. diazotrophicus* é a espécie mais estudada em associação com cana-de-açúcar. Apresenta distribuição ampla e, além de fixar nitrogênio atmosférico, produz hormônios de crescimento como AIA e giberelina (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993; BASTIÁN et al., 1998) e atua em controle biológico (PIÑON et al., 2001). Foi isolada de raízes e parte aérea de cana-de-açúcar cultivada nos estados de Alagoas, Pernambuco e Minas Gerais, no Brasil (CAVALCANTE & DÖBEREINER, 1988). Ao longo dos anos de estudo, foi encontrada em altos números e isolada de raízes, colmos, palhiço, solo da rizosfera e seiva xilemática de cana-de-açúcar no Brasil (REIS, 1991; PERIN, 2003) e inúmeros outros países.

bactéria age contra o patógeno pela produção de uma bacteriocina. O controle desta doença em plantas inoculadas foi observado (VINAGRE, 2005) em estudo onde toletes com sintomas de escaldadura foliar foram postos para germinar e inoculado ou não com *G. diazotrophicus*. Este tratamento recebeu nome de curativo. No tratamento preventivo, os toletes foram inicialmente inoculados com *G. diazotrophicus* e depois com *X. albilineans*. Foi observado que as plantas com tratamento curativo apresentaram menos sintomas de doença se comparado ao controle negativo (não inoculado com *G. diazotrophicus*) e 30 dias depois desapareceram os sintomas, mas o tratamento mais eficiente foi o preventivo, onde as plantas não apresentaram sintomas de doença.

Foi extraído RNA das plantas com ambos os tratamentos e feito AFLP com o cDNA. Foram obtidos 47 fragmentos diferencialmente expressos, 27 deles expressos apenas nas plantas com tratamento preventivo, sendo que neste tratamento os fragmentos induzidos apareceram mais cedo, indicando que em contato com a bactéria diazotrófica, a planta ativa mecanismos de defesa, reagindo com mais rapidez quando for atacada por patógenos.

A maioria dos fragmentos amplificados no tratamento preventivo não apresentou homologia com genes de função conhecida, sendo que 26% foram relacionados à via de sinalização do etileno, 9% apresentaram homologia com proteínas reguladas pelo hormônio auxina e 6% foram homólogas a  $\beta$ -1,3-glucanase, uma proteína que atua na defesa contra patógenos durante a resistência sistêmica adquirida (SAR). Estes dados reforçam a hipótese de LAMBAIS (2001), que sugeriu que *G. diazotrophicus* pode ativar a SAR nas plantas. Os dados citados acima, onde no tratamento em que *G. diazotrophicus* controlou *X. albilineans* apresentando grande número de fragmentos relacionados ao etileno, levou VINAGRE (2005) a sugerir que a bactéria diazotrófica deixa o sistema de defesa da planta mais preparado para a defesa contra patógenos. E quando a SAR é ativada numa planta ela desenvolve resistência a inúmeros patógenos por certo período de tempo.

Foi observado também que quando diferentes variedades de cana-de-açúcar foram inoculadas com bactérias patogênicas, não houve diminuição da expressão de HSR5, indicando que a modulação da expressão deste gene está diretamente associado a presença de bactérias diazotróficas benéficas (Figura 3).

## 6.2. Glutamina sintetase

Nas plantas a maior rota envolvendo a assimilação de nitrogênio é o ciclo da glutamina sintetase (GS), que catalisa a conversão de nitrogênio inorgânico (amônio) para forma orgânica (glutamina). Em buscas no banco de dados do SUCEST, foram encontrados 5 genes da família GS. A partir disso, plantas micropropagadas das variedades SP70-1143 (alta contribuição da FBN) e Chunne (baixa contribuição da FBN) foram cultivadas com diferentes doses de nitrogênio e os genes foram amplificados por RT-PCR (NOGUEIRA et al., 2005).

Dos genes expressos, foi observado que sc.GS1.b, tem alta expressão nas folhas da variedade SP70-1143 e menor em Chunne e também é induzido ou reprimido na presença ou retirada de amônio, respectivamente, mas apenas na variedade SP70-1143 e não em Chunne, ambas sem bactéria, indicando que pode estar relacionado com melhor assimilação de nitrogênio. Já, sc.GS1.a, tem expressão aumentada na ausência de amônio em SP70-1143 com e sem bactéria e não altera em Chunne, podendo estar relacionado com a FBN, sendo que este gene responde por 83% dos genes da família GS expressos no banco de dados do SUCEST.

Estes resultados sugerem que variedades de cana-de-açúcar com altas contribuições da FBN podem estar associadas a mecanismos de assimilação de N mais eficientes, resultando em melhor assimilação do N, seja ele do solo ou da FBN.

## 6.3. Atuação de *G. diazotrophicus* no controle de *X. albilineas*

A atuação de *G. diazotrophicus* no controle de *Xantomonas albilineas*, responsável pela doença escaldadura foliar, já foi observada em Cuba (PIÑON et al., 2001), indicando que esta

*H. seropedicae* foi isolada de raízes, folhas e colmos de cana-de-açúcar cultivada no Brasil (BALDANI et al., 1996), e na Austrália (BODDEY et al., 1998). *H. rubrisubalbicans* tem sido encontrada em associação com cana-de-açúcar e raiz da planta *Digitaria insularis*, crescida no interior da plantação de cana-de-açúcar (OLIVARES et al., 1996).

Recentemente, bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* foram encontradas em associação com cana-de-açúcar e duas novas espécies foram descritas. *B. unamae* (CABALLERO-MELLADO et al., 2004), isolada também de café e milho de diferentes lugares do México e *B. tropica* (REIS et al., 2004), isolada de plantas de cana-de-açúcar no Brasil e África do Sul, de solo nos EUA e de milho no México, onde tem maior ocorrência (PERIN et al., 2006a).

Em cultivos comerciais de cana-de-açúcar nos estados do PR, SP, RJ e PE, no Brasil, os isolados obtidos foram muitos diferentes entre si e um grupo foi identificado como nova espécie, nomeada *B. silvatlantica* (PERIN et al., 2006b). Inúmeros isolados das espécies *B. tropica*, *B. kururiensis* e *B. caribensis* foram isoladas de amostras de cultivares de canas-de-açúcar brasileiras e australianas (BODDEY, 2003).

## 5.1. Estabelecimento endofítico de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar

Em geral a maioria dos endofíticos que colonizam gramíneas sem produzir sintomas de doença, não se acumula dentro do xilema da planta em quantidades suficientes para provocar resposta de defesa do hospedeiro e diferente da colonização de bactérias diazotróficas em plantas leguminosas, em gramíneas as bactérias permanecem fora da célula (JAMES et al., 1997).

Avaliando trabalhos na literatura relacionados aos sítios de infecção da planta por bactérias diazotróficas endofíticas em *Poaceas*, observa-se que as bactérias possuem penetração passiva na planta, acessando o seu interior através de sítios de emergência de raízes laterais, feridas no tecido radicular, na região do meristema radicular atrás da coifa e através dos estômatos em folhas (OLIVARES et al., 1997; JAMES & OLIVARES, 1998; JAMES et al., 1997). Com a

penetração da bactéria nos tecidos da planta, inicia-se o processo de colonização.

Isolados do gênero *Azospirillum* diferem quanto ao seu habitat preferencial, alguns são rizosféricos enquanto outros se estabelecem no interior das plantas. Essa bactéria pode apresentar um mecanismo ativo para a infecção devido atividade pectinolítica, no qual a bactéria degrada a lamela média da camada de células epidérmicas penetrando no interior da raiz (UMALI-GARCIA et al., 1980). Coloniza os espaços intercelulares das células da epiderme e do córtex radicular na zona de alongamento e formação de pêlos radiculares, sem penetrar na endoderme ou tecido vascular das raízes (OLIVARES, 1997).

*G. diazotrophicus* já foi localizada nos espaços intercelulares das raízes, nos vasos do xilema na região da base do colmo (JAMES & OLIVARES, 1998) e foi isolada do fluido xilemático, extraído a vácuo em toletes de cana-de-açúcar (REIS, 1994) e do fluido apoplástico de células do córtex (DONG et al., 1994, 1997).

A colonização por *H. seropedicae* é muito similar à *G. diazotrophicus*, porém *H. seropedicae* adere ao longo de toda a raiz e a invasão acontece, principalmente, nas junções das raízes secundárias, onde as bactérias atravessam os espaços intercelulares e colonizam o xilema (OLIVARES, 1997). Este autor mostrou também, através de inoculação artificial de folhas de cana-de-açúcar com *H. seropedicae*, que a bactéria não se espalha dentro dos vasos de xilema, mas permanece localizada nos pontos de inoculação.

Diferentemente de *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* pode penetrar nas plantas pelas aberturas estomáticas nas folhas (OLIVARES et al., 1997). Esta bactéria foi encontrada no meta e protoxilema, e no caso da variedade B4362, suscetível à estria mosqueada, *H. rubrisubalbicans* bloqueia completamente alguns vasos do xilema e coloniza os espaços intercelulares do mesófilo foliar. Já, na variedade resistente SP70-1143, a bactéria também coloniza o xilema, mas de uma forma mais controlada, formando grupos de 10 a 20 células, envolvidas por material fibrilar e sintetizadas provavelmente pela planta. E em plantas inoculadas *in*

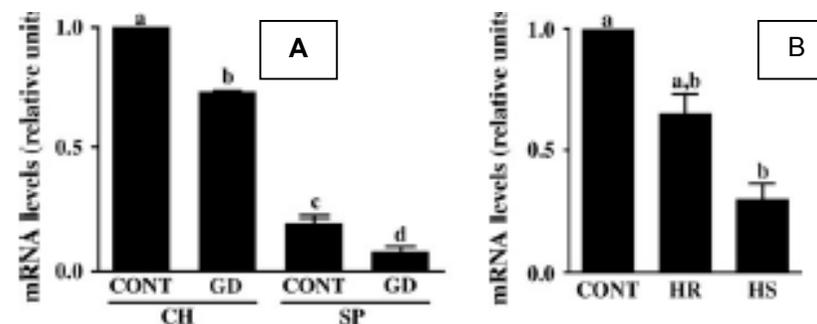


Figura 2: Expressão do gene *SHR5* em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. Figura A: Níveis de expressão do gene *SHR5* nas variedades Chunne (CH) e SP70-1143 (SP), não inoculadas (CONT) e inoculadas com *G. diazotrophicus* (GD). Figura B: Níveis de expressão do gene *SHR5* na variedade B4362 não inoculada (CONT) e inoculada com *H. rubrisubalbicans* (HR) e *H. seropedicae* (HS). Fonte: VINAGRE et al., 2006.

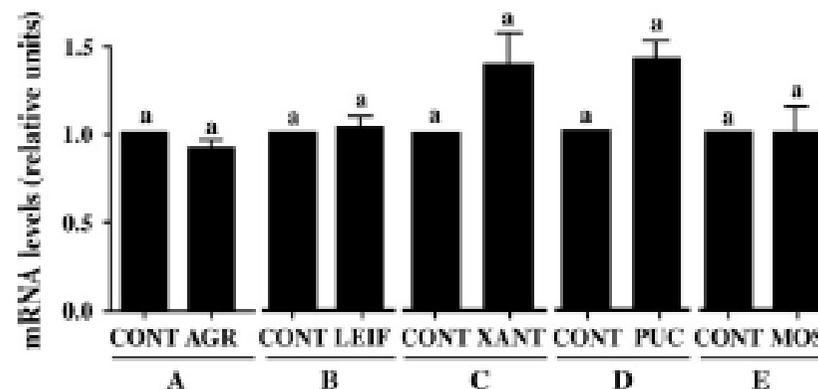


Figura 3: Expressão do gene *SHR5* em resposta a interações patogênicas. A: variedade SP70-1143 livre de microrganismos (CONT) e inoculada com *Agrobacterium tumefaciens* (AGR); B: variedade SP70-3370 livre de microrganismos (CONT) e inoculada com *Leifsonia xyli subs. xyli* (LEIF); C: variedade SP80-1842 livre de microrganismos (CONT) e inoculada com *Xanthomonas albilineans* (XANT); D: variedade SP71-799 livre de microrganismos (CONT) e inoculada com *Puccinia melanocephala* (PUC); E: variedade SP86-155 livre de microrganismos (CONT) e inoculada com o vírus do mosaico (MOS). Fonte: Vinagre et al., 2006.

condições testadas. A expressão de *erad1*, um receptor de etileno, foi significativamente induzida durante a associação com bactérias diazotróficas endofíticas e drasticamente reprimida em associações patogênicas (VARGAS et al., 2005, citado por VINAGRE, 2005).

### 6.1. Receptores do tipo quinase

Foi mostrado que o reconhecimento de vários sinais microbianos é mediado por receptores do tipo quinase, que induzem eventos de fosforilação e desfosforilação, resultando na amplificação do sinal e ativação ou repressão de genes, que reconhecem seqüências específicas de DNA que codificam para genes de defesa em plantas (MORAIS, 2003).

Diversos experimentos têm sido realizados na busca da identificação de vias que participam da sinalização da interação entre cana-de-açúcar e bactérias endofíticas. Utilizando cDNA AFLP, foi identificado um Fragmento Derivado da Transcrição (FDT) (VINAGRE, 2001). A partir desse FDT foi possível o isolamento do gene denominado SHR5, membro da família de receptores do tipo quinase, e foi observado que os níveis de RNAm de SHR5 diminuíram em plantas da variedade SP70-1143 associadas as bactérias dizotróficas PAL5, HCC103, HRC54 e Sp245, inoculadas na variedade SP70-1143. Já quando HCC103, de *H. rubrisubalbicans*, foi inoculado na variedade suscetível B4362 não ocorreu diminuição da expressão.

A FBN foi avaliada em genótipos com diferentes contribuições (VINAGRE et al., 2006), e verificaram que em ambos, SP70-1143 e Chunne, a população de bactérias diazotróficas, estimada pela técnica do Número Mais Provável não mostrou diferenças, já a expressão de SHR5 foi reprimida em ambas, porém muito mais reprimida em SP70-1143. Na variedade B4362 quando inoculada com *H. seropedicae*, que não é patógeno, teve a expressão do gene diminuída, enquanto que quando inoculada com *H. rubrisubalbicans*, não ocorreu diminuição na expressão (Figura 2). Isso sugere que as variedades de cana-de-açúcar se adaptaram para receber populações de bactérias endofíticas benéficas, porém alguma com mais eficiência que outras.

*vitro*, *H. rubrisubalbicans* colonizou amplamente a parte aérea da planta em comparação à *H. seropedicae*, que ficou restrita às raízes (VINAGRE, 2001).

### 5.2. Contribuição de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar

No Brasil, dois estudos clássicos, usando a técnica de diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$ , foram importantes para mostrar a contribuição da FBN à cultura. Os primeiros estudos de quantificação da FBN foram conduzidos ao ar livre, em potes contendo solo enriquecido com  $^{15}\text{N}$  (LIMA et al., 1987). Neste ensaio foram testadas 4 variedades e apenas 2 apresentaram resultados positivos, das quais a mais promissora, CB47-89, 60% do nitrogênio necessário para a cultura veio da FBN. Em tanque de concreto, também com solo marcado com  $^{15}\text{N}$  e *Brachiaria erecta* como controle negativo, foi avaliada a FBN em mais 10 variedades de cana-de-açúcar por 3 anos. Novamente, foi observada variação de resposta e a variedade SP70-1143 foi a mais promissora, recebendo da FBN, 70% do nitrogênio presente em seus tecidos e, como no caso anterior, decresceu ao longo dos anos (URQUIAGA et al., 1992).

Um levantamento da contribuição da FBN na cultura da cana-de-açúcar foi feito em áreas de produção nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Pernambuco (POLIDORO, 2001). Inúmeras variedades foram analisadas pela técnica de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  e plantas espontâneas foram usadas como controle negativo. Foi observada contribuição da FBN em torno de 30%, com variação de 0 a 60% e as variedades RB72-454 e SP80-1842 apresentaram os melhores resultados.

Experimentos de inoculação em casa de vegetação e campo foram conduzidos, mas nenhum alcançou os melhores resultados observados pela colonização natural nos experimentos citados acima. A inoculação com as estirpes BR11175 (Z67) e BR 11335 (HRC54) de *H. seropedicae* em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar da variedade CB 45-3, mostraram incremento significativo no acúmulo de massa fresca de raízes e parte aérea aos 24 dias após a inoculação e massa fresca de parte aérea aos 64 dias após a inoculação (OLIVARES, 1997). A inoculação de *H. seropedicae*

estirpe BR11335 (HRC54) e *G. diazotrophicus* estirpe BR11281 (PAL 5), na variedade RB 72-454, estimulou a atividade da H<sup>+</sup> ATPase, provocou mudanças morfológicas radiculares e incremento de nutrientes na fase inicial do estabelecimento, e *H. seropedicae* contribuiu para o incremento da biomassa radicular, área foliar, conteúdo de clorofila e conteúdo de nutrientes (OLIVARES et al., 2002).

Em vasos com solo, foram inoculadas as estirpes BR11281 (PAL5) de *G. diazotrophicus*, BR11145 (CBAmC) de *A. amazonense*, BR11335 (HRC54) de *H. seropedicae*, BR11504 (HCC103) de *H. rubrisubalbicans* e BR11366 (PPe8) de *B. tropica*, sozinhas e com diferentes combinações, na variedade micropropagada SP70-1143. Após 400 dias, foi observado um melhor desenvolvimento com a inoculação conjunta de todas as espécies e a FBN contribuiu com 30% do nitrogênio da planta (OLIVEIRA et al., 2002). Esta mesma mistura de bactérias foi inoculada nas variedades SP70-1143 e SP81-2350, em condições de campo e avaliadas 16 meses após a inoculação. Foi observado que a FBN variou de - 4,5 a 31,4%, sendo maior em solo de baixa fertilidade. Pequenos aumentos no peso dos colmos foram observados na variedade SP70-1143, nos solos com baixa e média fertilidade. Já SP81-2350, apresentou decréscimo de produtividade nos 3 tipos de solos testados (OLIVEIRA et al., 2003).

Atualmente estima-se que a FBN associada ao cultivo da cana-de-açúcar no Brasil, gera economia de N-fertilizante equivalente a US\$ 200 milhões, além de contribuir para a conservação do meio ambiente (URQUIAGA et al., 2005). Porém, vários fatores podem interferir na FBN, como: tipo de solo, manejo da cultura e genótipo da bactéria e da planta. Ao longo dos anos de estudo foi observada contribuição variável das bactérias diazotróficas e, até o momento, não se sabe ou não se conhece qual organismo é responsável pela FBN. As variações observadas na contribuição da FBN apontam que as plantas agem ativamente na associação e o melhor entendimento desta relação é importante para explorar melhor o sistema.

A expressão de 124 ESTs sofreu alteração em plantas infectadas em relação as não infectadas. Aproximadamente 42% não apresentaram diferença de expressão em tecidos infectados, enquanto 15 e 3% foram suprimidos em mais de 2 vezes e 14 e 8% apresentaram indução superior a 2 vezes nos tecidos infectados com *G. diazotrophicus* e *H. rubrisubalbicans*, respectivamente. Sugerindo novamente resposta diferenciada da planta para estes 2 organismos, sendo que na presença de *G. diazotrophicus* a planta suprime e induz mais genes.

Genes de resistência a patógenos são induzidos em tecidos infectados, indicando que um sistema de defesa da planta é ativado durante a interação. Foi observado que ocorreu indução na expressão de chalcona sintase e a maioria dos genes que codificam para esta enzima, que ativa a defesa de vegetais em casos de estresses (FRANÇA et al., 2001), são similares a uma chalcona induzida por patógenos em sorgo (CONTESSOTTO et al., 2001). Foi encontrada indução de ESTs que codificam para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na biblioteca AD1 e supressão destes na biblioteca de HR1 (LAMBAIS, 2001). Como esta substância é candidata a indutora de genes de resistência adquirida (SAR), o autor sugeriu que no primeiro caso pode correr resistência sistêmica adquirida e no segundo caso, com HR1, ocorra resistência localizada.

O projeto genoma da cana-de-açúcar permitiu estudos iniciais sobre a interação planta/microrganismos. Porém somente 2 bibliotecas com bactérias diazotróficas foram geradas e apenas a variedade SP70-1143 foi usada para este estudo, dificultando comparações com plantas não inoculadas e expressão de genes nas variedades que recebem altas e baixas contribuições da FBN.

A partir do levantamento feito no banco de dados do projeto genoma, novos experimentos foram conduzidos. Segundo VINAGRE (2005) inoculou bactérias diazotróficas, não diazotróficas e bactérias patogênicas nas variedades SP70-1143, que recebe alta contribuição da FBN e Chunque, com baixa contribuição e em variedades suscetíveis. Estes experimentos mostraram expressão de genes de receptores do tipo quinase, controle de patógeno, glutamina sintetase e etileno, diferentemente expressos nas

consequentemente, a planta responderá mais rapidamente quando atacada por patógenos.

Um risco da inativação para as bactérias diazotróficas é a presença de oxigênio. Este elemento tem sido mostrado como regulador da expressão de genes *nif* na bactéria *H. seropedicae* (PEDROSA et al., 2001). Porém, a FBN demanda muita energia e a bactéria necessita de super ativação do sistema aeróbico para geração de energia e, neste caso, corre risco de inativação. ESTs que codificam para proteínas envolvidas na geração de substâncias oxidativas, como peroxidase e gluconato oxidase foram encontrados, sugerindo que a planta controla a população, já que ao exigir super ativação do metabolismo aeróbico, este produzirá substâncias oxidativas, podendo inativar parte da população.

Os resultados apresentados acima sugerem que um elaborado sistema de vias de sinalização é disparado quando as plantas de cana-de-açúcar são colonizadas por bactérias diazotróficas endofíticas. Apesar dos benefícios oferecidos às plantas por estas bactérias, é esperado que a planta tenha desenvolvido mecanismos para controlar a colonização e evitar patogenicidade. Leguminosas controlam a infecção através do nódulo, em cana-de-açúcar estes genes de nodulação foram encontrados, porém como não ocorre formação de nódulos, os autores sugerem que a associação seja controlada por vias normalmente utilizadas na resistência à patógenos.

Buscando ESTs relacionados com defesa vegetal (LAMBAIS, 2001), foram selecionados 277 ESTs que codificam para quitinases,  $\beta$  1,3-glucanase, fenilalanina, amônia liase, chalcona sintase, chalcona isomerase, isoflavona isomerase, glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, peroxidase, catalase, superóxido dismutase, fatores de transcrição e proteínas envolvidas no controle da morte celular. Como a variedade de cana-de-açúcar usada para a formação das bibliotecas infectadas não é a mesma usada nas outras bibliotecas, foram agrupados apenas 179 ESTs por similaridade de seus perfis de expressão, que eram expressos em ambas as situações, e foi avaliado seu grau de supressão e ativação.

### **5.3. O papel da planta no estabelecimento da associação com bactérias diazotróficas**

O sistema de associação entre plantas e microrganismos mais bem estudados até o momento é a simbiose entre rizóbio e leguminosas. Neste tipo de associação, grande parte da troca de sinais moleculares que ocorre na comunicação entre a planta e a bactéria já foi identificada. Compostos fenólicos, denominados flavonóides, são liberados pela planta e induzem a expressão de genes de nodulação na bactéria. Alguns desses genes são responsáveis pela síntese de fatores nod, que são à base da especificidade entre a bactéria e a planta. Em leguminosas a bactéria permanece em estruturas especializadas, denominadas nódulos, não entrando em contato direto com o citoplasma da célula vegetal. A planta é responsável pela translocação de carbono, suprimento de oxigênio e mecanismos de senescência, controlando desta maneira, a população de bactérias (VALARINI, 1998).

Na interação entre plantas e micorrizas arbusculares e plantas e rizóbios, alguns genes de defesa da planta são induzidos durante os estágios iniciais de interação e parcialmente suprimidos mais tarde (LAMBAIS, 2000). Em micorrizas foi observado que estes genes são suprimidos em condições desfavoráveis para a associação, como em solos com alta quantidade de fósforo (LAMBAIS, 2000).

Pouco se sabe sobre os processos de reconhecimento e controle das bactérias diazotróficas endofíticas em gramíneas. Uma importante questão a ser respondida é se a planta apenas fornece nicho para o crescimento da bactéria ou é ativamente envolvida na associação. Diferenças na contribuição da FBN em variedades de cana-de-açúcar sugerem que a planta tem papel ativo nesse processo.

### **6. Aspectos genéticos e moleculares na resposta da cana-de-açúcar à presença de bactérias diazotróficas endofíticas**

---

Pouco se sabe até o momento sobre o papel da cana-de-açúcar na associação com bactérias diazotróficas endofíticas. Uma das formas

de avaliar esta interação é investigar o perfil de expressão gênica da planta durante a associação. Baseado no sequenciamento de regiões expressas no genoma da variedade micropropagada SP70-1143, inoculada com *G. diazotrophicus* (AD1) e *H. rubrisubalbicans* (HR1), foi observado que diversos genes de cana-de-açúcar são induzidos na presença de bactérias diazotróficas endofíticas (NOGUEIRA et al., 2001). Neste trabalho, foram avaliados 1827 ESTs e os autores mostraram que 133 ocorreram apenas nas bibliotecas infectadas, sendo 90 exclusivos desta associação envolvidas nos processos de sinalização, nodulação, crescimento da planta e metabolismo do nitrogênio. Dos ESTs exclusivos, 25% ou 33 deles, possuem função desconhecida. Estes dados sugeriram que a planta tem participação ativa, respondendo a diversos processos metabólicos durante a interação.

Posteriormente, um maior número de ESTs foram avaliados (VINAGRE et al., 2006). Dos 43.141 ESTs, 621 foram exclusivos e 462 preferencialmente expressos nas bibliotecas infectadas. A busca da função biológica agrupou os ESTs em 18 categorias funcionais e foi observado que 31,5% deles possuem função ainda não conhecida, diferindo muito do banco de dados do SUCEST com plantas não inoculadas, onde esta categoria foi representada por apenas 13,8% (Figura 1).

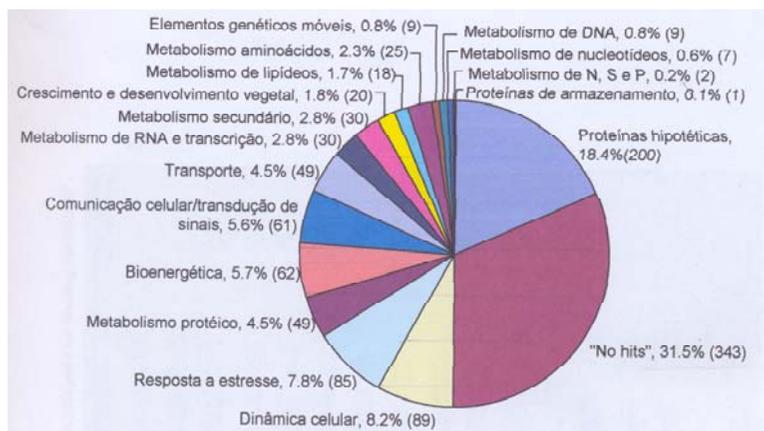


Figura 1: Agrupamento funcional dos ESTs no genoma da variedade SP70-1143, inoculada com *G. diazotrophicus* e *H. rubrisubalbicans*. Fonte: VINAGRE et al., 2006.

Foram observadas diferenças nos níveis de expressão nas bibliotecas de AD1 (plantas inoculadas com *G. diazotrophicus*) e HR1 (plantas inoculadas com *H. rubrisubalbicans*). Com exceção da categoria comunicação celular e transdução de sinais, todas as demais categorias apresentaram diferentes níveis de expressão nas bibliotecas infectadas. Dentre os 391 grupos de ESTs de AD1, 311 eram exclusivos e 80 preferenciais. Já em HR1, dos 472 grupos, 228 eram exclusivos e 244 preferenciais. Isso mostra que a presença de *G. diazotrophicus* gera respostas exclusivas e *H. rubrisubalbicans* induz muitos genes, que também são encontrados em outras bibliotecas. Também foi encontrado um grande número de ESTs exclusivos de plantas monocotiledôneas, sugerindo que estas plantas desenvolveram mecanismos específicos para reconhecimento de associações benéficas.

ESTs exclusivos e preferências de bibliotecas infectadas foram avaliadas quanto à função de sinalização (VARGAS et al., 2003). Vários foram relacionados com receptores do tipo quinase, hormônios em plantas, translocação, fatores de transcrição, ubiquitinação e resposta a estresse.

Muitos tipos de receptores foram encontrados e podem ter função na interação planta/bactéria sendo a maioria, receptores do tipo quinase. Também, foram encontrados homólogos a fatores de transcrição e ubiquitinas, que estão ligados à sinalização. A maioria dos fatores de transcrição é citada como controladores dos hormônios jasmonato, ácido absísico e giberelina, tolerância a vários estresses e defesa contra patógenos.

ESTs envolvidos na sinalização, transporte e biosíntese dos hormônios auxina, giberelina e etileno foram reconhecidos. Etileno é um hormônio ativo na defesa contra patógenos, ferimentos e nodulação (O'DONNELL et al., 1996). Frequentemente a resposta a etileno está associada à auxina, devido sua habilidade em sintetizar etileno (VARGAS et al., 2005, citado por VINAGRE, 2005) e já foi observado que *G. diazotrophicus* produz auxina em meio de cultura (FUENTES-RAMÍREZ et al., 1993). Estes dados sugerem que o etileno pode estar relacionado com a associação, atuando no controle da população de bactérias diazotróficas endofíticas, e